

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

ANA CAROLINA FELIPE DE LIMA

**Toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco usadas em
formulações dermocosméticas – Revisão da literatura**

Brasília

2018

ANA CAROLINA FELIPE DE LIMA

**Toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco usadas em
formulações dermocosméticas – Revisão da literatura**

Monografia apresentada ao curso de
graduação em Farmácia da Universidade de
Brasília como requisito obrigatório para
obtenção de título de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria de Fátima Borin

Co-orientador: Rafael Lucas de Assis Ferreira

Brasília

2018

ANA CAROLINA FELIPE DE LIMA

**Toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco usadas em
formulações dermocosméticas – Revisão da literatura**

Monografia apresentada ao curso de
graduação em Farmácia da Universidade de
Brasília como requisito obrigatório para
obtenção de título de Bacharel em
Farmácia.

Brasília, 28 de junho de 2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin (orientadora)

Dra. Ádria do Prado Barros de Souza

Agradecimentos

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, por me darem sabedoria, saúde e forças para completar essa jornada acadêmica.

Aos meus pais, Abadia e Genivaldo, que me acompanharam nessa caminhada sempre me apoiando e me incentivando e me dando suporte com muito amor, em especial minha mãe Abadia por toda dedicação e sacrifícios feitos ao longo da vida por mim e pelos meus irmãos.

Aos meus irmãos Leonardo e Ricardo pelo apoio e incentivo.

À minha madrinha Lúcia que participou sempre da minha educação e é uma das minhas maiores incentivadoras.

Ao meu namorado Anderson, por toda a paciência, compreensão, incentivo e palavras de amor e motivação.

Aos meus amigos da vida, Bruno Vilas Boas, Naiara Andrade, Marianna Costa, Ananda Ellen, Rayane Fernandes, Nathália Cavalcante que durante toda a minha vida estiveram ao meu lado, me apoiando, acreditando em mim e no meu potencial.

Aos meus amigos que conheci durante os 6 anos de graduação, Jessica Larissa, Sayuri Moreira, Filipe Félix, Fernando Ricardo, vocês fizeram diferença na minha vida acadêmica. A Bruna Lepesqueur, que nessa reta final acreditou em mim e me contagiou com seu otimismo e alegria diária.

À minha orientadora Maria de Fátima Borin e ao meu co-orientador Rafael Lucas, por aceitarem trabalhar comigo e por todas as contribuições feitas para a conclusão deste trabalho, minha gratidão a vocês.

Resumo

A nanotecnologia está cada vez mais sendo inserida em produtos de cuidados com a saúde com o intuito de promover a qualidade de vida dos seres humanos. O dióxido de titânio e óxido de zinco são exemplos de partículas nanométricas que, em tamanhos menores que 100 nm, apresentam benefícios às formulações dermocosméticas. Nessas formulações, as partículas diminuídas são empregadas com a finalidade de melhorar o aspecto do produto mantendo a função dos compostos. Ambos os compostos na forma de nanopartículas são aplicadas em protetores solares e são extensamente usadas nessas formulações por serem barreiras físicas protetoras contra os raios ultravioleta, e, na forma nanométrica, quando aplicadas topicamente possibilitam a manutenção da aparência translúcida das formulações. No Brasil estes compostos são permitidos como barreiras fotoprotetoras em concentrações de até 25% da formulação. Mesmo com a regulação do uso das nanopartículas em dermocosméticos, existe uma preocupação sobre a segurança do uso destes compostos em consequência do tamanho reduzido das partículas que, desta forma, podem apresentar capacidade de atravessar a barreira da pele e atingir a derme. Existem trabalhos na literatura que relatam que dióxido de titânio e óxido de zinco podem causar efeitos tóxicos em células da pele humana, como, por exemplo, o aumento do estresse oxidativo. Além disso, ensaios *in vivo* e *in vitro* mostraram que a indução da produção de espécies reativas de oxigênio é o principal mecanismo que desencadeia os efeitos tóxicos causados pelo dióxido de titânio e óxido de zinco em células da pele. Mesmo que o uso das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco, até os dias atuais, tenha apresentado a eficácia esperada nos dermocosméticos, é necessária a expansão de pesquisas científicas que garantam que os compostos usados em tamanho nanométrico não sejam prejudiciais para a saúde humana.

Palavras-chave: toxicidade, dióxido de titânio, óxido de zinco, cosméticos, pele, estresse oxidativo.

Abstract

Nanotechnology is being increasingly inserted into health care products with the aim of promoting for human beings a better quality of life. Titanium dioxide and zinc oxide are examples of nanometric particles, which in size smaller than 100 nanometers bring some benefits to dermocosmetic formulations. In such formulations, they are used with the purpose of improving the appearance of the product keeping their function. Both compounds in form of nanoparticles are applied in sunscreens and are widely used in such formulations as protective physical barriers against ultraviolet rays. Moreover, when applied topically they give a translucent appearance to the formulation. In Brazil these compounds are allowed as photoprotective barriers at concentrations of up to 25% of the formulation. Even with its regulation of the use of nanoparticles in dermocosmetics, there is concern about the safety of the use of these compounds as a consequence of the nanometric size of their particles, mainly because when applied topically they might cross the skin barrier and reach viable layers of epidermis. There are some reports at the literature relating that titanium dioxide and zinc oxide may cause toxic effects to epidermal cells, such as increased oxidative stress. Moreover, *in vivo* and *in vitro* assays have shown that the induction of reactive oxygen species is the main mechanism that triggers toxic effects in cells. Although the use of nanoparticles of titanium dioxide and zinc oxide is effective in dermocosmetics, it is necessary to expand the scientific researches to ensure that the use of nanometric particles of titanium dioxide and zinc oxide are inert to human health.

Keywords: toxicity, titanium dioxide, zinc oxide, cosmetics, skin, oxidative stress.

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma dos artigos encontrados	14
--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultado dos estudos de penetração dérmica das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco	28
Tabela 2. Resultado dos estudos de citotoxicidade	36
Tabela 3. Resultado dos estudos de genotoxicidade	42
Tabela 4. Resultado dos estudos de indução do estresse oxidativo	52

Lista de Abreviaturas

COX 2 - ciclo-oxigenase-2

DCFH-DA - diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína

EDX - energia dispersiva do raio-X

EGR-1 - *Early Growth Response Protein 1*

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinases*

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

GSH - Glutationa

HaCAT - Linhagem celular de queratinócitos

HEK - Queratinócitos primários humanos

LDH - lactato desidrogenase

MDA - malondialdeído

MAPKs - *Mitogen Activated Protein Kinases*

mDFs - Fibroblastos Dérmicos de Camundongos

MPM *Multifoton Microscopy*

MPO - mieloperoxidase

MPT-FLIM - *Multifoton Tomography with Fluorescence Life-Time Microscopy*

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NF-κB - *nuclear transcription factor kappa B*

NRU - *Neutral Red Uptake*

SEM - *scanning electron microscopy*

SOD - superóxido dismutase

TK - timidina quinase

UV - Ultravioleta

WISH - Células Epiteliais Humanas Amnion

WSTs - *Water-soluble tetrazolium salts*

XPRT - xantina-guanina fosforribosiltransferase

XTT - 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

Sumário

1. Introdução	11
2. Objetivo	13
3. Metodologia.....	13
3.1. Tipo de estudo e levantamento de dados.	13
4. Revisão da literatura	15
4.1. Nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco	15
4.2. A pele e os dermocosméticos	17
4.3. Penetração dérmica das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco	20
4.4 Toxicidade relacionada às nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco	31
4.4.1. Citotoxicidade	31
4.4.2 Genotoxicidade	38
4.4.3 Indução do estresse oxidativo.....	43
5. Considerações Finais	55
6. Referências	57

1. Introdução

A nanotecnologia está cada vez mais presente no cotidiano dos seres humanos. É utilizada em uma gama de produtos farmacêuticos e cosméticos (KATZ et al., 2015).

As formulações cosméticas que usam a nanotecnologia estão presentes no dia a dia de milhares de pessoas no mundo e, atualmente, vêm trazendo grandes benefícios e satisfação para a vida da população. São exemplos desses produtos a pasta de dente, os cosméticos antienvhecimento e antitranspirantes, os protetores solares, maquiagens e produtos de hidratação e limpeza do corpo e cabelo (DE LA CALLE et al., 2017).

O dióxido de titânio e o óxido de zinco são extensivamente usados na forma de nanopartículas em cosméticos, com a finalidade de deixar o produto com o aspecto agradável, dar estabilidade à formulação e, nos casos dos protetores solares, para agirem como uma barreira protetora aos raios ultravioleta (UV) (NOHYNEK et al., 2007).

As nanopartículas foram inseridas nas formulações cosméticas, em específico nos protetores solares, no início dos anos 80, com o intuito de aumentar a adesão dos consumidores a estas formulações. Partículas maiores em formulações fotoprotetoras causavam branqueamento excessivo quando aplicadas na pele. As nanopartículas apresentavam os mesmos benefícios contra a radiação UV e, além disso, quando aplicadas topicamente, diminuía o branqueamento, deixando a formulação transparente (SCHILLING et al., 2010).

Nas formulações cosméticas, relacionadas com o cuidado da pele, são permitidas nanopartículas de tamanhos aproximadamente entre 1 a 100 nm, segundo o FDA (*Food and Drug Administration*, USA) (KATZ et al., 2015).

Na Europa, a utilização de nanopartículas em cosméticos é regulamentada pela resolução da Comissão Europeia nº 1223/2009, de 30 de novembro de 2009. O dióxido de titânio e o óxido de zinco encontram-se autorizados para uso em formulações de protetores solares de acordo com esta resolução (DE LA CALLE et al., 2017). Na RDC nº 03, de 20 de janeiro de 2012, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) listou substâncias com restrições de uso em formulações cosméticas. Entretanto, o dióxido de titânio e óxido de zinco não tiveram restrições de uso nas formulações de acordo com esta resolução da ANVISA (BRASIL, 2012). Segundo o FDA, os dois compostos na forma de nanopartículas estão aptos para a utilização como barreira fotoprotetora (FDA, 2017).

No Brasil, a RDC nº 69, de 23 de março de 2016, da ANVISA lista a concentração de filtros de luz ultravioleta permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. O dióxido de titânio e óxido de zinco são permitidos como filtros UV em concentrações de até 25% da formulação (BRASIL, 2016).

Existem relatos de que a utilização de dióxido de titânio e óxido de zinco em produtos cosméticos é inerte à saúde humana, mas os estudos relacionados com a toxicidade das nanopartículas destes compostos estão em expansão na comunidade científica, e têm demonstrado a necessidade de verificar a sua segurança para a saúde humana (SCHILLING et al., 2010).

Desta forma, esse trabalho teve como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre o risco toxicológico do uso de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio em formulações dermocosméticas.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão da literatura de estudos, *in vivo* e *in vitro*, sobre o risco toxicológico do uso de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio em formulações dermocosméticas.

3. Metodologia

3.1. Tipo de estudo e levantamento de dados.

A metodologia adotada para o desenvolvimento deste trabalho foi a revisão narrativa da literatura. Para o levantamento de dados foram utilizadas as bases de dados *Pubmed*, *Scopus* e *Web of Science*.

As palavras-chave utilizadas foram toxicidade (*toxicity*), dióxido de titânio (*titanium dioxide*), óxido de zinco (*zinc oxide*), cosméticos (*cosmetics*), protetor solar (*sunscreen*), pele (*skin*), estresse oxidativo (*oxidative stress*), genotoxicidade (*genotoxicity*), citotoxicidade (*cytotoxicity*), queratinócitos (*keratinocytes*), fibroblastos (*fibroblasts*) e suas associações.

Os artigos foram selecionados de forma subjetiva, entre os trabalhos publicados no período de 2007 a 2017.

O critério de escolha foi artigos que relatavam estudos com células da pele ou a exposição dérmica às nanopartícula de dióxido de titânio e óxido de zinco.

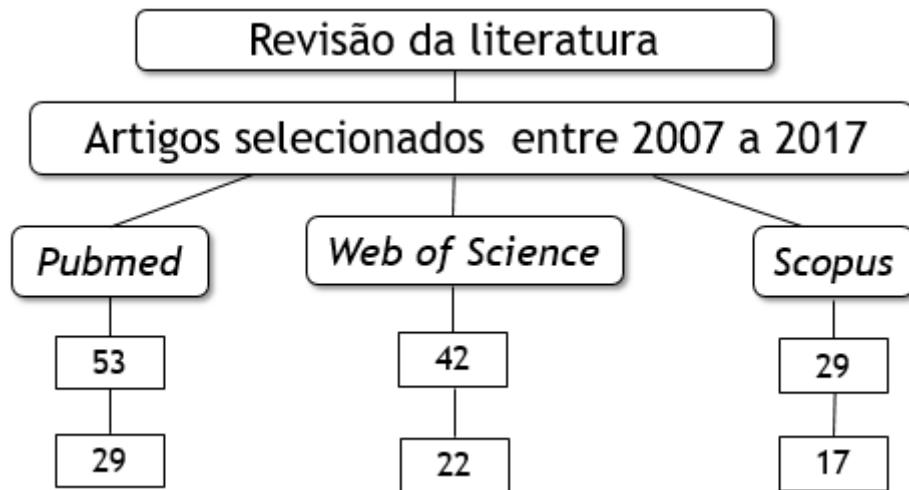


Figura 1. Fluxograma dos artigos encontrados.

4. Revisão da literatura

4.1. Nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco

O dióxido de titânio (TiO_2) é um composto inorgânico, se apresenta na forma de pó branco, não combustível e inodoro e, na natureza, é o nono elemento mais abundante (TUCCI e GRANDE, 2016). As partículas de TiO_2 se encontram agregadas e aglomeradas, formando uma rede de cristais. O dióxido de titânio é sintetizado em três diferentes tipos de cristais, anastase (tetragonal), rutilo (tetragonal) e brookita (ortorrômbico), sendo as formas cristalinas anastase e rutilo as mais empregadas como filtros UV e com outras funções em cosméticos. O dióxido de titânio é aplicado em cosméticos na forma de partículas ultrafinas (nanopartículas), cujo tamanho varia de 1 a 150 nm (WEIR et al., 2012). Além disto, a nanopartícula de dióxido de titânio está entre os cinco pigmentos mais utilizados em produtos de consumo diário, sendo aplicado em tintas, revestimentos, plásticos, papéis, produtos farmacêuticos, alimentos e cosméticos (SHI et al., 2013).

Apesar da nanopartícula de TiO_2 possuir propriedade fotoprotetora, ela possui estrutura eletrônica que, quando submetida à radiação UV, pode promover a formação de radicais altamente reativos com substâncias orgânicas (SKOCAJ et al., 2011).

O óxido de zinco (ZnO) é um composto inorgânico que se apresenta em forma de pó branco ou cinza, sendo que sua coloração varia de acordo com o tamanho da sua partícula. É encontrado na crosta terrestre, porém a maioria do ZnO disponível é produzido sinteticamente. O óxido de zinco pode ser revestido com sílica tendo como benefício a redução da sua atividade fotocatalítica (KIM et al., 2017). A nanopartícula de óxido de zinco possui alta capacidade de absorção de radiação UVA e UVB. Quando em contato com a luz UV, a nanopartícula de ZnO absorve a radiação e transmite

elétrons excitados da banda de valência para a banda de condução, gerando reações foto-redox, sendo assim, benéfica para formulações fotoprotetoras (KIM et al., 2017; SIRELKHATIM et al., 2015).

A nanopartícula de ZnO é aplicada em uma gama de produtos, como plásticos, vidro, cerâmica, cimento, borracha, lubrificantes, tintas, adesivos, pomadas, selantes, pigmentos, alimentos, baterias, ferrita, produtos farmacêuticos e cosméticos (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA et al., 2014). O ZnO possui capacidade de absorver de maneira eficaz a radiação UV e, dessa forma, é um componente comum em filtros solares. Ele é empregado nessas formulações cosméticas na forma de partículas de 40 a 100 nm de tamanho, que têm a capacidade de absorver a luz visível, tornando a formulação transparente e de melhor dispersão na pele (KIM et al., 2017).

O dióxido de titânio e o óxido de zinco são extensivamente usados em cosméticos, como, por exemplo, em esmaltes, cremes dentais, batons e protetores solares, com a finalidade de deixar o produto com o aspecto agradável, dar estabilidade à formulação e, nos casos dos protetores solares, para agirem como uma barreira protetora aos raios UV (NOHYNEK et al., 2007; KATZ et al., 2015; DE LA CALLE et al., 2017).

A literatura relata que, desde o início dos anos 80, as nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco começaram a ser utilizadas, demonstrando serem compostos de grande importância para se alcançar uma proteção solar efetiva (WANG, S. Q.; TOOLEY, I. R., 2011). Nesse período, foi relatado que o uso de partículas maiores (200 a 400 nm) nas formulações causava um branqueamento excessivo, promovendo uma baixa adesão dos consumidores aos fotoprotetores. A fim de solucionar este problema, na década de 80 surgiram as primeiras patentes e estudos sobre o uso dessas partículas em escala nanométrica, expondo seus benefícios contra a radiação UV e melhorando a

aparência das formulações de protetores solares, diminuindo assim o efeito do branqueamento excessivo quando aplicados sobre a pele (SCHILLING et al., 2010).

Nas formulações fotoprotetoras o uso dessas nanopartículas inorgânicas foi bem aceito e logo aplicado, pois partículas menores além de apresentarem ao produto uma boa aparência quando empregadas na pele, mantinham a capacidade de refletir a radiação e reduzir a atividade fotocatalítica (SCHILLING et al. 2010). Nessas formulações, o dióxido de titânio e o óxido de zinco são classificados como bloqueadores físicos e apresentam efetividade quando usados em partículas de tamanho de 60-120 e 20-30 nm, respectivamente (FILIPE et al., 2009).

As nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco apresentam benefícios para a aplicação em dermocosméticos, são permitidos em formulações farmacêuticas e cosméticas e considerados seguros para a saúde. Entretanto, atualmente, devido ao tamanho reduzido de suas partículas, estudos relacionados a sua toxicidade estão em expansão na comunidade científica. A principal preocupação da utilização das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido zinco está relacionada com a possibilidade de penetração em camadas mais profundas da pele e, assim, de atingirem células viáveis, causando efeitos tóxicos como citotoxicidade, genotoxicidade e indução do estresse oxidativo.

4.2. A pele e os dermocosméticos

A pele é o maior órgão do corpo humano e os seus papéis principais são agir como barreira física protetora, regular a perda de água e revestir toda superfície do corpo (KOLARSICK et al., 2011).

A pele humana é constituída de três camadas, epiderme, derme e hipoderme ou tecido subcutâneo. A camada epidérmica é composta por cerca de 90% de

queratinócitos, que possuem a função de sintetizar queratina, uma proteína com finalidade protetora (NATARAJAN et al., 2014; KOLARSICK et al., 2011). A derme, a camada média da pele, é constituída de fibroblastos e da proteína fibrilar denominada colágeno. Abaixo da derme encontra-se o tecido subcutâneo que contém as células gordurosas, os lipócitos (KOLARSICK et al., 2011).

A epiderme possui um epitélio estratificado e escamoso, e, além dos queratinócitos, ela possui outros tipos celulares como melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (DEHDASHTIAN et al., 2018).

A epiderme é dividida em camadas de acordo com a morfologia dos queratinócitos, possuindo assim camada basal, camada de células escamosas, camada granular e a camada córnea. A camada basal é o local de atividade mitótica das células da epiderme, e danos causados a células dessa camada podem conseqüentemente afetar a proliferação celular. A camada da epiderme mais superficial que possui células viáveis é denominada de estrato granuloso ou camada granular. Esse estrato granuloso é responsável pela síntese de proteínas envolvidas no mecanismo de queratinização. Já a camada córnea, ou estrato córneo, é responsável por proteger de forma mecânica a epiderme, é uma barreira contra entrada de substâncias estranhas, além de evitar a perda de água. As células encontradas na pele possuem a capacidade de regeneração, o que permite a preservação do tecido (KOLARSICK et al., 2011; DEHDASHTIAN et al., 2018).

Os dermoscômicos são aplicados topicamente na pele para exercerem ação local (TRAN et al., 2009). A aplicação cutânea tem o intuito de obter um efeito tópico e os compostos que penetram a pele são absorvidos por meio dos poros, das glândulas sudoríparas, folículos pilosos e das outras estruturas que compõe a superfície da pele. As formas farmacêuticas e cosméticas destinadas à aplicação tópica são formuladas com

o intuito de promover ação local e de longa duração com a mínima absorção, são exemplos de formas farmacêuticas e cosméticas tópicas: cremes, pomadas, géis, pastas, loções, emplastos, aerossóis e adesivos (TRAN et al., 2009; ALLEN JR et al., 2013; RUELA et al., 2016;).

Os cosméticos são formulações desenvolvidas com a finalidade de melhorar aparência da pele (GONÇALVES et al., 2017). Cosméticos, por definição não agem na derme. Porém, com o atual conhecimento sobre a funcionalidade e morfologia da pele, os cosméticos evoluíram e deixaram de ser formulações elaboradas apenas para melhorar a aparência e assumiram um papel de cuidado com a pele (NEWBURGER et al., 2009).

Os produtos que têm capacidade de atravessarem a epiderme a alcançarem a derme, que agem em camadas mais profundas e são utilizados em tratamentos de distúrbios da pele humana são denominados dermocosméticos (DRENO et al., 2014). Eles são frequentemente usados para favorecer a fotoproteção, como quimioprotetores, para melhorar a hidratação da pele, com função anti-envelhecimento (*antiaging*), para tratamento da pele inflamada e em patologias como acne, rosácea, dermatite atópica, psoríase e dermatite seborreica, bem como em diversos distúrbios do cabelo e unhas. Assim como os cosméticos, eles podem ser aplicados de forma direta na pele, couro cabeludo, cabelos e unhas (DRENO et al., 2014; GONÇALVES et al., 2017).

A indústria de dermocosméticos tem investido em novas técnicas de análise e no estabelecimento de diretrizes exigentes a fim de avaliar a segurança dos excipientes contidos nessas formulações. Para garantir aos consumidores segurança e eficácia são realizados, por exemplo, testes não invasivos em pele danificada para demonstrar o efeito dos dermocosméticos na pele (DRENO et al., 2014).

Testes como avaliação de irritação cutânea, sensibilização dérmica, citotoxicidade, fototoxicidade e avaliação da permeação e retenção cutâneas são realizados em dermocosméticos afim de garantir a segurança da sua utilização (BRASIL, 2012).

Os dermocosméticos são aplicados na superfície da pele humana com a finalidade de tratar desordens cutâneas e auxiliar no cuidado da pele. As formulações dermocosméticos são aplicadas diretamente na pele, ou seja, na superfície da epiderme, com isso se torna necessário garantir a segurança dessas formulações para que não haja alteração na morfologia da pele e que não induza toxicidade para as células viáveis da derme.

4.3. Penetração dérmica das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco

Em estudos prévios, realizados *in vivo* e *in vitro*, tem sido demonstrado que o TiO_2 e ZnO não têm a capacidade de penetrar a pele integra (SMIJS et al., 2011, HACKENBERG et al., 2012; SHI et al., 2013; SCHILLING et al., 2010; LIU et al., 2016; TUCCI e GRANDE 2016; KIM et al., 2017).

As nanopartículas de TiO_2 na forma cristalina rutilo e de tamanho de 140 nm foram empregadas para um estudo de permeação em pele de porco que, além da aplicação tópica das nanopartículas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ por um período de 24 e 48 horas, também foi exposta à radiação UVB. O método de espectrometria de massa de íons secundários (TOF-SIMS) foi usado para avaliação da penetração do cristal rutilo do TiO_2 . Neste estudo, os resultados mostraram nanopartículas de TiO_2 no interior do estrato córneo e que os danos causados pela radiação UVB na pele permitiram a permeação das nanopartículas até camadas mais profundas da epiderme (MONTEIRO-RIVIERE et al., 2011).

Um estudo *in vivo* para avaliação da penetração dérmica, realizada em porcos, utilizou três tipos de nanopartículas de TiO_2 (nanoporadas revestidas e de tamanho nanométrico; revestidas com níquel; e não revestidas dimeticona/meticona), as quais foram empregadas a uma concentração de 5% da formulação no preparo de filtros solares para aplicação dérmica. Após 22 dias de tratamento, foram retirados linfonodos, fígado, rim e baço dos animais, e analisados quanto à presença das nanopartículas de dióxido de titânio, mas não foram observados sinais das nanopartículas nesses órgãos. Após realização da secção da pele dos porcos e análise por microscopia eletrônica, os autores demonstraram que as nanopartículas estavam presentes no estrato córneo, e concluíram que, para epiderme normal, a taxa de penetração de TiO_2 na pele não era significativa (SADRIEH et al., 2010).

Outro trabalho publicado teve como objetivo investigar a penetração cutânea, *in vitro* e *in vivo*, de nanopartículas de TiO_2 , utilizando porcos e camundongos ou as peles destes animais. No teste *in vitro* que utilizou peles de suínos, avaliou-se a permeação cutânea de uma suspensão de nanopartículas de TiO_2 de diferentes tamanhos (4, 10, 25, 60 e 90 nm) utilizando células de Franz. Os resultados obtidos mostraram que o dióxido de titânio, independentemente do tamanho da sua partícula, não foi capaz de atravessar a barreira do estrato córneo. Já no estudo *in vivo*, foi aplicada, topicamente, uma emulsão contendo 5% de dióxido de titânio em orelha de porcos por 30 dias e avaliado a penetração cutânea. Após a aplicação da formulação contendo diferentes tamanhos (4, 10, 25, 60 e 90 nm) da nanopartículas de TiO_2 , as mesmas foram encontradas no estrato córneo da pele. Entretanto, nanopartículas de 4 nm foram capazes de penetrar a camada celular basal. Além disso, camundongos receberam aplicação tópica da emulsão de nanopartículas de TiO_2 5% com tamanhos de 10 nm, 21 nm, 25 nm e 60 nm por 60 dias. O tratamento com as nanopartículas causaram mudanças de peso corporal dos animais e

o teor de colágeno da pele foi reduzido independentemente do tamanho das nanopartículas. Este tratamento em longo prazo causou também efeitos patológicos na pele, como aparecimento de rugas e adelgaçamento da espessura da epiderme (WU et al., 2009).

Nanopartículas de dióxido de titânio menores que 20 nm foram empregadas para avaliar a penetração dérmica em pele de porco intacta, danificada pelo procedimento de decapagem da pele e danificada por irradiação. Os autores observaram nos três tipos de ensaio de peles tratadas com as nanopartículas de TiO_2 que, após 24 horas de ensaio, as nanopartículas de dióxido de titânio estavam localizadas na camada superficial da pele e não penetravam além do estrato córneo (MIQUEL- JEANJEAN et al., 2012).

Um estudo realizado com intuito de avaliar a desagregação de TiO_2 fotoinduzida, avaliou a aplicação de de 200 μL de uma suspensão na concentração de 1000 mg/L de dióxido de titânio com partículas de 30 nm em estado aglomerado em pele porco previamente seccionada e expôs a amostra de pele à radiação UV. Os resultados do trabalho mostraram que a luz teve influência direta na desagregação dos cristais de TiO_2 , que teve como consequência uma maior facilidade de penetração dérmica. Os autores ainda levantaram a hipótese desta penetração ser mais significativa em humanos, nas mesmas condições de ensaio, uma vez que a pele do porco é duas vezes mais espessa que a pele humana (BENNETT et al., 2012).

Xu e colaboradores avaliaram a permeação de TiO_2 na pele de ratos Hras128, que possuem sensibilidade a carcinogênese cutânea, por aplicação tópica de 100 mg/mL de TiO_2 rutilo com tamanho de 20 nm, duas vezes na semana por 52 semanas. Os resultados mostraram que as nanopartículas não foram capazes de permear a pele, pois ficaram localizadas apenas na camada superficial do estrato córneo (XU et al., 2011).

Em um outro estudo, amostras de pele humana intacta ou danificada foram utilizadas para a avaliação da permeação de uma suspensão contendo 1,0 g/L de nanopartículas de dióxido de titânio em um ensaio de 24 horas utilizando células de Franz. Os resultados mostraram que as nanopartículas permaneceram na epiderme, indicando que mesmo com a pele danificada não houve aumento do potencial de penetração das nanopartículas de TiO₂ através do estrato córneo (CROSERÁ et al., 2015).

Em pesquisa realizada com foco na avaliação do potencial de irritação dérmica das nanopartículas de TiO₂, utilizou-se um modelo equivalente à pele humana (HSEM), resultante de queratinócitos. O dióxido de titânio foi aplicado na superfície do modelo de pele humana por 1 hora e mantido a 37°C. Os autores concluíram que o TiO₂ não apresentou potencial de irritação dérmica em consequência da capacidade limitada de penetração no estrato córneo (MIYANI et al., 2017).

Com a finalidade de avaliar a formulação de um protetor solar comercial contendo nanopartículas de TiO₂, um ensaio *in vivo* utilizou dois voluntários com pele normal. Os voluntários aplicaram a formulação seis vezes ao dia durante 7 dias, sendo que a aplicação foi feita primeiro na pele intacta, que não havia sido exposta à radiação solar, e depois em um local do corpo que era exposto à radiação UVB. Os resultados sugeriram que as nanopartículas podem penetrar o estrato córneo após exposição à luz UVB, podendo chegar em camadas da pele que contêm células viáveis (NÆSS et al., 2016).

A segurança do uso das nanopartículas do óxido de zinco também vem sendo estudada pela comunidade científica nos últimos anos (ZVYAGIN et al., 2008; FILIPE et al., 2009; GULSON et al., 2010; DARVIN et al., 2012; LEITE SILVA et al., 2013; yr ILVES et al., 2014; RYU et al; 2014; HOLMES et al., 2016).

A aplicação tópica de nanopartículas de ZnO (20 nm) em ratos por 90 dias, nas doses diárias de 250, 500 e 1.000 mg/Kg em cada grupo, foi avaliada e os resultados mostraram que não houve absorção sistêmica do ZnO, pois os autores do estudo concluíram que a penetração do óxido de zinco se limitou à camada epidérmica da pele (RYU et al., 2014).

Um trabalho utilizando pele ferida e pele com dermatite atópica de camundongos avaliou a penetração cutânea do ZnO. Foram utilizados dois diferentes tipos de nanopartículas, de tamanho nanométrico, denominado no estudo de nZnO, e bZnO, de partículas maiores que 100 nm. Os resultados mostraram que as nZnO apresentaram uma tendência de se depositarem no folículo piloso e, na pele com dermatite atópica, foi capaz de atingir a camada dérmica. É importante ressaltar que os camundongos com dermatite atópica apresentaram espessura aumentada da pele. Já na pele que estava apenas ferida, as nanopartículas de ZnO foram capazes de provocar uma redução na espessura da pele (ILVES et al., 2014).

Um estudo *in vivo* utilizando voluntários, e que utilizou a metodologia da tomografia multifotônica com microscopia de tempo de vida de fluorescência (MPT-FLIM), demonstrou que a aplicação tópica de uma suspensão contendo ZnO (<100 nm) por 6 horas fez com que as nanopartículas permanecessem nas camadas superficiais do estrato córneo, não tendo efeito sobre atividades metabólicas (LEITE SILVA et al., 2013).

Em um segundo estudo *in vivo* empregando a metodologia de microscopia multifotônica (MPM) juntamente com microscopia eletrônica de varredura (SEM) e uma técnica de energia dispersiva de raio X (EDX) para determinação da penetração de nanopartículas de ZnO na camada dérmica, foi observado um acúmulo de óxido de

zinco no estrato córneo. Entretanto, foi possível observar a presença de nanopartículas de ZnO nas dobras cutâneas e nos folículos pilosos da pele (ZVYAGIN et al., 2008).

As nanopartículas de ZnO, como mencionado, não atravessam a pele humana. Entretanto, as partículas de ZnO de 30 nm aplicadas topicamente em pele humana foram capazes de se aglomerar no estrato córneo, e por tomografia multifotônica foi possível observar que estas nanopartículas estavam localizadas em sulcos da pele, rugas, orifícios e folículos pilosos (DARVIN et al., 2012).

A penetração em pele humana do óxido de zinco e os íons resultantes da dissociação da molécula também foi avaliada utilizando formulações que continham nanopartículas de ZnO. Foram usadas três tipos de formulações, uma suspensão em óleo, óxido de zinco associado com triglicerídeos caprílicos cápricos (CCT) e uma suspensão aquosa de ZnO em pH 6. Para as três formulações os resultados foram os mesmos, não havendo penetração na derme viável. Porém, por avaliação do íon de zinco por fluorescência, foi possível observar que, no estrato córneo e na epiderme viável, houve um aumento de depósito de zinco, evidenciado pelo aumento do sinal de fluorescência, sendo que esse aumento significativo se deu quando a formulação aquosa com ZnO em pH 6 foi utilizada. Apesar dos autores concluírem que as nanopartículas de ZnO não atravessavam o estrato córneo, os resultados do estudo mostraram que os íons de zinco conseguem atravessar a pele e atingir a circulação sistêmica, sendo excretados na urina (HOLMES et al., 2016).

A fim de avaliar a capacidade do zinco de ser absorvido sistemicamente, um outro estudo foi realizado com 20 indivíduos, que receberam aplicação tópica de filtros solares contendo ZnO. Dois filtros solares foram testados, o primeiro contendo partículas de 19 nm de ZnO e outro filtro solar com partículas de ZnO maiores que 100 nm. Antes da aplicação, amostras de sangue e urina foram coletados dos indivíduos para

serem utilizados como amostras controle. O ZnO foi enriquecido com o isótopo estável (68) que permitiu distinguir o zinco absorvido pela pele. Após cinco dias de estudo, amostras de sangue e urina foram coletadas dos indivíduos e os resultados mostraram que a maior parte do Zn não chegou à corrente sanguínea, porém traços de Zn foram encontrados no sangue e na urina dos voluntários. O estudo não permitiu concluir se as pequenas quantidades de zinco encontradas nas amostras de urina e sangue eram das partículas maiores de ZnO, de partículas de ZnO nanométricas ou de ambas (GULSON et al., 2010).

Em um estudo *in vivo*, com o propósito de avaliar a penetração das nanopartículas de TiO₂ e ZnO, provenientes da mesma formulação de protetor solar, foram utilizadas três tipos de formulações. A formulação A continha apenas dióxido de titânio, a formulação B continha dióxido de titânio e óxido de zinco e a formulação HB continha a forma cristalina rutilo do TiO₂ com tamanho de partícula de 20 nm. A metodologia usada para análise foi a microscopia nuclear, que forneceu a localização de cada tipo de nanopartícula nas camadas da pele. Os resultados para as formulações A e B em relação ao TiO₂ foram semelhantes, e o dióxido de titânio se manteve apenas na camada externa do estrato córneo. Os cristais de TiO₂ na forma rutilo se acumularam nas depressões da superfície do estrato córneo. Na formulação B, que continha TiO₂ e ZnO, o dióxido de titânio se manteve na camada superficial do estrato córneo e o óxido de zinco se manteve principalmente na superfície do estrato córneo, porém pequenas concentrações de ZnO foram encontradas no estrato córneo da pele (FILIPPE et al., 2009).

Em resumo, as nanopartículas de TiO₂ e ZnO não apresentam capacidade de penetração além da barreira do estrato córneo em tratamentos de curto prazo (FILIPPE et al., 2009; WU et al., 2009; SADRIEH et al., 2010; XU et al., 2011; MIQUEL

JEANJEAN et al., 2012; CROSERA et al., 2015; HOLMES et al., 2016; MIYANI et al., 2017).

O dióxido de titânio e o óxido de zinco se mostraram capazes de, em tratamentos de longo prazo, atingirem camadas mais profundas da epiderme, podendo entrar em contato com células viáveis e, como consequência, induzir alterações patológicas na epiderme e efeitos tóxicos nas células. Além disso, foi possível observar nos estudos que a radiação UV intensifica a penetração das nanopartículas de TiO_2 e ZnO e, dessa forma, a associação do uso crônico com radiação UV faz com que TiO_2 e ZnO alcancem camadas mais profundas da epiderme, como a camada basal. O óxido de zinco e a forma cristalina rutilo do TiO_2 foram capazes de se acumular em sulcos da pele, orifícios e folículos pilosos em diversos estudos (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado dos estudos de penetração dérmica das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco (continua).

Composto	Tamanho da partícula	Tipo de pele	Concentração usada no tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores e ano de publicação
Cristais de dióxido de titânio do tipo anastase	140 nm	pele de porco	50 µg/mL	24 e 48 horas com exposição a UVB	As nanopartículas localizavam-se no interior do estrato córneo. A radiação UVB permitiu a permeação.	MONTEIRO RIVIERE et al., 2011
Dióxido de titânio	3 tipos de nanopartículas: nanoporadas revestidas e de tamanho nanométrico; revestidas com níquel; e não revestidas	Porcos (<i>in vivo</i>)	5% da formulação	22 dias	Taxa de penetração das nanopartículas de TiO ₂ na pele dos animais não foi significativa	SADRIEH et al., 2010
Dióxido de titânio	4, 10, 25, 60 e 90 nm	Porcos e camundongos (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	5% da formulação	Para ensaio <i>in vivo</i> : 30 dias (estudos com porcos) e 60 dias (estudos com camundongos)	No teste <i>in vitro</i> as nanopartículas se limitaram ao estrato córneo. Em porcos apenas partículas de 4 nm permearam a camada basal porém em camundongos independentemente do tamanho de partícula, o dióxido de titânio causou efeitos patológicos na pele do animal.	WU et al., 2009
Cristais de dióxido de titânio do tipo anastase e rutilo	20 nm	Pele de porco intacta, danificada e danificada por irradiação com luz UV	-	24 horas	As nanopartículas de dióxido de titânio ficaram localizadas na camada superficial da pele	MIQUEL-JEANJEAN et al., 2012
Dióxido de titânio	30 nm, partículas em estado aglomerado	Pele de porco	200 µL de 1000 mg/L de TiO ₂ e irradiação com luz UV	-	Luz UV facilitou a penetração dérmica.	BENNETT et al., 2012

Tabela 1. Resultado dos estudos de penetração dérmica das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco (continuação).

Composto	Tamanho da partícula	Tipo de pele	Concentração usada no tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores e ano de publicação
Dióxido de titânio	-	Pele humana intacta ou danificada	-	Tratamento por 24 horas	As nanopartículas não atravessaram a barreira do estrato córneo em ambos os tipos de pele.	CROSERÁ et al., 2015
Cristais de dióxido de titânio do tipo rutilo	20 nm	Pele de ratos Hras128	-	Aplicação tópica duas vezes na semana por 52 semanas	As nanopartículas não foram capazes de permear a pele	XU et al., 2011
Cristais de dióxido de titânio do tipo rutilo	-	Pele humana normal	-	Aplicação tópica seis vezes ao dia durante 7 dias. Aplicação em duas partes uma na pele não exposta à radiação UV e outra em pele exposta à radiação.	Os autores concluíram que as nanopartículas podem penetrar o estrato córneo após exposição à luz UVB, podendo chegar nas camadas da pele que contém células viáveis	NÆSS et al., 2016
Óxido de zinco	< 100 nm	Pele humana normal (ensaio <i>in vivo</i>)	-	Aplicação tópica de uma suspensão contendo ZnO por 6 horas	As nanopartículas permaneceram na camada superficial do estrato córneo	LEITE SILVA et al., 2013
Óxido de zinco	2 tamanhos: nZnO (tamanho nanométrico) e bZnO (maior que 100 nm)	Pele ferida e pele com dermatite atópica de camundongos	-	-	O nZnO se acumulou em folículos pilosos e na pele com dermatite atópica atingiu a camada basal. Além disso, camundongos com dermatite atópica apresentaram espessura da pele aumentada.	ILVES et al., 2014

Tabela 1. Resultado dos estudos de penetração dérmica das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco (continuação).

Composto	Tamanho da partícula	Tipo de pele	Concentração usada no tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores e ano de publicação
Óxido de zinco		Pele humana (<i>in vivo</i>)			Acúmulo das nanopartículas em dobras cutâneas e nos folículos pilosos da pele	ZVYANGIN et al., 2008
Óxido de zinco	30 nm	Pele humana		Aplicados topicamente	As nanopartículas se aglomeraram no estrato córneo e estavam presentes em sulcos da derme, rugas e folículos.	DARVIN et al., 2012
Óxido de zinco	-	Pele humana (<i>in vivo</i>)	3 formulações, uma suspensão em óleo, óxido de zinco associado com triglicerídeos caprílicos cápricos (CCT) e uma suspensão aquosa de ZnO em pH 6.	-	O ZnO se depositou em camadas mais profundas da pele. Foi encontrado ZnO na urina dos indivíduos.	HOLMES et al., 2016
Óxido de zinco	19 nm e 100 nm	Pele humana (<i>in vivo</i>)	-	5 dias	Foi encontrado ZnO nas amostras de sangue e urina dos indivíduos.	GULSON et al., 2010
Dióxido de titânio, cristais de dióxido de titânio do tipo rutilo e óxido de zinco	A formulação A continha apenas dióxido de titânio, a formulação B continha dióxido de titânio e óxido de zinco e a formulação HB continha a forma cristalina rutilo do dióxido de titânio com tamanho de partícula de 20 nm	Pele humana normal (ensaio <i>in vivo</i>)	-	Aplicados topicamente	Para formulação A e B o dióxido de titânio se manteve na superfície do estrato córneo, o cristal rutilo se acumulou nas depressões da superfície do estrato córneo. Na formulação B, o óxido de zinco se manteve na superfície do estrato córneo, porém pequenas concentrações de ZnO foram encontradas no estrato córneo da pele	FILIPE et al., 2009

4.4 Toxicidade relacionada às nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco

4.4.1. Citotoxicidade

Avaliar a citotoxicidade de uma substância significa mensurar a capacidade intrínseca dela em promover proliferação ou morte celular. Para essa avaliação de toxicidade são utilizados métodos que monitoram a viabilidade das células. Os principais métodos usados são o que utilizam os sais de tetrazólio, como por exemplo o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), MTS [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio], XTT [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida] e WST (sais de tetrazólio solúveis em água). O ensaio de MTT é comumente empregado em estudos *in vitro* e foi o primeiro método a ser desenvolvido em placas de cultivo de células. Basicamente, o composto MTT é reduzido pelas células viáveis formando um precipitado de coloração intensa, sendo necessário solubilizar o precipitado resultante da reação de redução e, logo após, realizar a leitura da amostra em espectrofotômetro. A intensidade da coloração é proporcional ao número de células viáveis (RISS et al., 2016). Outros compostos de tetrazólio, MTS, XTT e WST, foram desenvolvidos recentemente e a vantagem em seu processo é a eliminação da etapa de solubilização de precipitado após coloração, pois eles são totalmente solúveis em meios de cultura de células empregados para os ensaios (RISS et al., 2016). Assim, utilizando estas metodologias, a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas pode ser estudada.

Quando o óxido de zinco e dióxido de titânio foram introduzidos como filtros físicos em formulações cosméticas seu uso era considerado seguro, porém, com a micronização das partículas e a possibilidade de que isto alterasse a absorção das mesmas pela pele, uma preocupação com relação à toxicidade destes compostos foi

suscitada (SMIJS et al., 2011, BAILLO e LIMA, 2012; HACKENBERG et al., 2012; SHI et al., 2013; LIU et al., 2016; TUCCI e GRANDE 2016; KIM et al., 2017). Assim, vários estudos têm sido realizados para avaliação da citotoxicidade das nanopartículas destes compostos.

Em um estudo utilizando fibroblastos de ratos (L929) tratados com concentrações de 3,0 a 600 $\mu\text{g/mL}$ de TiO_2 foi observado, pela morfologia das células, que com o aumento da concentração das nanopartículas de TiO_2 as células tornaram-se arredondadas, diminuíram de tamanho e ocorreram danos em algumas de suas organelas, como a desintegração do complexo de Golgi e o aumento do número de lisossomos (JIN et al., 2008). Além disto, foi observado para linhagem celular de fibroblastos BJ que, quando as células foram tratadas com TiO_2 em concentrações superiores a 250 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular reduziu cerca de 25% (SETYAWATI. et al., 2013). Um terceiro estudo empregando ensaio de viabilidade celular com fibroblastos dérmicos humanos, no qual foram utilizadas concentrações 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de dióxido de titânio, os autores observaram que as nanopartículas causaram significativa toxicidade para os fibroblastos após 24 horas de tratamento (PRASAD et al., 2012).

A fim de avaliar o potencial citotóxico dos cristais de TiO_2 do tipo anastase e rutilo, fibroblastos humanos foram tratados com estes compostos. Os resultados mostraram que o cristal do tipo anastase causou um dano na actina celular. Já as células submetidas ao tratamento com cristal do tipo rutilo do dióxido de titânio, comparada com a amostra controle, apresentaram mudanças de tamanho. Também foi relatado nesse estudo que o cristal de TiO_2 do tipo anastase tem a capacidade de penetrar na membrana celular e se depositar dentro das vesículas celulares, promovendo o seu rompimento (PAN et al., 2009).

Em estudo realizado *in vivo*, fibroblastos humanos se mostraram capazes de internalizar a nanopartícula de dióxido de titânio em seu citoplasma. Para o tratamento com nanopartículas de TiO₂ na concentração 15 µg/cm³ por 48 horas, foi observado que ocorria morte celular e inibição da proliferação em fibroblastos humanos e queratinócitos (KISS et al., 2008).

Por outro lado, Browning, no ano de 2014, estudou o tratamento de fibroblastos humanos com nanopartículas de TiO₂ nas concentrações 10, 50 e 100 µg/cm³ por 24 horas. Os resultados revelaram que, comparado à amostra controle, o TiO₂ não causou diminuição significativa na viabilidade celular.

Um estudo utilizando queratinócitos (HaCaT) mostrou que houve uma redução de 59% na viabilidade celular quando as mesmas foram tratadas com dióxido de titânio na concentração de 200 µg/mL e expostas à radiação UVA (XUE et al., 2011). Entretanto, Park e colaboradores demonstraram que a linhagem HaCaT, após ao tratamento com concentrações de 25 a 1000 µg/mL de TiO₂ por 24 e 48 horas, não apresentou sinais de toxicidade (PARK et al., 2011). Resultado semelhante foi encontrado em outro estudo, no qual após o tratamento de queratinócitos por 24 h, 48 h e 7 dias com dióxido de titânio, os autores observaram um efeito citotóxico da nanopartícula de dióxido de titânio após 7 dias de tratamento, porém, em curto prazo, o composto não demonstrou efeito citotóxico para células HaCaT (CROSERÁ et al., 2015).

As nanopartículas de TiO₂ foram empregadas também para avaliação de citotoxicidade em células epiteliais humanas âmnion (WISH) pelo ensaio de incorporação de vermelho neutro (NRU). Neste trabalho, a forma cristalina rutilo de TiO₂ demonstrou um efeito tóxico dose dependente para as concentrações de 0,625 a 10

$\mu\text{g/mL}$. A viabilidade celular foi reduzida em cerca de 24,5% na concentração máxima de tratamento com a nanopartícula (SAQUIB et al., 2012).

As nanopartículas de óxido de zinco também se mostraram citotóxicas em estudos realizados com queratinócitos primários humanos (HEK). Após seis horas de tratamento das células, as nanopartículas de ZnO, em concentrações de 8 a 20 $\mu\text{g/mL}$, inibiram a atividade mitocondrial, diminuindo a viabilidade celular (SHARMA et al., 2011). Além disto, quando células epidérmicas humanas (A431) foram tratadas com 0,8, 5,0 e 8,0 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO por 24 horas, ocorreu uma redução na viabilidade celular para 91%, 52% e 25%, respectivamente. Aumentando o tempo de tratamento para 48 horas, a viabilidade celular foi reduzida para 86%, 42% e 9%, respectivamente (SHARMA et al., 2009).

Ainda com relação ao estudo de citotoxicidade do ZnO, fibroblastos dérmicos de camundongos (mDFs) foram tratados com concentrações de 0,1, 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas de ZnO por 6, 24 e 48 horas. Em análises por micrografia de contraste foi visto que as células perderam suas características morfológicas quando tratadas com a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ das nanopartículas. Já no ensaio de MTT, as concentrações 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ causaram uma redução significativa da atividade mitocondrial, resultando na diminuição da viabilidade celular em 75%. (SEKER et al., 2014).

Tendo em vista os estudos relatados, a citototoxicidade do TiO_2 e do ZnO é dependente da dose e do tempo de tratamento, sendo que concentrações mais elevadas possuem efeito maior na redução da viabilidade celular. Para as nanopartículas de dióxido de titânio, a forma cristalina anatase demonstrou um potencial de citotoxicidade maior. Os fibroblastos foram as células que se apresentaram mais sensíveis aos efeitos tóxicos do TiO_2 , por facilitar a internalização das nanopartículas que, como consequência, geraram o efeito tóxico. Em relação ao óxido de zinco,

existem poucos relatos e estudos de citotoxicidade, porém, as nanopartículas deste composto causaram redução de viabilidade celular com o aumento do tempo de tratamento e da dose aplicada (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado dos estudos de Citotoxicidade (continua)

Composto	Linhagem celular	Concentração usada no tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores e ano de publicação
Dióxido de titânio	Fibroblastos de ratos (L929)	3,0 a 600 µg/mL	-	Alteração da morfologia celular e danos a algumas organelas	JIN et al., 2008
Dióxido de titânio	Fibroblastos BJ	250 µg/mL	-	Redução da viabilidade celular em 25%	SETYAWATI et al., 2013
Dióxido de titânio	Fibroblastos dérmicos humanos	30 a 100 µg/mL	24 horas	Após o tempo de tratamento a nanopartícula causou citotoxicidade	PRASAD et al., 2012
Dióxido de titânio anastase e rutilo	Fibroblastos humanos	-	-	O cristal anastase demonstrou ser mais citotóxico do que o rutilo	PAN et al., 2009
Dióxido de titânio	Fibroblastos humanos	15 µg/cm ²	48 horas	A nanopartícula foi internalizada no citoplasma da célula e ocorreu morte celular e inibição da proliferação de fibroblastos	KISS et al., 2008
Dióxido de titânio	Fibroblastos humanos	-	24 horas	Não causou alteração na viabilidade celular	BROWNING et al., 2014

Tabela 2. Resultado dos estudos de citotoxicidade (continuação)

Composto	Linhagem celular	Concentração usada no tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores e ano de publicação
Dióxido de Titânio	Queratinócitos (HaCAT)	200 µg/mL e exposição à radiação UVA		Redução de 59% na viabilidade celular	XUE et al., 2011
Dióxido de Titânio	Queratinócitos (HaCAT)	25 a 1000 µg/mL	24 e 48 horas	Não causou alteração na viabilidade celular	PARK et al., 2011
Dióxido de Titânio	Queratinócitos (HaCAT)	-	24 h, 48 h e 7 dias	A nanopartícula promoveu citotoxicidade após 7 dias de tratamento	CROSERÁ et al., 2015
Dióxido de Titânio rutilo	Células epiteliais humanas âmnion (WISH)	0,625 a 10 µg/mL	-	A viabilidade celular foi reduzida em cerca de 24,5% na concentração máxima de tratamento	SAQUIB et al., 2012
Óxido de Zinco	Queratinócitos primários humanos (HEK)	8 a 20 µg/mL	6 horas	A nanopartícula inibiu a atividade mitocondrial	SHARMA et al., 2011
Óxido de Zinco	Células epidérmicas humanas (A431)	0,8, 5,0 e 8,0 µg/mL	24 e 48 horas	Quanto maior o tempo de tratamento menor a viabilidade celular.	SHARMA et al., 2009
Óxido de Zinco	Fibroblastos dérmicos de camundongos (mDFs)	0,1, 1, 10, 50 e 100 µg/mL	6, 24 e 48 horas	Nas concentrações de 50 e 100 µg/mL reduziu a viabilidade celular em 75%	SEKER et al., 2014

4.4.2 Genotoxicidade

Os estudos de genotoxicidade podem ser determinados em ensaios *in vitro* e *in vivo*, com o intuito de identificar que tipo de composto induz dano ao material genético, diretamente ou indiretamente, por diferentes mecanismos. (MOHAMED et al., 2017). A análise de genotoxicidade desempenha um papel fundamental na avaliação da segurança de formulações farmacêuticas e cosméticas e seu estudo atualmente é uma exigência para desenvolvimento de novos compostos devido consequências carcinogênicas (TURKEZ et al., 2017).

É conhecido que espécies reativas de oxigênio, ou substâncias que podem aumentar sua produção, são agentes que podem causar danos diretos ou indiretos ao DNA. Outros agentes também podem causar dano ao material genético como a radiação ultravioleta e radiações ionizantes, inibidores da topoisomerase e inibidores da síntese de proteínas. O dano ao DNA é causado pela interação da partícula tóxica com a estrutura do DNA gerando alterações como, por exemplo, lesões, quebras, fusão, deleção e, como consequência, levando a danos e mutações no material genético (MOHAMED et al., 2017).

Os métodos para a avaliação do potencial genotóxico em células abordam principalmente a integridade do DNA com intuito de identificar carcinógenos humanos. A maioria dos métodos aplicados em estudos *in vivo* e *in vitro* tem sido usados na ciência por 30 a 40 anos (TURKEZ et al., 2017)

Para avaliação da genotoxicidade *in vitro* são realizados testes para identificar o dano ao DNA, sendo o ensaio de aberração cromossômica e de mutação genética frequentemente empregados nos estudos científicos. O teste de aberração cromossômica tem a finalidade de identificar agentes que causam alterações na estrutura dos

cromossomos ou cromátides. Já o teste de mutação genética é empregado para encontrar mutações decorrentes da ação de substâncias químicas, pois ele é capaz de identificar os pontos finais, como timidina quinase (TK) e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT), além de um transgene da mutação da xantina-guanina fosforibosiltransferase (XPRT) (MOHAMED et al.,2017).

In vivo, os principais ensaios utilizados para verificação de potencial genotóxico nos estudos são o ensaio cometa e o teste de micronúcleos. O ensaio cometa auxilia na detecção do dano ao DNA e identifica lesões primárias do material genético que não podem ser verificadas em nenhum outro teste. Esse ensaio pode ser aplicado a qualquer tipo de célula e em uma gama de tecidos, sendo isto a sua maior vantagem. Concomitantemente, o ensaio de micronúcleos possibilita a detecção de cromossomos danificados pela exposição à substância mutagênica. Nesse processo, a célula sofre lesões ou danos que culminam na formação de micronúcleos menores adicionais ao núcleo principal durante a divisão celular (MOHAMED et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na genotoxicidades de nanopartículas não são bem conhecidos, porém, sabe-se que essas partículas ultrafinas, por consequência do seu tamanho e propriedades físico-químicas, podem penetrar nas membranas celulares e alcançar o núcleo celular além de interagir com o DNA causando efeitos carcinogênicos e mutagênicos (MAGDOLENOVA et al., 2014).

A fim de avaliar possíveis efeitos genotóxicos provocados pelo tratamento com nanopartículas de dióxido de titânio, Prasad e colaboradores (2012) realizaram um tratamento de fibroblastos dérmicos humanos com TiO₂ na concentração de 100 µg/mL por 24 horas. Os resultados demonstraram que o dióxido de titânio foi capaz de diminuir a síntese relativa de DNA em fibroblastos humanos, podendo isso ser consequência de um *checkpoint* do ciclo celular em resposta aos danos no DNA. A análise da indução da

fosforilação de H2AX, um marcador de dano ao DNA, mostrou que esta também teve um aumento considerável. Os resultados demonstraram também que o tratamento com as nanopartículas ativou a via de sinalização de danos do DNA (ATM/CHK2) (PRASAD et al., 2012).

Bem como no estudo anterior, o marcador de dano ao DNA, cH2AX, foi expresso em fibroblastos BJ tratados com concentrações de TiO₂ menores que 10 µg/mL. Além disto, os autores concluíram que o mecanismo de dano ao DNA estava em ativação com o objetivo de reparar os danos celulares causados pelas espécies reativas de oxigênio (SETYAWATI et al., 2013).

Com o intuito de avaliar os efeitos genotóxicos das nanopartículas de dióxido de titânio dependente da forma cristalina utilizada e do tempo de tratamento, fibroblastos de golfinho nariz-de-garrafa, células humanas e também de camundongos, foram tratadas com TiO₂ nas formas anatase nanométrico e rutilo microdimensionado. Todas as linhagens celulares foram tratadas por 4, 24 e 48 h nas concentrações de 20, 50, 100 e 150 µg/mL de cada tipo de nanopartícula. Os fibroblastos de golfinhos mostraram ser tolerantes ao tratamento com as nanopartículas de dióxido de titânio. A forma cristalina anatase não produziu efeitos genotóxicos em fibroblastos de camundongos (3T3) independente da dose e do tempo de tratamento. Já a forma rutilo, em todas as doses, induziu efeitos tóxicos significativos em fibroblastos de camundongos (3T3), como a quebra das cadeias do DNA, após uma exposição inicial de quatro horas. Em relação aos fibroblastos humanos (HuDE), após quatro horas de tratamento, a forma anatase, na concentração de 50 µg/mL, foi capaz de aumentar danos ao DNA (FRENZILLI et al., 2014).

Para investigar a genotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco, queratinócitos primários humanos (HEK) foram tratados por 6 horas com concentrações

de 8 a 14 $\mu\text{g/mL}$. Os pesquisadores deste estudo observaram que as nanopartículas eram internalizadas pelas células e que promoviam danos ao DNA (SHARMA et al., 2011).

Foi demonstrado também que as nanopartículas de ZnO provocavam um efeito genotóxico em células epidérmicas humanas (A431). Sharma e colaboradores, em 2009, fizeram um estudo em que células A431 foram tratadas com concentrações de 0,8 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de ZnO e os danos ao DNA foram avaliados por meio do ensaio cometa. Os resultados mostraram que, após seis horas de tratamento, as células A431 apresentavam danos em seu DNA (SHARMA et al., 2009). Um outro estudo também avaliou a genotoxicidade das nanopartículas de óxido de zinco, por meio do ensaio Cometa, em fibroblastos embrionários de camundongos (NIH/3T3) que foram submetidos à radiação UVB e tratados com 100 $\mu\text{g/mL}$ das nanopartículas de ZnO. A associação do tratamento com a irradiação com a luz UV promoveu um dano significativo ao DNA e também induziu à formação de micronúcleos nas células (DEMIR et al., 2014).

Os resultados relatados demonstram que nanopartículas de dióxido de titânio podem ser tóxicas ao material genético das células, dependendo da linhagem celular, concentração e tempo de tratamento e da forma cristalina que as nanopartículas possuem. O cristal do tipo anatase do dióxido de titânio foi o que se mostrou mais genotóxico aos fibroblastos causando danos ao DNA das células. Para o ZnO foi demonstrado que a concentração de nanopartículas que causou o efeito genotóxico foi menor para os queratinócitos do que para os fibroblastos. Quando o tratamento foi associado à radiação UV, o efeito genotóxico foi potencializado em linhagens de fibroblastos (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado dos estudos de genotoxicidade

Composto	Linhagem celular	Concentração de tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores e ano de publicação
Dióxido de Titânio	Fibroblastos dérmicos humanos	100 µg/mL	24 horas	As nanopartículas de TiO ₂ ativaram a via de sinalização de danos do DNA (ATM/CHK2)	PRASAD et al., 2012
Dióxido de Titânio	Fibroblastos BJ	10 µg/mL	-	Mecanismo do dano ao DNA foi ativado devido a indução de produção de EROs	SETYAWATI et al., 2013
Cristais anastase e rutilo de dióxido de titânio	Fibroblastos de golfinho nariz-de-garrafa, Fibroblastos Humanos, Fibroblastos de Camundongos	20, 50, 100 e 150 µg/mL	4, 24 e 48 h	A forma cristalina anastase produziu efeitos genotóxicos em fibroblastos humanos na concentração de 50 µg/mL. O cristal rutilo induziu quebra da cadeia do DNA após tratamento de 4 h em fibroblastos de camundongos em todas as concentrações	FRENZILLI et al., 2014
Óxido de Zinco	Queratinócitos primários humanos (HEK)	8 a 14 µg/mL	6 horas	As nanopartículas foram internalizadas pelas células e promoveram danos ao DNA.	SHARMA et al., 2011
Óxido de Zinco	Células epidérmicas humanas (A431)	0,8 e 5 µg/m	6 horas	As nanopartículas causaram genotoxicidade.	SHARMA et al., 2009
Óxido de Zinco	Fibroblastos embrionários de camundongos (NIH/3T3)	100 µg/mL e radiação UVB		A associação do tratamento com as nanopartículas com a radiação UV acarretou em dano ao DNA e formação de micronúcleos nas células.	DEMIR et al., 2014

4.4.3 Indução do estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs), são produzidas durante o metabolismo aeróbio, como a respiração celular, durante atividade física intensa ou na resposta a toxinas, como fumaça de cigarro, álcool, radiações ionizantes e UV, pesticidas e ozônio. (RAY et al., 2012; PISOSCHI et al., 2015). Essas moléculas são extremamente reativas e capazes de danificar estruturas celulares de carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas e alterar suas funções (BIRBEN et al., 2012).

Estresse oxidativo é uma mudança no equilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante em favorecimento do sistema oxidante, devido ao excesso de EROs ou outros compostos oxidantes sobre a capacidade da célula em gerar uma resposta antioxidante eficiente. Como consequência do estresse oxidativo, danos macromoleculares são causados e implicam em várias patologias, como, por exemplo, aterosclerose, diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, neurodegeneração e envelhecimento (BIRBEN et al., 2012; RAY et al., 2012; PISOSCHI et al., 2015; LÓPEZ-ALARCÓN et al., 2013).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas a partir do oxigênio molecular, como resultado do metabolismo normal. As três espécies reativas de oxigênio de maior relevância fisiológica são o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PISOSCHI et al., 2015).

O organismo para balancear os efeitos oxidantes lança mão de métodos antioxidantes que, quando presentes em pequenas concentrações em relação a um substrato oxidável, são capazes de impedir ou retardar a reação de oxidação (PISOSCHI et al., 2015).

Os sistemas antioxidantes estão dispostos em duas categorias, enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático é composto por superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, tioredoxina, peroxirredoxina e glutathione transferase, e o não enzimático pela vitamina A, vitamina C, vitamina E, β -caroteno e glutathione. Esses compostos que compõem o sistema antioxidante são essenciais ao organismo e podem combater a ação das espécies reativas de oxigênio (BIRBEN et al., 2012; PISOSCHI et al., 2015).

O estresse oxidativo resulta em acúmulo de EROs intracelular. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no organismo pode resultar em modificações de proteínas e lipídeos, alterar estrutura do DNA, podendo acarretar em danos ao material genético, ativar diversos fatores de transcrição e influenciar na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (BIRBEN et al., 2012).

A fim de avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelas nanopartículas de dióxido de titânio, Kuku e colaboradores utilizaram a metodologia de espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) para investigar a toxicidade da forma cristalina anatase do TiO_2 em fibroblastos (L929). Os resultados desta análise permitiram observar a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular, sendo que a interação das EROs com a membrana celular pode afetar a integridade da membrana. Uma consequência da produção de EROs é a possível deformação da membrana como consequência da indução e propagação da cascata de peroxidação lipídica (KUKU et al., 2017). O estudo também demonstrou que, em estado de estresse oxidativo, a taxa de degradação do colágeno foi elevada. Igualmente ao trabalho anterior, usando a mesma linhagem de fibroblastos de ratos (L929), Jin e colaboradores mostraram que, quando as células foram tratadas com 600 $\mu\text{g/mL}$ de dióxido de titânio, os níveis de produção de EROs aumentaram e os níveis de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultivo,

comparados com grupo controle, aumentaram 284%. O tratamento de fibroblastos de ratos (L929) com as nanopartículas de TiO₂, nessa mesma faixa de concentração, promoveu uma diminuição nos níveis de glutathiona (GSH) e superóxido dismutase (SOD), antioxidantes, em respectivamente 31% e 10% em comparação com o controle (JIN et al., 2008).

Células HaCaT também foram tratadas com nanopartículas de TiO₂ de diferentes tamanhos a fim de avaliar seu efeito oxidativo. O tratamento foi feito com nanopartículas de TiO₂ de três tamanhos e de formas cristalinas diferentes: fina, com tamanho de 1 µm e 100% do composto formado por cristais da forma rutilo; ultrafina, com tamanho de 21 nm e cristais do tipo anastase (80%) e rutilo (20%); e H₂TiO₇, com tamanho de 12 nm e 100% do composto formado por cristais do tipo anastase. Os autores observaram que os três tamanhos de partículas de TiO₂ promoveram nas células um aumento significativo na produção de ânion radical superóxido. Além disto, após o tratamento com as nanopartículas, o acúmulo de EROs intracelular induziu a morte celular por ativação da via das caspases 8 e 9 (WRIGHT, et al, 2017).

Células HaCaT foram empregadas em um ensaio *in vitro* com a finalidade de avaliar a produção de EROs intracelular, através do método da coloração DCFH-DA (diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína). Quando a célula era tratada com 200 µg/mL de TiO₂, um aumento da fluorescência podia ser observado em comparação com o controle, indicando um aumento da produção de EROs em cerca de 30%. O estudo também avaliou a formação de malondialdeído (MDA), que é um dos principais produtos finais da peroxidação lipídica. Nas células tratadas com a nanopartícula de TiO₂ também ocorreu um aumento dos níveis de MDA intracelular (Xue et al., 2011).

YIN e colaboradores analisaram a fototoxicidade de nanopartículas da forma cristalina anastase (< 25 nm) e rutilo (< 100 nm) do TiO₂ em células HaCAT. Os autores

observaram um dano na membrana celular causado pelo tratamento com 100 µg/mL de TiO₂ anastase e com exposição à radiação UVA, que foi avaliado pelo extravasamento de lactato desidrogenase (LDH). Os autores sugeriram que o dano à membrana celular causado pelo TiO₂ em associação com a exposição à radiação UVA eram consequência da geração de espécies reativas de oxigênio. Utilizando a metodologia de oximetria por ressonância de spin eletrônica (ERS) e imuno spin, observaram também que a radiação UVA promovia um aumento significativo da toxicidade do TiO₂, e este efeito era mediado pela produção de espécies reativas de oxigênio e pela peroxidação lipídica e proteica (YIN et al., 2012).

Com a finalidade de investigar o dano ao DNA induzido por EROs, queratinócitos humanos (HaCAT) foram tratados com concentrações de 5 a 50 µg/mL de dióxido de titânio e expostos à radiação UVA. Após 4 h de tratamento, as células tratadas com qualquer das concentrações de dióxido de titânio testadas apresentaram um aumento significativo na geração de espécies reativas de oxigênio. O estudo mostrou que as nanopartículas se acumularam na superfície das células e foram facilmente absorvidas por endocitose. Após 24 h de tratamento com 10 µg/mL ou 48 h de tratamento com 5 µg/mL de dióxido de titânio foi observada a formação de micronúcleos nas células. O dano ao DNA mitocondrial também foi demonstrado como deleção comum após 72 horas de tratamento com 10 µg/mL de TiO₂, e mostrou um aumento significativo de 14 vezes, quando comparado com o controle. Portanto, os autores concluíram que as nanopartículas de TiO₂ possuem um efeito tóxico aos queratinócitos que é mediado por espécies reativas de oxigênio (JAEGER et al., 2012).

Ainda sobre a avaliação do efeito das nanopartículas de TiO₂ em associação com a luz UVA em queratinócitos, em trabalho realizado por Xue e colaboradores em 2015, os autores mostraram que essa associação ativa a morte celular por meio da produção de

EROs. Células HaCAT foram tratadas com 200 µg/mL de dióxido de titânio por 24 horas e expostas à radiação UVA, sendo observado um acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio 1,8 vezes maior do que o observado no controle. A fim de avaliar se este tratamento podia promover a apoptose, os autores avaliaram a atividade da caspase 3, uma protease envolvida na apoptose celular. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que após 24 horas de tratamento as nanopartículas de TiO₂ induziram o aumento das células apoptóticas de 6,3 % para 17,2 % em relação ao controle (XUE et al., 2015).

Outras linhagens celulares também foram avaliadas. Células epiteliais humanas âmnion (WISH) tratadas com 20 µg/mL de dióxido de titânio apresentaram aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e, como resultado disto, houve um aumento de 7,3% na parada do ciclo do ciclo celular na fase G2/M nas células tratadas comparadas às não tratadas. Além disto, o dióxido de titânio promoveu a quebra de fitas duplas do DNA, tendo sido observado um aumento de 14,5 vezes em relação ao controle (SAQUIB et al., 2012).

Em um outro ensaio *in vitro* com células da epiderme humana A431, Shukla e colaboradores demonstraram uma redução de níveis de glutathiona em 15,76% concomitantemente à uma elevação de 60,51% nos níveis de hidroperóxido lipídico, além da indução da produção de outras espécies reativas de oxigênio quando as células foram tratadas com 8 e 80 µg/mL de TiO₂ por um período de 6 horas. Além disto, os autores observaram a formação de micronúcleos como consequência ao estresse oxidativo produzido, um possível mecanismo para os danos ao DNA (SHUKLA et al., 2011).

Por outro lado, em 2009, Fujita e colaboradores avaliaram o efeito da indução do estresse oxidativo pelo dióxido de titânio em um estudo feito com queratinócitos

humanos tratados com dióxido de titânio da forma cristalina anastase de diferentes tamanhos (7 nm, 20 nm e 200 nm) e sem exposição das células à radiação UV. Pela avaliação dos perfis de expressão gênica das células, os autores observaram que os genes referentes à apoptose e ao estresse oxidativo não tiveram sua expressão aumentada. Na análise de *cluster*, foi possível observar que os genes cujas expressões foram induzidas estavam envolvidos na resposta inflamatória e na adesão celular, causando um remodelamento da matriz celular. Os resultados sugerem que, sem incidência de radiação UV, o TiO₂ não promove danos relacionados ao estresse oxidativo nas células (FUJITA et al., 2009).

O efeito de indução do estresse oxidativo também foi avaliado para as nanopartículas de óxido de zinco. Em estudo realizado com queratinócitos humanos tratados com 1 a 20 µg/mL de nanopartículas de ZnO de tamanho médio < 50 nm e expostos à radiação UVA por 24 horas, foram avaliados a citotoxicidade, o dano oxidativo ao DNA e o dano à membrana das células. Para essas concentrações avaliadas, o trabalho mostrou que as nanopartículas de ZnO diminuíram a viabilidade celular, via extravasamento de lactato desidrogenase (LDH). Além de promover a quebra da fita do DNA, o tratamento com óxido de zinco causou um aumento da toxicidade induzida pela radiação UVA, sendo esta relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio. Outro resultado relevante deste trabalho foi a observação da indução da peroxidação lipídica provocada pela exposição das células ao UVA concomitantemente ao tratamento com as nanopartículas de ZnO. O resultado obtido no ensaio ESR (ressonância de spin eletrônico), mostrou que os radicais hidroxil e o ânion superóxido são formados após a irradiação com UVA e tratamento com óxido de zinco (WANG et al., 2013).

Um outro estudo que avaliou o tratamento de células HaCAT com concentração de 10 µg/mL da nanopartícula de ZnO, com o intuito de avaliar expressão de Egr-1, um importante mediador de proliferação celular, e a indução da produção de EROs, mensurada por fluorescência, foi realizado por Jeong e colaboradores em 2013. Após 30 min de tratamento com 10 µg/mL de ZnO os níveis de EROs aumentaram significativamente em comparação com o controle. O estudo investigou se o tratamento com as nanopartículas de ZnO poderia induzir a via ERK, e os autores observaram que realmente o ZnO pode induzir a ativação transcricional da expressão da Egr-1 via ERK, e que isso é resultante da geração de espécies reativas de oxigênio intracelular. Após um tratamento de 12 horas com 10 µg/mL de ZnO foi também observado uma indução na produção TNF-alfa. Os autores concluíram que a nanopartícula de ZnO induzia a via EROs-ERK-EGR-1, que possui um papel fundamental em respostas inflamatórias na pele (JEONG et al., 2013).

Com a finalidade de avaliar a indução da produção de EROs, células epidérmicas humanas (A431) foram tratadas com concentrações de 0,008, 0,08 e 0,8 µg/mL de ZnO em um trabalho realizado por Sharma e colaboradores em 2009. Os autores observaram que o ZnO induziu o estado de estresse oxidativo celular e, após 24 horas de tratamento, houve uma redução dos níveis de glutathiona em 59% e 51% nas concentrações 0,8 e 0,08 µg/mL, da atividade da catalase em 64% quando as células eram tratadas com a maior concentração (0,8 µg/mL) e da superóxido dismutase em 72% e 75% em concentrações de tratamento a 0,08 e 0,8 µg/mL respectivamente (SHARMA et al., 2009). Portanto, assim como no trabalho realizado por Jeong et al., 2013, este trabalho demonstrou que o tratamento com as nanopartículas de óxido de zinco induziu, em células normais da pele, a produção de EROs. Além disso, foi observado por Yu e colaboradores em 2013, um aumento na expressão de proteínas

autofágicas em células normais epidérmicas de pele de rato JB6 tratadas com 10 µg/mL de ZnO e expostas por 24, 48 e 72 horas, e dessa forma, as espécies reativas de oxigênio causavam a indução da autofagia celular (YU et al., 2013).

Pal e colaboradores avaliaram *in vivo* o efeito de aplicações tópicas com doses de 10% de nanopartículas de ZnO (< 5 µm) em camundongos que foram expostos à radiação UVB por 6, 24 e 48 horas. Os animais foram eutanasiados após o tempo de irradiação e foram avaliadas a geração de espécies reativas de oxigênio, a atividade de mieloperoxidase (MPO), a atividade de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e também a ativação da via proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Os resultados mostraram que o tratamento tópico com as nanopartículas de óxido de zinco, juntamente com a radiação UVB, promoveu um aumento na expressão da via das MAPKs, dos fatores transcricionais NF-κB (fator nuclear kappa B) e também de COX-2, aumentando a resposta inflamatória. Além disto, houve um aumento significativo na produção de EROs em 6 horas de tratamento com as nanopartículas associado à irradiação UVB (PAL et al., 2016).

Os resultados publicados na literatura até o momento sugerem que o estresse oxidativo é um mecanismo-chave para a toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco. A geração de espécies reativas de oxigênio promovida pelas nanopartículas de ambos os compostos nas células pode desencadear efeitos citotóxicos e genotóxicos, além de afetar a modulação das defesas antioxidantes das células, como níveis de superóxido dismutase, lactato desidrogenase e glutatona, o que pode potencializar alguns efeitos tóxicos (JIN et al., 2008, XUE et al., 2011, YIN et al., 2012, JAEGER et al., 2012, XUE et al., 2015., SAQUIB et al., 2012, WANG et al., 2013, SHARMA et al., 2009). Tanto TiO₂ quanto ZnO demonstram um potencial de indução

de EROs aumentado quando os tratamentos com as nanopartículas foram associados à radiação UV (YIN et al., 2012, PAL et al., 2016).

Além da toxicidade relatada como consequência do aumento de EROs, já foi demonstrado que as nanopartículas de dióxido de titânio são capazes de induzir a degradação de colágeno, o que pode acarretar em envelhecimento precoce da pele (KUKU et al., 2017). Além disso, o tratamento de células HaCAT com nanopartículas de TiO₂ ativou vias de apoptose celular, como por exemplo a via das caspases 8 e 9 (WRIGHT et al., 2017). Já as nanopartículas de ZnO foram capazes de induzir a via EROs-ERK-EGR-1, relacionada a proliferação celular e fundamental em respostas inflamatórias cutâneas (JEONG et al., 2013) (Tabela 4).

Os resultados demonstrados na literatura sugerem o estresse oxidativo como o principal mecanismo de toxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco. Espécies reativas de oxigênio são moléculas altamente reativas e sua produção promovida por ambas nanopartículas induzem efeitos citotóxicos e genotóxicos, além de afetar o sistema antioxidante do organismo, modulando os níveis das enzimas antioxidantes. A radiação UV potencializa a geração de EROs promovida pelas nanopartículas, como consequência potencializando seus efeitos tóxicos para as células (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado dos estudos de indução do estresse oxidativo (continua).

Composto	Linhagem celular	Concentração de tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores do trabalho e ano de publicação
Dióxido de Titânio anastase	Fibroblastos de ratos (L929)	-	-	Aumento da produção de EROs, observado deformação da membrana e propagação da cascata da peroxidação lipídica	KUKU et al., 2017
Dióxido de Titânio	Fibroblastos de ratos (L929)	600 µg/mL	-	Indução de EROs alterou níveis de enzimas antioxidantes. LDH aumentou em 284%; GSH diminuiu em 31%; SOD diminuiu em 10%	JIN et al., 2008
Dióxido de Titânio	Queratinócitos (HaCAT)	200 µg/mL	-	Ocorreu um aumento de 30% na produção de EROs. Também foi observado aumento dos níveis do MDA intracelular	XUE et al., 2011
Dióxido de Titânio anastase e rutilo	Queratinócitos (HaCAT)	100 µg/mL, anastase (< 25 nm) e rutilo (< 100 nm) com exposição a radiação UVA	-	TiO ₂ anastase juntamente com a radiação UVA promoveram dano a membrana celular.	YIN et al., 2012
Dióxido de Titânio	Queratinócitos (HaCAT)	5 a 50 µg/mL com exposição UVA	4, 24 e 48 horas	Após 4 horas a nanopartícula aumentou a produção de Eros. Em concentrações de 5 e 10 µg/mL após 24 e 48 horas ocorreu dano ao DNA	JAEGER et al., 2012

Tabela 4. Resultado dos estudos de indução do estresse oxidativo (continuação).

Composto	Linhagem celular	Concentração de tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores do trabalho e ano de publicação
Dióxido de Titânio	Queratinócitos (HaCAT)	200 µg/mL com exposição à radiação UVA	24 horas	A nanopartícula foi capaz de induzir EROs intracelular. Ocorreu ativação da via da caspase 3 e um aumento em 17,2 % de células apoptóticas.	XUE et al., 2015
Dióxido de Titânio anastase	Queratinócitos (HaCAT)	-	7nm, 20 nm e 200 nme sem exposição de radiação UV	Por análise da expressão gênica das células, não foram observados genes referentes à apoptose e ao estresse oxidativo	FUJITA et al., 2009
Dióxido de Titânio	Células epiteliais humanas âmnion (WISH)	20 µg/mL		Ocorreu um aumento na produção de EROs que promoveu dano no DNA	SAQUIB et al., 2012
Dióxido de Titânio	Células da epiderme humana A431	8 e 80 µg/mL	6 horas	Redução de níveis da glutathione em 15,76%, elevação de 60,51% de hidroperóxido lipídico, além disto ocorreu formação de micronúcleos	SHUKLA et al., 2011
Óxido de Zinco	Queratinócitos (HaCAT)	1 a 20 µg/mL por 24 horas com exposição a radiação a UVA e tamanho de partícula < 50 nm		A nanopartícula induziu a produção de EROs e como consequência desse efeito houve dano ao DNA. A associação do tratamento do ZnO com radiação UVA induziu a peroxidação lipídica.	WANG et al., 2013

Tabela 4. Resultado dos estudos de indução do estresse oxidativo (continuação).

Composto	Linhagem celular	Concentração de tratamento	Tempo de tratamento	Resultado do estudo	Autores do trabalho e ano de publicação
Óxido de Zinco	Queratinócitos (HaCAT)	10 µg/mL	30 minutos	A nanopartícula de ZnO induziu a via EROs-ERK-EGR-1, que possui um papel fundamental em respostas inflamatórias na pele	JEONG et al., 2013
Óxido de Zinco	Células epidérmicas humanas (A431)	0,008, 0,08 e 0,8 µg/mL	24 horas	Houve redução dos níveis de glutathiona em 59% e 51% nas concentrações 0,8 e 0,08 µg/mL, da atividade da catalase em 64% quando as células eram tratadas com a maior concentração (0,8 µg/mL) e da superóxido dismutase em 72% e 75% em concentrações de tratamento a 0,08 e 0,8 µg/mL respectivamente	SHARMA et al., 2009
Óxido de Zinco	Células normais epidérmicas de pele de rato JB6	10 µg/mL	24, 48 e 72 horas	Houve indução de espécies reativas de oxigênio causando autofagia celular	YU et al., 2013
Óxido de Zinco	Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos	10% de nanopartículas com radiação UVB	6,24, 48 horas	Aumento significativo na produção de EROs após 6 horas de tratamento	PAL et al., 2016

5. Considerações Finais

Tendo em vista os resultados mencionados nesta revisão, as nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco apresentaram capacidade de reduzir a viabilidade celular e causar toxicidade ao material genético dependendo da dose e do tempo de tratamento em que foram aplicadas, sendo que as nanopartículas de dióxido de titânio anastase demonstraram ser mais citotóxicas do que a forma cristalina rutilo. Com os resultados dos estudos publicados na literatura, pode-se concluir que o estresse oxidativo é o mecanismo principal de toxicidade das nanopartículas de TiO_2 e ZnO . A indução da produção de espécies reativas de oxigênio pode causar, em células da pele humana, citotoxicidade, genotoxicidade, alteração no sistema antioxidante, além de degradar colágeno, podendo acarretar em envelhecimento precoce. As nanopartículas de dióxido de titânio e de óxido de zinco, quando associadas à radiação UV, induzem a produção de EROs.

Em relação à penetração dérmica das nanopartículas de TiO_2 e ZnO , o estrato córneo mostrou ser uma barreira de limitação para as nanopartículas, porém nos estudos em longo prazo foi observado que o dióxido de titânio e o óxido de zinco possuem a capacidade de penetrar camadas mais profundas da epiderme, podendo interagir com células viáveis e, como consequência, causar alterações patológicas na epiderme e efeitos tóxicos nas células. A literatura também demonstrou que a associação do tratamento com as nanopartículas de dióxido de titânio e de óxido de zinco com radiação UV intensifica a penetração cutânea destes compostos.

A utilização das nanopartículas de dióxido de titânio e óxido de zinco em dermocosméticos requer cuidado, devendo-se avaliar o tempo de exposição da pessoa à

radiação UV, visto que vários estudos mencionados evidenciaram que a associação de tratamento em longo prazo e exposição à radiação UV geram espécies reativas de oxigênio, que é o mecanismo chave de toxicidade destes compostos na pele.

Assim, novos estudos com o propósito de avaliar melhor a segurança de uso dessas nanopartículas sobre a pele poderiam auxiliar a esclarecer a concentração mínima e o tamanho exato em que elas induzem efeitos tóxicos para a saúde humana.

6. Referências

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA (ANVISA). Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2º Edição, Brasília, 2012.

ALLEN JR, Loyd V.; POPOVICH, Nicholas G.; ANSEL, Howard C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9. Artmed Editora, 2013.

BAILLO, Vanessa Priscila; LIMA, A. C. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. Revista Brasileira de Farmácia, v. 93, n. 3, p. 271-278, 2012.

BENNETT, Samuel W. et al. Photoinduced disaggregation of TiO₂ nanoparticles enables transdermal penetration. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48719, 2012.

BRASIL, Resolução RDC 03, de 20 de janeiro de 2012. Aprova o Regulamento Técnico “LISTAS DE SUBSTÂNCIAS QUE OS PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL, COSMÉTICOS E PERFUMES NÃO DEVEM CONTER EXCETO NAS CONDIÇÕES E COM AS RESTRIÇÕES ESTABELECIDAS” e dá outras providências. Órgão Emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em 05 de novembro de 2017.

BROWNING, Cynthia L. et al. Titanium dioxide nanoparticles are not cytotoxic or clastogenic in human skin cells. *Journal of environmental & analytical toxicology*, v. 4, n. 6, 2014.

CROSERÀ, Matteo et al. Titanium dioxide nanoparticle penetration into the skin and effects on HaCaT cells. *International journal of environmental research and public health*, v. 12, n. 8, p. 9282-9297, 2015

DARVIN, M. E. et al. Safety assessment by multiphoton fluorescence/second harmonic generation/hyper-Rayleigh scattering tomography of ZnO nanoparticles used in cosmetic products. *Skin pharmacology and physiology*, v. 25, n. 4, p. 219-226, 2012.

DEMIR, Eşref et al. Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. **Journal of hazardous materials**, v. 264, p. 420-429, 2014.

DE LA CALLE, I. et al. Screening of TiO₂ and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES). *Talanta*, v. 171, p. 291-306, 2017.

DRENO, B. et al. The science of dermocosmetics and its role in dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 28, n. 11, p. 1409-1417, 2014.

FDA (*Food and Drug Administration*, USA), Disponível em: <https://www.fda.gov/> . Acesso em: 07 de maio de 2018.

FILIPE, P. et al. Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin pharmacology and physiology*, v. 22, n. 5, p. 266-275, 2009.

FRENZILLI, Giada et al. Effects of in vitro exposure to titanium dioxide on DNA integrity of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) fibroblasts and leukocytes. *Marine environmental research*, v. 100, p. 68-73, 2014.

FUJITA, Katsuhide et al. Effects of ultrafine TiO₂ particles on gene expression profile in human keratinocytes without illumination: involvement of extracellular matrix and cell adhesion. **Toxicology letters**, v. 191, n. 2, p. 109-117, 2009.

GRANDE, Fedora; TUCCI, Paola. Titanium dioxide nanoparticles: a risk for human health?. *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 16, n. 9, p. 762-769, 2016.

GULSON, Brian et al. Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicological Sciences*, v. 118, n. 1, p. 140-149, 2010.

HACKENBERG, Stephan; KLEINSASSER, Norbert. Dermal toxicity of ZnO nanoparticles: a worrying feature of sunscreen?. *Nanomedicine*, v. 7, n. 4, p. 461-463, 2012.

HOLMES, Amy M. et al. Relative penetration of zinc oxide and zinc ions into human skin after application of different zinc oxide formulations. *ACS nano*, v. 10, n. 2, p. 1810-1819, 2016.

ILVES, Marit et al. Topically applied ZnO nanoparticles suppress allergen induced skin inflammation but induce vigorous IgE production in the atopic dermatitis mouse model. *Particle and fibre toxicology*, v. 11, n. 1, p. 38, 2014.

JAEGER, Alexandra et al. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology*, v. 296, n. 1-3, p. 27-36, 2012.

JEONG, Sang Hoon et al. ZnO nanoparticles induce TNF- α expression via ROS-ERK-Egr-1 pathway in human keratinocytes. *Journal of dermatological science*, v. 72, n. 3, p. 263-273, 2013.

JIN, Cheng-Yu et al. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical research in toxicology*, v. 21, n. 9, p. 1871-1877, 2008.

KATZ, L. M. et al. Nanotechnology in cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*, v. 85, p. 127-137, 2015.

KIM, Sung-Hwan et al. Safety evaluation of zinc oxide nanoparticles in terms of acute dermal toxicity, dermal irritation and corrosion, and skin sensitization. *Molecular & Cellular Toxicology*, v. 12, n. 1, p. 93-99, 2016.

KISS, Borbála et al. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Experimental dermatology*, v. 17, n. 8, p. 659-667, 2008.

KOLARSICK, Paul AJ; KOLARSICK, Maria Ann; GOODWIN, Carolyn. Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, Agnieszka; JESIONOWSKI, Teofil. Zinc oxide—from synthesis to application: a review. *Materials*, v. 7, n. 4, p. 2833-2881, 2014

KUKU, Gamze; CULHA, Mustafa. Investigating the Origins of Toxic Response in TiO₂ Nanoparticle-Treated Cells. *Nanomaterials*, v. 7, n. 4, p. 83, 2017.

LEITE-SILVA, Vânia R. et al. The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 84, n. 2, p. 297-308, 2013.

LIU, Jia et al. The toxicology of ion-shedding zinc oxide nanoparticles. *Critical reviews in toxicology*, v. 46, n. 4, p. 348-384, 2016.

LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo; DENICOLA, Ana. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*, v. 763, p. 1-10, 2013.

MAGDOLENOVA, Zuzana et al. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology*, v. 8, n. 3, p. 233-278, 2014.

MEYER, Kyle et al. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicology in vitro*, v. 25, n. 8, p. 1721-1726, 2011.

MIQUEL-JEANJEAN, Corinne et al. Penetration Study of Formulated Nanosized Titanium Dioxide in Models of Damaged and Sun-Irradiated Skins. *Photochemistry and photobiology*, v. 88, n. 6, p. 1513-1521, 2012.

MIYANI, Vivek A.; HUGHES, Michael F. Assessment of the in vitro dermal irritation potential of cerium, silver, and titanium nanoparticles in a human skin equivalent model. **Cutaneous and ocular toxicology**, v. 36, n. 2, p. 145-151, 2017.

MOHAMED, S. A. K. S. et al. Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2017

BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.

MONTEIRO-RIVIERE, N. A. et al. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 1, p. 264-280, 2011.

NÆSS, Elise M. et al. Titanium dioxide nanoparticles in sunscreen penetrate the skin into viable layers of the epidermis: a clinical approach. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, v. 32, n. 1, p. 48-51, 2016

NATARAJAN, Vivek T. et al. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature chemical biology*, v. 10, n. 7, p. 542, 2014.

PAL, Anu et al. UVB exposure enhanced the dermal penetration of zinc oxide nanoparticles and induced inflammatory responses through oxidative stress mediated by MAPKs and NF- κ B signaling in SKH-1 hairless mouse skin. ***Toxicology Research***, v. 5, n. 4, p. 1066-1077, 2016.

PAN, Zhi et al. Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. *Small*, v. 5, n. 4, p. 511-520, 2009.

PARK, Yoon-Hee et al. Analysis for the potential of polystyrene and TiO₂ nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 8, p. 1863-1869, 2011.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, v. 97, p. 55-74, 2015.

PRASAD, Raju Y. et al. Titanium dioxide nanoparticles activate the ATM-Chk2 DNA damage response in human dermal fibroblasts. *Nanotoxicology*, v. 7, n. 6, p. 1111-1119, 2012.

RISS, Terry L. et al. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual*, 2016.

RUELA, André Luís Morais et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, n. 3, p. 527-544, 2016.

RYU, Hwa Jung et al. Zinc oxide nanoparticles: a 90-day repeated-dose dermal toxicity study in rats. *International journal of nanomedicine*, v. 9, n. Suppl 2, p. 137, 2014.

SADRIEH, Nakissa et al. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano-and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicological Sciences*, v. 115, n. 1, p. 156-166, 2010.

SAQUIB, Quaiser et al. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology in vitro*, v. 26, n. 2, p. 351-361, 2012.

SCHILLING, K. et al. Human safety review of “nano” titanium dioxide and zinc oxide. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 9, n. 4, p. 495-509, 2010.

ŞEKER, Şükran et al. In vitro cytotoxicity of hydrothermally synthesized ZnO nanoparticles on human periodontal ligament fibroblast and mouse dermal fibroblast cells. *Toxicology in Vitro*, v. 28, n. 8, p. 1349-1358, 2014.

SENZUI, Mika et al. Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. **The Journal of toxicological sciences**, v. 35, n. 1, p. 107-113, 2010.

SETYAWATI, Magdiel Ingrid et al. Cytotoxic and genotoxic characterization of titanium dioxide, gadolinium oxide, and poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in human fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 101, n. 3, p. 633-640, 2013.

SHARMA, Vyom et al. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology letters*, v. 185, n. 3, p. 211-218, 2009.

SHARMA, Vyom et al. Zinc oxide nanoparticle induced genotoxicity in primary human epidermal keratinocytes. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 11, n. 5, p. 3782-3788, 2011

SHI, Hongbo et al. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology*, v. 10, n. 1, p. 15, 2013.

SHUKLA, Ritesh K. et al. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro*, v. 25, n. 1, p. 231-241, 2011.

SIRELKHATIM, Amna et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, v. 7, n. 3, p. 219-242, 2015.

SKOCAJ, Matej et al. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?. *Radiology and oncology*, v. 45, n. 4, p. 227-247, 2011.

SMIJS, Threes G.; PAVEL, Stanislav. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, science and applications*, v. 4, p. 95, 2011.

TRAN, Thanh-Nga T. Cutaneous drug delivery: an update. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Elsevier, p. S67-S69, 2013.

TURKEZ, Hasan; ARSLAN, Mehmet E.; OZDEMIR, Ozlem. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 13, n. 10, p. 1089-1098, 2017.

UBOLDI, Chiara et al. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicology In Vitro*, v. 31, p. 137-145, 2016.

WANG, S. Q.; TOOLEY, I. R. Photoprotection in the era of nanotechnology. In: *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. Frontline Medical Communications, p. 210-213, 2011.

WEIR, Alex et al. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental science & technology*, v. 46, n. 4, p. 2242-2250, 2012.

WRIGHT, Clayton et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles on human keratinocytes. *Drug and chemical toxicology*, v. 40, n. 1, p. 90-100, 2017.

WU, Jianhong et al. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. **Toxicology letters**, v. 191, n. 1, p. 1-8, 2009.

XU, Jiegou et al. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1298-1302, 2011

XUE, Chengbin et al. Chemoprotective effect of N-acetylcysteine (NAC) on cellular oxidative damages and apoptosis induced by nano titanium dioxide under UVA irradiation. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 1, p. 110-116, 2011.

XUE, Chengbin; LUO, Wen; YANG, Xiang liang. A mechanism for nano-titanium dioxide-induced cytotoxicity in HaCaT cells under UVA irradiation. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 79, n. 8, p. 1384-1390, 2015.

YIN, Jun-Jie et al. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 263, n. 1, p. 81-88, 2012.

YU, Kyeong-Nam et al. Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. ***Toxicology in Vitro***, v. 27, n. 4, p. 1187-1195, 2013.

ZVYAGIN, Andrei V. et al. Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo. *Journal of biomedical optics*, v. 13, n. 6, p. 064031, 2008.