

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional



Priscila Laviola Sanches

Estudo da citotoxicidade e biointerface de nanopartículas de dióxido de titânio utilizadas nas indústrias de cosméticos

Duque de Caxias

2017

Priscila Laviola Sanches

Estudo da citotoxicidade e biointerface de nanopartículas de dióxido de titânio utilizadas nas indústrias de cosméticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de mestre em Biomedicina Translacional.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Rosa Lopes Pereira Ribeiro

Co-orientadora: Prof^a. Marlene Benchimol

Duque de Caxias

2017

Priscila Laviola Sanches

Estudo da citotoxicidade e biointerface de nanopartículas de dióxido de titânio utilizadas nas indústrias de cosméticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de mestre em Biomedicina Translacional.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Rosa Lopes Pereira Ribeiro

Co-orientadora: Prof^a. Marlene Benchimol

Aprovada em _____ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Dra. Esther Rieko Takamori
Faculdade de Medicina de Petrópolis

Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

Dr. José Mauro Granjeiro
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

Dedico este trabalho,

A todos que tornaram possível sua realização, em especial aos meus pais, Walmir e Catarina, pelo amor, carinho, dedicação, ensinamento, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e por me fazer acreditar que tudo é possível, basta perseguir os sonhos. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado dons e tudo mais o suficiente para que eu pudesse chegar até aqui. Sei que “tudo posso naquele que me fortalece”.

À minha orientadora Dra. Ana Ribeiro, que me inspirou pelo seu exemplo de mulher íntegra, cuja moral não poderá jamais ser ocultada. Pelo exemplo de profissional, que cuja qualidade não pode ser mensurada ou avaliada. Pelo compromisso e incentivo. Pelas inúmeras conversas que contribuíram para o meu crescimento intelectual. Pela amizade e confiança, na construção desse trabalho. Pelo apoio e disponibilidade constante em todos os momentos. Enfim, serei eternamente grata por tudo.

À minha co-orientadora, Prof^a. Marlene Benchimol, por ter aceitado fazer parte deste sonho. Por ser um grande exemplo e inspiração para toda comunidade científica. Pelo exemplo de profissional, pelo compromisso e incentivo. Por estar disponível em todos os momentos que precisei.

Aos amigos, Dra. Sara Gemini Piperni, Wanderson Souza, Mestra Rosana Bizon, Rafaela dos Santos, Mestre Marcos Vinícius, Dra. Esther Takamori e Dra. Leslie Laquiese, pela amizade, companherismo, ajuda, conselhos e por todos os momentos de descontração.

Ao Prof^o Radovan Borojevic pelo exemplo de profissional e inspiração para toda comunidade científica. Pelo apoio e disponibilidade constante em todos os momentos.

Ao INMETRO, em especial o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) por disponibilizar o acesso à estrutura dos laboratórios e aos equipamentos.

Aos meus pais Walmir e Catarina, que com inteligência e sabedoria me ensinaram a viver sempre prezando pela dignidade, respeito e humildade. Eles que com excelência e qualidade constituíram uma incrível família que é pautada pela união. Agradeço imensamente pela criação e educação que me proporcionaram, por

nunca medir esforços para que eu pudesse alcançar os meus objetivos, e mais ainda, agradeço pela honra de ter vocês como pais.

Ao meu irmão Gustavo, a quem agradeço pelos constantes momentos em que teve paciência com minhas atitudes, e que inúmeras vezes contribuiu me apoiando e incentivando com os meus projetos e planos.

Aos meus avós José (em memória) e Isaura, pelo incentivo ao longo de todos os desafios para que eu chegasse até aqui. Agradeço imensamente por sempre se orgulharem mim.

Ao meu namorado Thiago, que sempre me apoiou e entendeu minhas limitações decorrentes do tempo de estudo a que precisei me dedicar.

À minha melhor amiga Mariana, a quem tenho somente a agradecer, pelo companheirismo e amizade, pelos diversos auxílios nos momentos em que mais precisei.

À FAPERJ pelo apoio financeiro.

Agradeço de coração por tudo que foram e fizeram até agora acreditando em meu potencial, insistindo em continuar quando minha vontade era desistir, pois isso me fez acreditar que sou importante e que tenho muito valor. Obrigada por acreditarem em mim.

“Para o espírito científico qualquer conhecimento é uma resposta a uma pergunta. Se não tem pergunta não pode ter conhecimento científico. Nada se dá tudo se constrói”

(G. Bachelard)

RESUMO

O desenvolvimento da área de nanotecnologia, em particular no que diz respeito à produção de nanomateriais, encontra-se em crescimento exponencial. A exposição humana a nanopartículas é elevada e originada de diversas fontes, tais como processos químicos, dispositivos médicos (implantes, próteses, sistemas de liberação controlada de fármacos), indústria alimentar, farmacêutica e de cosméticos. Entretanto, os resultados dos estudos da citotoxicidade destes nanomateriais é muitas das vezes contraditório. Desta forma, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas que analisem o impacto de nanopartículas na saúde humana, assim como gerar regulamentação que até ao momento é insuficiente. Atualmente, os protetores solares apresentam na sua composição nanopartículas como as de dióxido de titânio (TiO_2). A utilização do TiO_2 em fórmulas de filtros solares deve-se à sua capacidade de refletir e espalhar raios UVB (290–320 nm) e UVA (320–400 nm) garantindo uma boa proteção contra a radiação solar. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a potencial citotoxicidade de nanopartículas de TiO_2 na estrutura cristalina de rutilo em células de pele humana. Devido à aglomeração das nanopartículas, foi otimizado um protocolo de dispersão das nanopartículas, primeiro em água e depois em meio biológico, utilizando um sonicador no modo indireto. A dispersão foi, em seguida, caracterizada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Um estudo de adsorção de íons e proteínas foi realizado pela técnica de espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e por espectrometria de massas, respectivamente. A avaliação do perfil citotóxico das nanopartículas em culturas primárias de fibroblastos e queratinócitos foi realizada pelo ensaio de vermelho neutro e por citometria de fluxo. Os estudos da internalização das nanopartículas no interior de células foram realizados por MET. Os resultados demonstram que houve formação de um bio-complexo nas superfícies das nanopartículas devido à adsorção seletiva de íons e proteínas do meio de cultivo, como por exemplo, os íons de cálcio e fósforo e proteínas como a albumina, fibronectina e trombospondina. Foi observado também que as nanopartículas foram internalizadas por queratinócitos e fibroblastos primários da pele humana e migram

preferencialmente para a região perinuclear. Após a internalização das nanopartículas, houve um aumento significativo da morte celular por apoptose nos fibroblastos e redução significativa da viabilidade celular, assim como aumento de morte por apoptose e necrose nos queratinócitos, para as concentrações mais altas de nanopartículas. Supõe-se que a formação do bio-complexo pode mascarar as nanopartículas e modular a penetração das mesmas nas células da pele humana.

Palavras-chave: Nanopartículas, Dióxido de titânio, Rutilo, Dispersão, Citotoxicidade, Queratinócitos, Fibroblastos.

ABSTRACT

The development of the nanotechnology area, in particular in what regards the production of nanomaterials, is growing exponentially. Human exposure to nanoparticles is high and originated from a variety of sources, such as chemical processes, medical devices (implants, prostheses, controlled drug delivery systems), food, pharmaceutical and cosmetic industries. However, the study of the cytotoxicity of these nanomaterials is contradictory. Therefore, it is extremely important to develop research that analyzes the impact of nanoparticles on human health, as well as generating regulations that up to now is insufficient. Currently, the sunscreens have in their composition nanoparticles such as those of titanium dioxide (TiO₂). The use of TiO₂ in sunscreen formulation is due to its ability to reflect and spread UVB (290-320 nm) and UVA (320-400 nm) rays ensuring good protection against solar radiation. Therefore, this work aimed to evaluate the potential cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles in the rutile crystalline structure in human skin cells. Due to the agglomeration of nanoparticles, a nanoparticle dispersion protocol was optimized, first in water and then in biological medium using an indirect sonicator. The dispersion was then characterized by dynamic light scattering (DLS) and electronic transmission microscopy (MET). A study of ions and proteins adsorption was carried out by energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS) and mass spectrometry, respectively. We performed an evaluation of the nanoparticles cytotoxic profile in primary cultures of fibroblasts and keratinocytes by the neutral red assay and by flow cytometry. MET allowed the study of the nanoparticles internalization inside cells. The results demonstrate the formation of a bio-complex around nanoparticles surfaces due to the selective adsorption of ions and proteins from the culture medium, such as calcium and phosphorus ions and proteins as albumin, fibronectin and thrombospondin. We observed that human keratinocytes and fibroblasts internalized the nanoparticles, which located in microvesicles that migrate preferentially to the perinuclear region. However, after nanoparticle internalization, there was a significant increase in cell death due to apoptosis and a significant reduction in cell viability in the fibroblasts, as well as increased apoptosis death and

necrosis in keratinocytes. We suggest that the bio-complex formation can mask the nanoparticles and modulate their penetration into human skin cells.

Keywords: Nanoparticles, Titanium Dioxide, Rutile, Dispersion, Cytotoxicity, Keratinocytes, Fibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele.....	18
Figura 2. Ranking mundial de consumo de cosméticos	20
Figura 3. Esquema ilustrativo do funcionamento de um protetor solar.	22
Figura 4. Caracterização das nanopartículas presentes no protetor solar.....	40
Figura 5. Caracterização físico-química de nanopartículas de rutilo	41
Figura 6. Sistemas de dispersão.....	42
Figura 7. Protocolo de dispersão de nanopartículas em água.....	44
Figura 8. Protocolo de dispersão de nanopartículas em água.....	46
Figura 9. Estabilidade da dispersão	44
Figura 10. Dispersão em diferentes meios de cultivo.	49
Figura 11. Formação de bio-complexos rutilo em meio de cultura	51
Figura 13. Identificação das proteínas e sua função.	53
Figura 14. Cultura de Células primária da pele em monocamada.....	54
Figura 15. Dispersão em meios KGM sem soro.....	55
Figura 16. Formação de bio-complexos em meio de cultura KGM.....	56
Figura 17. Ensaio de vermelho neutro.	57
Figura 18. Citometria de fluxo.....	59
Figura 19. Viabilidade celular.....	60
Figura 20. Ciclo Celular	62
Figura 21. Imagens das culturas de células em monocamada.....	64
Figura 22. Quantificação celular	65
Figura 23. Estudo da internalização de nanopartículas.....	67
Figura 24. Modelo meramente ilustrativo do bio-complexo de proteína e íons adsorvidas às nanopartículas	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos)

BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro)

BSA (Albumina de soro bovino)

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

EDS (Energia Dispersiva de Raios X)

Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

EU (*European Union*)

INCA (Instituto Nacional do Câncer)

KGM (*Keratinocyte Growth Medium*)

LDH (Lactato Desidrogenase)

MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão)

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NanoReg (*A common European approach to the regulatory testing of Manufactured Nanomaterials*)

NP (Nanopartícula)

OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*)

PDI (Índice de Polidispersão)

PEG (Polietilenoglicol)

PI (Iodeto de propídio)

SDS (Dodecil sulfato de sódio)

SFB (Soro Fetal Bovino)

SiO₂ (Dióxido de Silício)

STEM (*Scanning transmission electron microscopy*)

TiO₂ (Dióxido de Titânio)

ZnO (Óxido de Zinco)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. Cosméticos - protetor solar	21
2.2. Propriedades físico-químicas das nanopartículas de dióxido de titânio	23
2.3. Corona proteica e iônica e sua correlação com o comportamento celular ...	24
2.4. Estudos in vivo da citotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio em células da pele	26
2.5. Estudos in vitro da citotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio em células da pele	27
3. OBJETIVO GERAL.....	30
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5. METODOLOGIA	31
5.1. Protetor solar comercialmente disponível	31
5.2. Nanopartículas de dióxido de titânio	31
5.3. Caracterização físico-química das nanopartículas de rutilo	31
5.4. Otimização de um protocolo de dispersão de nanopartículas.....	32
5.4.1. Dispersão em água.....	32
5.4.2. Dispersão em meio de Cultura	32
5.5. Caracterização da nano-bio interface.....	33
5.5.1. Adsorção de íons.....	33
5.5.2. Adsorção de proteínas.....	33
5.6. Culturas de células primárias em monocamada	35
5.7. Avaliação da citotoxicidade de nanopartícula de TiO ₂ (rutilo)	36
5.7.1. Avaliação da citotoxicidade por ensaio de vermelho neutro	36
5.7.2. Avaliação da citotoxicidade por citometria de fluxo	36
5.8. Avaliação da internalização de nanopartículas	37
5.9. Análise estatística	38
6. RESULTADOS	39
6.1. Caracterização físico química de um protetor solar, disponível comercialmente.....	39

6.2.	Caracterização físico-química e dispersão de nanopartículas de dióxido de titânio (fase cristalina - rutilo)	41
6.3.	Dispersão das nanopartículas em meios biológicos	47
6.4.	Adsorção de proteínas e íons do meio de cultura à superfície das nanopartículas	50
6.5.	Avaliação da citotoxicidade de nanopartícula de TiO ₂ (rutilo).....	54
6.5.1.	Avaliação da citotoxicidade por ensaio de vermelho neutro	56
6.5.2.	Avaliação da viabilidade celular.....	58
6.6.	Morfologia e contagem celular	62 63
6.7.	Avaliação da internalização celular	66
7.	DISCUSSÃO.....	68
7.1.	Análises de protetor solar comercialmente disponível	69
7.2.	Caracterização e dispersão de nanopartículas de rutilo.....	70
7.3.	Caracterização das nanopartículas de rutilo nos meios de cultura	73
7.4.	Estudos toxicológicos com células de pele humana	77
7.5.	Estudos de internalização das NPs nas células de pele	81
8.	CONCLUSÃO	84
9.	REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da área de nanotecnologia, em particular no que diz respeito à produção de nanomateriais, encontra-se em crescimento exponencial [1]. Devido a isso, novos produtos com componentes nanométricos, ou seja, utilizando nanopartículas, vêm sendo produzidos beneficiando áreas da indústria de engenharia e médica [2-3]. Como consequência, a exposição humana às nanopartículas é elevada e pode se originar de diversas fontes, tais como processos químicos, dispositivos médicos (implantes, próteses, sistemas de liberação controlada de fármacos), indústria alimentar, farmacêutica e de cosméticos [1,4-10].

Em 2011, o nome nanomaterial foi definido pela Comissão da União Europeia, como um material natural, incidental ou sintetizado, contendo partículas em um estado desagregado, agregado ou aglomerado, onde 50% ou mais da população apresentem uma ou mais dimensões externas, numa faixa de tamanho entre 1 a 100nm [11]. Uma vez nesta escala, as propriedades físicas e químicas destes nanomateriais, apresentam-se completamente diferentes quando comparadas com a escala micro e macrométrica [12].

Apesar de a nanotecnologia ter numerosas aplicações benéficas, o potencial impacto na saúde humana dos "nanomateriais" a longo prazo ainda é desconhecido e, portanto, ainda não se sabe o seu real efeito sobre a saúde da população. Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas que analisem o impacto de nanopartículas na saúde humana, assim como gerar regulamentação adequada que, até os dias atuais, ainda é insuficiente. Atualmente, os testes toxicológicos (*in vitro* e *in vivo*) aplicados a materiais macrométricos estão sendo avaliados para utilização dos nanomateriais. Contudo, estes testes nem sempre satisfazem as necessidades atuais, uma vez que, muitas destas nanopartículas, devido às suas propriedades físico-químicas e reatividade, interferem com os métodos de análises [12-14]. Adaptações aos métodos convencionais precisam ser realizadas, havendo também a necessidade de se desenvolver nova regulamentação para testes toxicológicos.

O contato entre as nanopartículas e o corpo humano acontece por meio de diferentes vias, entre elas podemos destacar os tratos gastrointestinal, respiratório e a pele [13]. A pele, por ser a maior superfície de contato entre os ambientes externo e interno, desempenha um importante papel em relação à entrada das nanopartículas no corpo humano. A pele é constituída por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (ou tecido subcutâneo) (Fig. 1) [15].

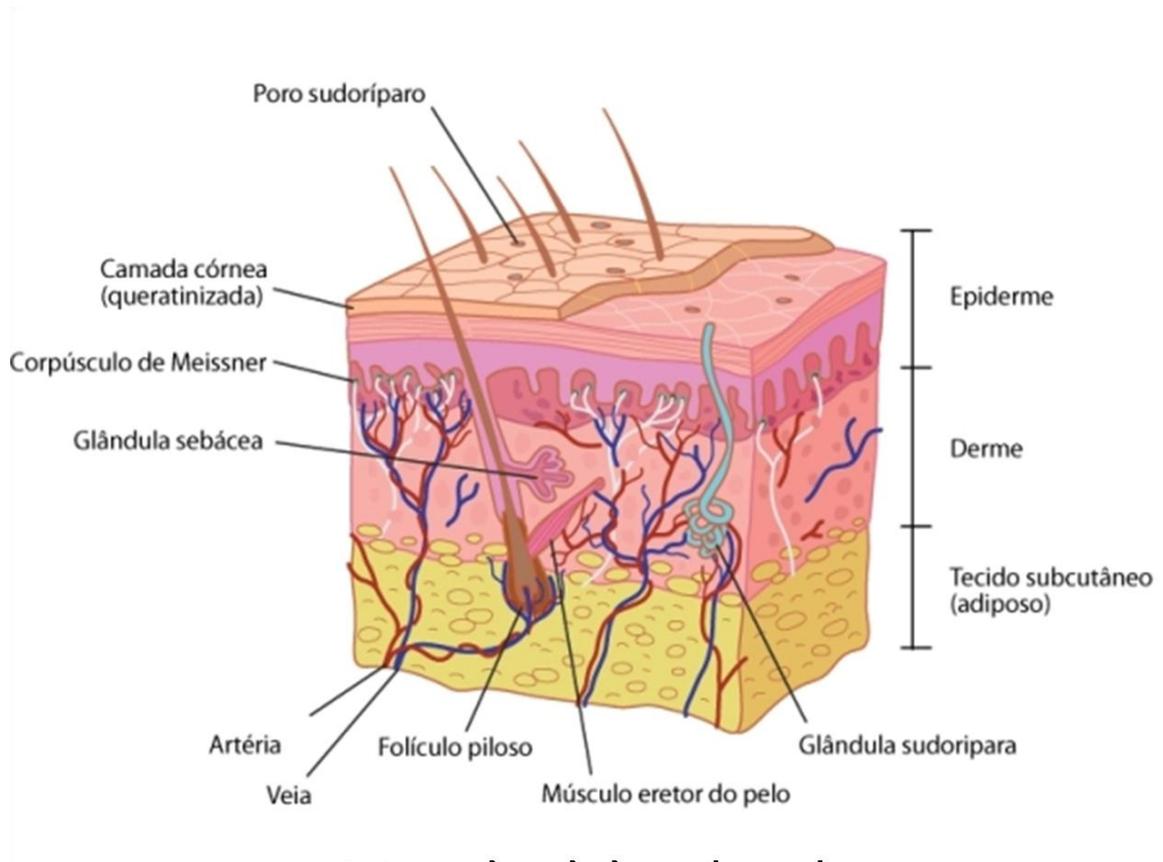


Figura 1. Camadas da pele: Epiderme, derme e hipoderme/ tecido subcutâneo.

A epiderme é a camada mais externa da pele, formada por tecido epitelial escamoso estratificado, não vascularizado mas inervado, sendo esta camada bastante dinâmica devido a sua constante renovação celular. Aproximadamente, 80% das células epiteliais são formadas por queratinócitos, os quais são responsáveis por produzir a queratina, uma proteína fibrosa que faz da epiderme uma camada protetora. No entanto, outras células também fazem parte desta

camada, como os melanócitos, que são responsáveis por produzirem a melanina (promovem a cor da pele) e as células de Langerhans, que fazem parte do sistema imunológico [15]. Considera-se que a epiderme é composta por quatro estratos: estrato germinativo, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo, os quais se diferenciam pela constituição celular e permitem a diferenciação de queratinócitos, da camada mais profunda para a superfície, onde ocorre a descamação. O estrato córneo é frequentemente submetido a situações de estresse à medida que essa barreira pode ser prejudicada [16].

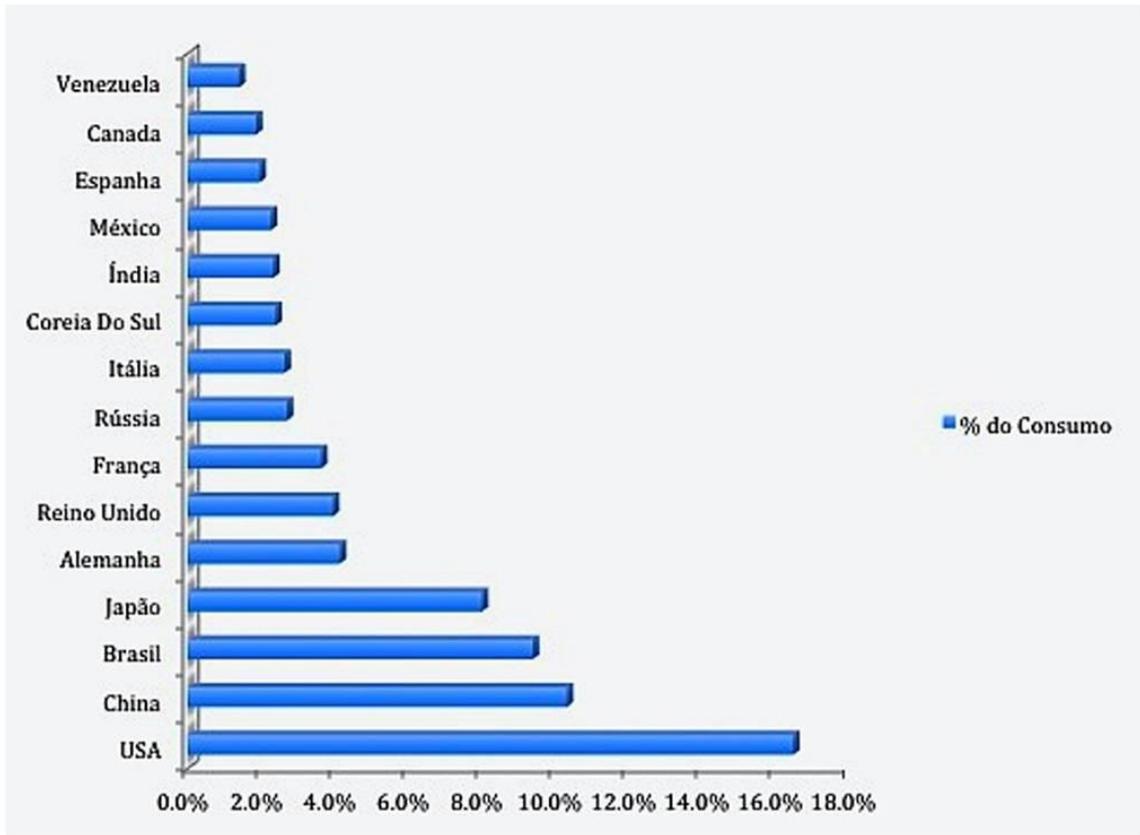
A derme é constituída por um tecido conjuntivo, apresentando uma grande variedade de tipos celulares e por uma abundante matriz extracelular, tais como os fibroblastos, as principais células que sintetizam diferentes macromoléculas que constituem a matriz extracelular [17-18]. Por sua vez, a epiderme e a derme encontram-se fixadas em uma camada composta por tecido adiposo, a hipoderme [19-20].

De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o tipo de câncer mais frequente no Brasil é o de pele, correspondendo a 30% de todos os diagnósticos de câncer no país. A cada ano são registrados 135 mil novos casos, tendo como principal causa a exposição excessiva ao sol. Ainda, de acordo com o INCA, para reduzir a incidência deste tipo de câncer, deve-se evitar a exposição excessiva ao sol, assim como proteger a pele da radiação solar [21].

Muitos cosméticos são utilizados para reestabelecer as propriedades normais da pele (dermocosméticos) e alguns, como os protetores solares, são utilizados para proteger a pele da radiação UV. Mundialmente, protetores solares utilizam com frequência, nas suas formulações, o óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂) [2,8,22-24]. A utilização do dióxido de titânio em fórmulas de filtros solares, deve-se a sua capacidade de refletir e espalhar raios UVB (290–320 nm) e UVA (320–400 nm) garantindo, assim, uma boa proteção contra a radiação solar [2, 8,22].

De acordo com a ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos), o Brasil ocupa o terceiro lugar no mercado mundial de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos ficando atrás, apenas, dos

Estados Unidos e China, como observado na figura 2 [25]. Entretanto, o Brasil ocupa o segundo lugar mundial do consumo de protetores solares, sendo responsável por cerca de 20% desse consumo no mundo e 82% na América Latina [25].



Fonte: Euromonitor Internacional, 2016

Figura 2. Ranking mundial de consumo de cosméticos: Brasil ocupa a terceira posição do *ranking* mundial de consumo de cosméticos.

O TiO_2 foi previamente classificado como uma partícula inerte e incapaz de ser absorvida pela pele [21]. Sendo assim, alguns autores defendem a ideia de que protetores solares que utilizam TiO_2 representam uma das melhores e a mais efetiva estratégia para a proteção da pele, devido ao seu baixo potencial de irritabilidade [26]. Em contrapartida, evidências recentes demonstram que partículas menores que 100 nanômetros podem penetrar na pele [27-28]. Uma vez absorvidas, estas podem ser transportadas aos demais órgãos causando possíveis danos ao fígado, rins,

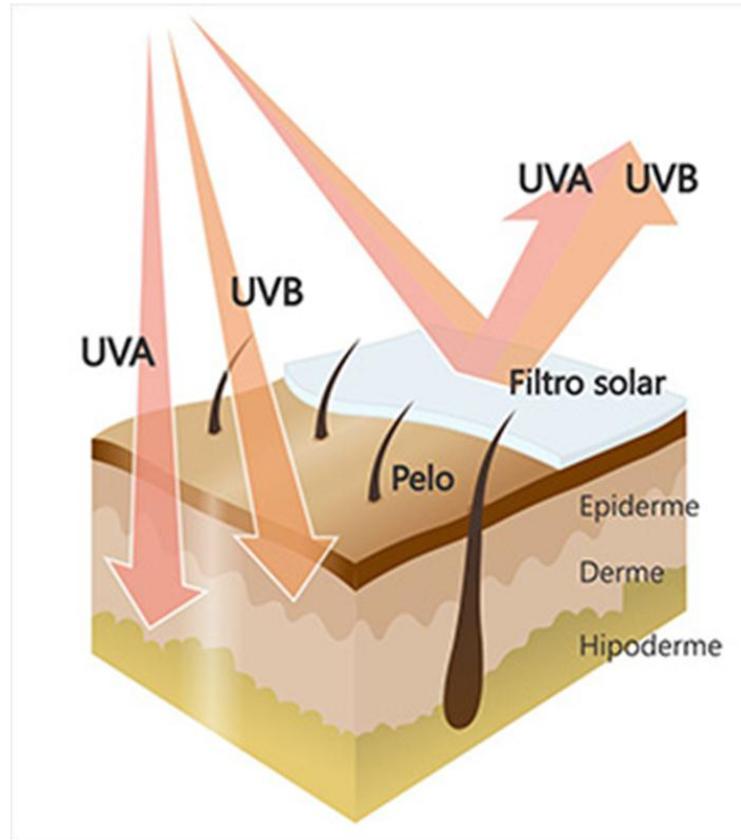
baço e pulmões, entre outros [27-30]. Dessa maneira, a utilização de nanopartículas em filtros solares tem sido alvo de investigações.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cosméticos - Protetor Solar

Protetores solares são produtos cosméticos utilizados com o objetivo de proteger a pele da radiação solar, reduzindo as chances de câncer de pele e envelhecimento cutâneo precoce [31-32]. Estes produtos estão entre as melhores medidas fotoprotetoras [33] uma vez que são capazes de bloquear a incidência da radiação ultravioleta.

Os filtros solares podem ser divididos em dois tipos, os orgânicos e os inorgânicos, variando de acordo com sua capacidade de adsorção ou reflexão da radiação. Os filtros solares orgânicos são essencialmente formados por compostos aromáticos com grupos carboxílicos. Estes absorvem as radiações ultravioletas e as transformam em radiações com energias menores, tornando-as inofensivas ao ser humano [34]. Entretanto, os filtros solares inorgânicos utilizam com frequência em suas formulações ZnO e TiO₂, pois são responsáveis por refletir e espalhar raios ultravioleta a partir de diferentes comprimentos de onda [35]. A figura 3 representa um esquema de como os protetores solares funcionam.



Fonte: www.quimicoweb.net

Figura 3. Esquema ilustrativo do funcionamento de um protetor solar.

Como já descrito, o TiO_2 foi previamente classificado como sendo inerte e incapaz de ser absorvido pela pele [21], e que devido a este fato, apresenta baixo potencial de irritabilidade, representando uma das melhores formas de proteger a pele [26].

No entanto, quando estes protetores solares foram criados, eles eram utilizados em escala micrométrica, sendo visíveis na pele como uma camada opaca, resultando na resistência dos consumidores em utilizar esses produtos. Com o avanço da nanotecnologia e com o intuito de solucionar este indesejável efeito visual, estes materiais vêm sendo utilizados em escala nanométrica uma vez que, na forma de nanopartículas, estes materiais se apresentam na forma transparente quando colocados na pele e ainda aumentam sua capacidade fotoprotetora [37].

2.2. Propriedades físico-químicas das nanopartículas de dióxido de titânio

O dióxido de titânio é um óxido metálico inorgânico que possui diferentes propriedades físico-químicas tais como: elevado índice de refração à luz visível, semicondutância fotossensível, baixa reatividade química e uma dureza acima da média dos materiais comuns [38-39]. Por ser um pigmento branco, brilhante e possuir elevada estabilidade química e mecânica, é muito utilizado na fabricação de corantes, papéis, plásticos, alimentos, medicamentos, cosméticos, entre outros [40].

Aproximadamente quatro milhões de toneladas deste pigmento são utilizados anualmente em todo o mundo, representando 70% do volume total de produção de pigmentos. Entre os produtos que utilizam nanomateriais, o TiO_2 está entre as cinco nanopartículas mais utilizadas [40].

O TiO_2 possui três estruturas cristalinas: anatase, rutilo e brookita. A forma rutilo é a mais termodinamicamente estável, resistente à água possuindo maior índice de refração. Deste modo, é a mais utilizada em protetores solares, uma vez que apresenta maior eficácia na proteção contra os raios solares [41]. Quando a mesma está na escala nanométrica, devido a sua elevada área de superfície de contato, torna-se transparente à luz visível, aumentando as suas propriedades de espalhamento e reflexão de raios ultravioleta [37].

A nanotecnologia tem como essência a habilidade de se trabalhar em nível atômico e molecular com o propósito de criar dispositivos, materiais e sistemas com propriedades e aplicações fundamentalmente novas. A diminuição do tamanho de uma partícula e a grande área de superfície dão origem a um grande número de propriedades diferentes daquelas encontradas nas de tamanhos micro e macrométricos. Entre as propriedades alteradas pode-se incluir, alterações no comportamento térmico, solubilidade, resistência do material, condutividade, atividade catalítica e propriedades ópticas [42-43].

As nanopartículas de TiO_2 , por apresentarem elevadas propriedades fotocatalíticas e hidrofílicas, tornaram-se populares em uma grande variedade de aplicações, como já citadas [9-10]. Embora as partículas de TiO_2 na escala

micrométrica tenham sido consideradas biologicamente inertes, a toxicidade das partículas de TiO₂ na escala nanométrica ainda está por ser definida.

Já está bem estabelecido que a resposta dos sistemas biológicos às nanopartículas de TiO₂ depende de suas características físico-químicas. Já foi relatado que o tamanho, forma, modificação de superfície, composição e estrutura cristalina das nanopartículas podem levar a diferentes consequências biológicas. Por exemplo, Chiara *et al.* (2016) demonstraram que a estrutura cristalina do rutilo induziu efeitos tóxicos em uma linhagem de fibroblastos de ratos (Balb/c 3T3), enquanto que na estrutura cristalina anatase esses efeitos não foram observados [44]. Mano *et al.* (2012) demonstraram que quando a superfície das nanopartículas de TiO₂ são revestidas por polietilenoglicol, há a redução significativa da citotoxicidade e alterações na expressão gênica, em células epiteliais de pulmão humano (NCI-H292) e em células de leucemia humana (THP-1) [45]. Também deve ser levado em consideração que o comportamento das nanopartículas, incluindo o seu estado de aglomeração e dissolução iônica, são características fundamentais, dependentes das condições de exposição e que por sua vez influencia diretamente os resultados celulares [13].

Portanto, como já citado, uma das vantagens de se utilizar partículas na escala nanométrica em protetores solares, seria proporcionar aumento da área de superfície de contato que, conseqüentemente, elevaria a proteção contra radiação solar [12]. Em contrapartida, a diminuição destas partículas para a escala nanométrica, aumentaria as chances de internalização das mesmas pela pele.

2.3. Corona proteica e iônica e sua correlação com o comportamento celular

Quando nanopartículas interagem com meios biológicos, elas inevitavelmente entram em contato com uma enorme variedade de biomoléculas, tais como diferentes proteínas [46]. Há evidências de que, quando as nanopartículas entram em contato com o meio biológico, muitas proteínas se adsorvem a sua superfície, formando uma proteína corona [47-50]. Também tem sido relatado que

essa corona modularia as interações com sistemas biológicos, influenciando a internalização, assim como o endereçamento das nanopartículas [51].

Tenzer *et al.* (2013) demonstraram que quando nanopartículas de poliestireno foram incubadas com plasma humano durante várias horas, houve a formação de uma proteína corona. Algumas das proteínas que estavam inicialmente em altas concentrações, diminuíram ao longo do tempo, enquanto outras proteínas se comportaram de forma oposta [52].

Ellingsen *et al.* (1991) demonstraram a formação de corona proteica e iônica, tais como a albumina e fibronectina e íons divalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} , à superfície das nanopartículas de TiO_2 usados em implantes dentários [53].

Como a formação de proteína corona é determinada pela competição de inúmeras proteínas para adsorverem na superfície das nanopartículas, alguns pesquisadores categorizaram as proteínas coronas como “Soft corona” ou “Hard corona”, uma vez que a “Soft corona” apresenta fraca interação com a superfície das nanopartículas, permanecendo adsorvidas durante um curto intervalo de tempo (de segundos a minutos). Em contraste, as “Hard corona” são representadas por proteínas fortemente ligadas e com alta afinidade à superfície das nanopartículas, permanecendo adsorvidas por períodos mais longos (horas) [54-55].

Contudo, os fenômenos de adsorção de proteínas não são os únicos a ocorrerem na superfície das nanopartículas. Recentemente, Ribeiro *et al.* (2016) revelaram a adsorção de íons e proteínas do meio de cultura à superfície das nanopartículas de TiO_2 (anatase), estrutura que designaram de bio-complexo. Estudos com osteoblastos primários demonstraram que estes bio-complexos funcionariam como um cavalo de Tróia (escondem as nanopartículas), facilitando a internalização de nanopartículas nas células [51].

Mingsheng *et al.* (2012) também demonstraram que as nanopartículas de ZnO e CuO (óxido de Cobre) formaram uma corona iônica por adsorção seletiva dos íons presentes no meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com soro fetal bovino (SFB) [46]. Embora alguns estudos comecem a aparecer, as questões de interface entre os nanomateriais e os sistemas biológicos

são complexas e bastante importantes para o comportamento celular, havendo a necessidade da sua exploração.

2.4. Estudos in vivo da citotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio em células da pele

A literatura demonstra que partículas de TiO_2 na escala micrométrica são biologicamente inertes tanto para os seres humanos como para os animais, existindo evidências de que não penetram na pele [34]. Contudo, uma penetração de partículas na escala nanométrica na pele poderia ser facilitada quando a função da barreira proporcionada pela pele está comprometida, tal como em casos de cicatrização e queimaduras do sol. De fato, Monteiro-Riviere *et al.* (2011) demonstraram que a penetração de nanopartículas de TiO_2 utilizadas em protetores solares, foi ligeiramente aumentada na pele danificada, em modelos *in vivo* de porcos [56].

A penetração de nanopartículas de TiO_2 através da pele tem sido investigada por um grande conjunto de estudos *in vitro* e *in vivo*. A maioria dos estudos indica uma aparente incapacidade de nanopartículas de TiO_2 alcançarem as células da derme. Sadrieh *et al.* (2010) analisaram a correlação entre as diferentes formas de TiO_2 e a absorção percutânea em mini porcos demonstrando que, independentemente da forma, após uma exposição sub-crônica, as nanopartículas foram encontradas no estrato córneo, mas não nos estratos epidérmicos mais profundos [57]. Pflucker *et al.* (1999) fez um estudo utilizando as três estruturas cristalinas de TiO_2 , aplicadas em áreas da pele do antebraço humano, demonstrando que foram detectadas partículas apenas sobre a camada mais externa do estrato córneo, independente da superfície química, tamanho e forma [58]. No entanto, Filipe *et al.* (2009) verificaram que as nanopartículas de TiO_2 presentes nas formulações de filtro solar não foram capazes de penetrar no estrato córneo, contudo a deposição de nanopartículas foi observada nos folículos pilossebáceos [59].

Estudos *in vivo* em modelos suínos e de camundongos mostraram que as nanopartículas de TiO₂ aplicadas topicamente na pele durante um longo período podem induzir envelhecimento da pele, sugerindo que a exposição prolongada a nanopartículas pode representar um risco para a saúde dos seres humanos [60]. Tan *et al.* (1996) demonstraram penetração percutânea de TiO₂ em pacientes submetidos a aplicações subcrônicas de protetor solar que apresentava em sua formulação nanopartículas de TiO₂ [61].

Após a penetração na pele, as nanopartículas podem seguir diferentes caminhos, incluindo os transportes transcelulares e paracelulares, bem como o transporte facilitado pelos folículos pilosos [59-60]. As nanopartículas podem também atingir a corrente sanguínea e então se translocar para vários tecidos e órgãos [62-65], representando um potencial risco para a saúde humana.

2.5. Estudos *in vitro* da citotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio em células da pele

A palavra citotoxicidade é definida como a capacidade de determinada substância química, produto ou conjunto de substâncias causarem alterações tóxicas às células [13]. Os resultados dos estudos que investigaram a toxicidade de nanopartículas de TiO₂, até o momento, são contraditórios. A única conclusão clara dos estudos coletivos sobre a toxicidade do TiO₂ é que a estrutura cristalina, tamanho de partícula e estado de aglomeração das nanopartículas desempenham um papel crucial na determinação da sua toxicidade [66-67].

Cynthia *et al.* (2014) mostraram, através de estudos *in vitro*, que as nanopartículas de TiO₂ não induziram citotoxicidade após 24 horas de exposição, em cultura primária de fibroblastos de pele humana [68]. Em contrapartida, em estudos *in vitro* com diferentes linhagens celulares, demonstraram que as nanopartículas de TiO₂ podem induzir toxicidade, estresse, inflamação, transdução de sinal e modificações genéticas [67-68]. Os possíveis mecanismos de toxicidade incluem o estresse oxidativo, onde as partículas de TiO₂ que possuem atividade de

radical hidroxila desencadeariam a formação de espécies reativas de oxigênio [68-69]. Shukla *et al.* (2011) confirmaram o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no estresse oxidativo nos tecidos ou danos ao DNA, em células epidérmicas humanas e HaCaT (linhagem de queratinócitos de pele humana adulta) [70]. A relação entre as nanopartículas de TiO₂ e o dano ao DNA nos fibroblastos dérmicos humanos também já foi descrita [71].

Jaeger *et al.* (2012) descreveram que as células HaCaT (linhagem de queratinócitos de pele humana adulta) quando expostas a nanopartículas de TiO₂, eram induzidas a "deleção comum" mitocondrial. Além disso, esse nanomaterial exibiu citotoxicidade mediada por espécies reativas de oxigênio e potencial genotóxico [72]. Yin *et al.* (2012) também demonstraram que as nanopartículas de TiO₂ seriam fototóxicas para os queratinócitos da pele humana e que esta fototoxicidade seria mediada por espécies reativas de oxigênio, geradas durante a irradiação UVA [73].

Além disso, Ghiazza *et al.* (2014) verificaram que a citotoxicidade e a genotoxicidade mediadas por espécies reativas de oxigênio devido a nanopartículas de TiO₂ em células de queratinócitos humanos poderia ser inibida com a presença de ferro. Eles sugeriram que a impregnação com sais de ferro pode ser uma estratégia promissora para reduzir este tipo de citotoxicidade e genotoxicidade [74].

Por outro lado, Park *et al.* (2011) obtiveram resultados opostos sobre a fototoxicidade de nanopartículas de TiO₂ e seus resultados demonstraram que as partículas de TiO₂ não induziram fototoxicidade, irritação ou sensibilização em células da pele [75]. Tucci *et al.* (2013) relataram que após tratamento com 100 mg/mL de TiO₂ durante 24 horas, as células HaCaT mostraram a ativação de estresse celular e redução da capacidade metabólica [76].

Embora muitos trabalhos tenham sido conduzidos em uma variedade de tipos celulares, poucos estudos têm investigado o efeito de nanopartículas de TiO₂ na fase cristalina rutilo em células da pele humana. Além disso, a maioria desses estudos relata o uso de partículas na escala micrométrica e não exploram as interações de corona proteica e iônica e nem as correlacionam com o

comportamento celular, tornando-se completamente desconhecido o potencial impacto dos nanomateriais para a saúde humana.

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral contribuir para a compreensão dos efeitos de citotoxicidade das nanopartículas de dióxido de titânio utilizadas em protetores solares.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar as propriedades físico-químicas de nanopartículas de TiO_2 presentes na formulação de protetores solares.
- 2) Avaliar o potencial citotóxico de nanopartículas de TiO_2 em células de pele humanas.
- 3) Correlacionar as nanopartículas com as características das nano biointerface (nanopartículas - células).
- 4) Estudar a internalização celular das nanopartículas.

5. METODOLOGIA

5.1. Protetor solar comercialmente disponível

Este estudo selecionou um protetor solar comercial (SPF \geq 50), que menciona a utilização de dióxido de titânio em sua formulação. Para observar as nanopartículas, o protetor foi diluído em etanol 100% (3: 7) e 10 μ L desta suspensão foi colocada sobre grades de cobre revestidas com Formvar. A caracterização das nanopartículas foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão (MET - Microscópio Eletrônico, TITAN 80–300, FEI, Holanda, operado em 300 kV). O protocolo de caracterização realizado foi baseado na literatura [83].

5.2. Nanopartículas de dióxido de titânio

As nanopartículas de dióxido de titânio em pó seco (Skyspring Nanomateriais, EUA, Produto No.7920DL) apresentando tamanho primário das partículas entre 10-30 nm, foram adquiridas pela empresa NAMUR com o objetivo de mimetizar as nanopartículas empregadas nos protetores solares.

5.3. Caracterização físico-química das nanopartículas de rutilo

Foi preparada uma suspensão das nanopartículas de rutilo em água ultrapura (sistema de Milli-Q) que foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão de alta resolução (JEOL 2100F, Holanda, operado a 200 kV). Análises das micrografias obtidas revelaram a morfologia, tamanho e estrutura cristalina (difração de elétrons no mesmo microscópio eletrônico) das nanopartículas.

5.4. Otimização de um protocolo de dispersão de nanopartículas

Duas estratégias foram empregadas neste trabalho para as dispersões de nanopartículas em meios biológicos: (1) dispersão por sonicação das nanopartículas em meio aquoso e (2) introdução da dispersão aquosa de nanopartículas, estabilizadas com agente estabilizante, em meio de cultura.

5.4.1. Dispersão em água

Para a dispersão das nanopartículas foi utilizado um ultrassom de modo indireto (Q-Sonica 700W, EUA), que emprega o método de cavitação para facilitar a ruptura dos aglomerados e formar agregados na escala nanométrica. Foram realizados testes com diferentes concentrações (1, 5, e 10 mg/mL) de nanopartículas de TiO₂ em diferentes amplitudes e tempos de sonicação. Todas as dispersões foram realizadas em banho de água com gelo, a fim de evitar o aquecimento da amostra e estabilizadas por 24 horas. O tamanho das nanopartículas foi determinado por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) em um *Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments GmbH, Alemanha)* e Microscopia Eletrônica de Transmissão (JEOL 2100F, Holanda, operado a 200 Kv). As medidas de DLS foram realizadas à temperatura de 25°C utilizando *cuvettes* de polistireno descartáveis de 10 milímetros. Para cada condição testada, as medidas por DLS foram realizadas em triplicada.

5.4.2. Dispersão em meio de Cultura

Após obter a melhor condição de dispersão de nanopartículas em água ultrapura (concentração de 10 mg/mL, 30% de amplitude e 15 minutos no modo pulsado), os testes com meio de cultura foram realizados. A solução estoque com 10 mg/mL de rutilo, estabilizado 24 horas após a dispersão, foi diluída para uma concentração de 1 mg/mL em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Cat. 0000378377)* suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino

(FBS -Gibco, Cat. 12657029), *Keratinocyte Growth Medium* (KGM, Lonza, Cat. 0000444755) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de bovino e *Keratinocyte Growth Medium* sem suplemento. Albumina de soro bovino (BSA, fração V, Sigma Aldrich, Cat. 904846-8) foi utilizada como agente estabilizante durante a otimização do protocolo de dispersão de nanopartículas em meio de cultivo.

A caracterização da dispersão nos diferentes meios de cultivo foi realizada por DLS. Diferentes concentrações de BSA (controle (0 mg/mL), 0,6 mg/mL, 18,8 mg/mL e 75,2 mg/mL) foram testadas nas nanopartículas antes de serem adicionadas ao meio de cultura. Após sonicação e diluição em meio de cultura, cada amostra foi caracterizada por DLS e por MET.

5.5. Caracterização da nano-bio interface

5.5.1. Adsorção de íons

As suspensões de nanopartículas em meio de cultivo foram analisadas por Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), acoplado a um Microscópio Eletrônico de Transmissão de alta resolução (HRTEM, Microscópio Eletrônico, FEI, Holanda, operado a 200 kV). Os mapas de EDS das nanopartículas foram obtidos no modo de Microscopia Eletrônica de Varredura (STEM).

5.5.2. Adsorção de proteínas

As amostras com 100 µg/mL de nanopartículas de rutilo diluídas em DMEM suplementado com 10% de SFB e KGM suplementado com 10% de SFB foram incubadas durante 1 hora a 37°C e 5% de CO₂. Após, as amostras foram centrifugadas (Beckman Coulter, Avanti J-26 XP) a 38,400xg, por 1 hora a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lavados 3 vezes com PBS (“Phosphate buffered saline”) 0,01M. Após a lavagem, os *pellets* foram ressuspensos em 200 uL de tampão 1X (Tris-HCl 0,0625 M, SDS a 2,5%, 5%

2-mercaptoetanol, 7% de glicerol (estoque)) e as amostras foram congeladas a -20°C.

❖ Dodecil sulfato de sódio (SDS) em gel de poliacrilamida (PAGE)

A adsorção de proteínas, a partir de suspensões de rutilo diluídas em meio de cultura, foram investigadas por SDS-PAGE. As amostras foram fervidas durante 10 minutos a 100°C e corrida em um gel de poliacrilamida-bis *RUNNING* 7,5% e *STOCKING* 5%. Uma corrente de 120V foi aplicada para separar as proteínas pelo peso molecular. Ao final, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* 1% (Bio-Rad, cat. 161-0406).

❖ Espectrometria de massas

As bandas de proteínas identificadas pela SDS-PAGE foram seccionadas e digeridas por tripsina. A redução de proteínas foi realizada por DTTmM (30 minutos, a 25°C) e alquilação de cisteínas com iodoacetamida (50mM, a 25° C, por 30 minutos no escuro). Em seguida, foi realizada digestão enzimática utilizando 0,2µg de tripsina (Promega, Cat. V5111) diluída em bicarbonato de amônio (50Mm, a 30 minutos em gelo, *overnight* a 37°C). A mistura de peptídeo extraída foi liofilizada em 1% de ácido fórmico e foi transferida para a *StageTip* (C18). Após secagem das amostras, foi adicionado 25 µL de ácido metanoico (1%). As amostras foram analisadas em um Espectrômetro de Massas (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA) acoplado a um sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem, West Palm Beach, FL, EUA) através de uma fonte de *nanoelectrospray* de *Proxeon*. Os peptídeos foram separados em um gradiente de 2-90% de acetonitrila em 1% de ácido metanoico em uma coluna analítica PicoFrit (20 cm x ID75 µm, tamanho de partícula 5 µm), com um fluxo de 300 nL/min durante 27 minuto. A tensão do *nanoelectrospray* e a temperatura foram ajustadas para 2,2kV e 275°C, respectivamente. O método configurado para o *LTQ Orbitrap Velos* foi a análise dependente de dados (ADD). Os espectros de varredura do SM (m / z 300-1600)

foram adquiridos no analisador Orbitrap após acumulação para um valor alvo de 1 e 6 e a resolução no Orbitrap foi ajustada para $r = 60.000$. Com isso, os 20 íons peptídicos mais intensos com estados de carga ≥ 2 foram sequencialmente isolados para um valor alvo de 5.000 e fragmentados na armadilha linear de íons por CID de baixa energia (energia de colisão normalizada de 35%). O limite de sinal para acionar um evento SM/SM foi ajustado para 1.000 contagens. A exclusão dinâmica foi ativada com uma lista de tamanho de 500 e a duração de exclusão foi de 60 seg. O valor de Q de ativação foi de 0,25 e o tempo de ativação foi de 10 ms. Os dados foram obtidos utilizando o pacote de software *Xcalibur* as amostras foram analisadas em três repetições biológicas.

As listas de picos (msf) foram geradas a partir de arquivos contendo dados brutos usando o *Proteome Discoverer*, versão 1.3 (Thermo Fisher Scientific) com o mecanismo de busca *Sequeste* pesquisado contra *otaxonbovino* da base de dados *UniProtKB/SwissProt* (release 2016_04) com carbamidometilação como modificação fixa. O *Software* (versão Scaffold_4.5.1, Proteome Software Inc., Portland, OR) foi utilizado para validar as identificações de peptídeos e proteínas baseadas em SM/SM. As identificações de peptídeos foram aceitas quando se pode estabelecer uma probabilidade superior a 99,0% para se conseguir um FDR inferior a 1,0% pelo algoritmo de FDR local de Scaffold. As identificações de proteínas foram aceitas quando se pôde estabelecer uma probabilidade superior a 80,0% para atingir um FDR inferior a 1,0% e continham pelo menos um peptídeo identificado. As probabilidades de proteína foram atribuídas pelo algoritmo *Protein Prophet*.

5.6. Culturas de células primárias em monocamada

As culturas de fibroblastos e queratinócitos primárias foram cedidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As mesmas ficaram acondicionadas em ampolas de congelamento e mantidas em nitrogênio líquido. Após descongelamento, as células foram expandidas em frascos de cultura celular de 25 e/ou 75cm². O meio de cultura *DMEM* suplementado com 10% SFB foi utilizado para cultivar fibroblastos e KGM suplementado com 10% SFB e sem soro foram utilizados para cultivar

queratinócitos. Após plaqueadas, as células foram mantidas em uma incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, à temperatura de 37°C. Testes de esterilidade, para identificação de bactérias, fungos e micoplasma foram realizados no começo e no término de todos os processos. Todas as imagens de morfologia celular foram obtidas em um microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100), utilizando o programa de imagens (Leica Applications Suites – LAS EZ).

5.7. Avaliação da citotoxicidade de nanopartícula de TiO₂ (rutilo)

5.7.1. Avaliação da citotoxicidade por ensaio de vermelho neutro

Para o teste de viabilidade celular, foi seguido o *guia* da OECD 129 (*Organisation for Economic Co-operation and Development–Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests*) que utiliza o ensaio de vermelho neutro. As células foram plaqueadas em 96 poços e expostas por 48 horas a diferentes concentrações de nanopartículas como descrito no guia. As placas foram incubadas em uma incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, à temperatura de 37°C por 48 horas após exposição às nanopartículas. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e 200 µL de solução de formaldeído (0,5%, v/v) em CaCl₂ (1%) foi adicionada a cada poço da placa teste. Após 10 minutos, o sobrenadante foi retirado novamente e 100 µL de solução de álcool ácido (50% v/v de etanol, 49% de água ultrapura e 1% v/v de ácido acético) foram adicionados a cada poço. A absorbância foi lida em um espectrofotômetro (Nano Drop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc, MA, EUA), utilizando-se um laser com comprimento de onda de 540nm.

5.7.2. Avaliação da citotoxicidade por citometria de fluxo

A viabilidade celular foi realizada por citometria de fluxo após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas de rutilo (controle, 10 µg/mL, 46,4 µg/mL e 100 µg/mL), utilizando o *kit LIVE/DEAD* (Thermofisher Scientific

INC. Lote: L3224). Utilizamos a Anexina V para marcação de células apoptóticas e Iodeto de Propídio (PI) para células necróticas. As células foram lavadas 3 vezes com PBS 0,01M e, em seguida, foram incubadas com Tripsina 0,125% por 5 minutos. A tripsina foi bloqueada com a adição de meio de cultivo com 10% SFB e as células foram dissociadas em força mecânica. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 500g, o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de solução tampão (disponível no kit) e incubadas por 15 minutos antes da leitura com 3 µL de Anexina V e 1 µL de PI.

Além da viabilidade celular, análises do ciclo celular também foram realizadas através da avaliação do conteúdo de DNA, uma vez que estas análises são utilizadas na identificação das variações no conteúdo genético das células, fornecendo informações sobre as anormalidades cromossômicas. Para esta análise as células foram lavadas 3 vezes com PBS 0,01M e, em seguida, foram incubadas com Tripsina 0,125% por 5 minutos. A tripsina foi bloqueada com a adição de meio de cultivo com 10% SFB e as células foram dissociadas com força mecânica. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 500g, o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de PBS e incubadas por 15 minutos antes da leitura com 400 µL do reagente Vindeló's (100 mL de Tris Buffered Saline, 1 mg de Ribonuclease A e 7,5 mg de Iodeto de Propídio). A leitura foi realizada por um citômetro FACS Aria™ (BD Biosciences, EUA). Cada experimento foi realizado em triplicata, com células de 3 diferentes pacientes. A análise dos dados foi realizada no *software* FlowJo 10.0.7 (TreeStar).

5.8. Avaliação da internalização de nanopartículas

Após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas (controle (0 µg/mL), 10 µg/mL e 100 µg/mL), as células foram fixadas em 2,5% (v/v) de glutaraldeído por 1 hora, pós-fixadas durante 15 minutos em 1% de OsO₄ (tetróxido de ósmio), desidratadas em acetona e incluídas em Epon. As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila a 10% e citrato de chumbo a

5% e observadas em um microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai Spirit G2, FEI, Eindhoven, Holanda).

5.9. Análise estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata. Uma resposta de 100% considerou-se para os controles não tratados (isto é, 100% de viabilidade). Médias e desvios padrão foram calculados e as significâncias estatísticas foram avaliadas pelo teste t (Sigma Plot) com $p < 0,005$.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização físico-química de um protetor solar, disponível comercialmente

Em um primeiro momento, o tamanho das partículas, a forma e a composição química de um filtro solar que apresenta nanopartículas de dióxido de titânio em sua formulação, foram investigados combinando Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) com Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raio-X (EDS). O motivo desta análise foi observar como se encontravam as nanopartículas no filtro solar e qual o seu estado de aglomeração. Nas figuras 4a e b, é possível observar que o filtro solar em análise é constituído por aglomerados de nanopartículas com diferentes dimensões, alguns na escala micrométrica e outros na escala nanométrica. De forma complementar, para confirmar que as nanopartículas observadas eram de TiO_2 , foi realizado um mapeamento da amostra por EDS (Fig. 4c). Confirmamos que o filtro solar analisado no presente trabalho é principalmente constituído por nanopartículas de dióxido de titânio.

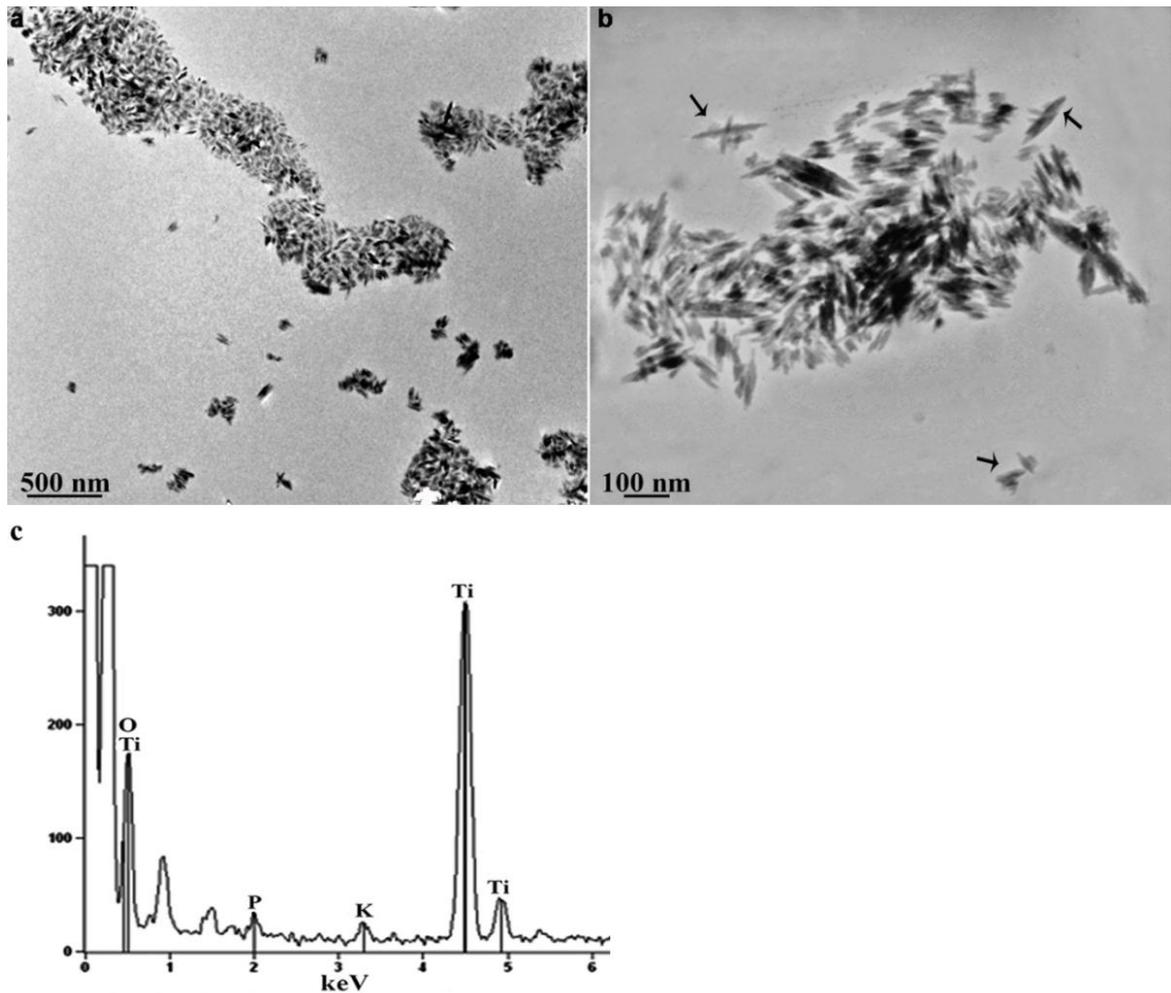


Figura 4. Caracterização das nanopartículas presentes no protetor solar: Imagens de MET: (a) Visão geral dos aglomerados de nanopartículas, (b) um agregado de nanopartículas e (c) EDS, que confirma que os aglomerados observados são de dióxido de titânio. Setas indicam pequenos agregados de nanopartículas, na escala nanométrica.

Com o intuito de contribuir para a avaliação de potenciais riscos para a saúde humana associados aos cosméticos que contenham nanopartículas de TiO_2 , em uma fase tão precoce quanto possível, nanopartículas de TiO_2 em pó seco foram adquiridas comercialmente. Estas nanopartículas foram utilizadas de modo a mimetizar as nanopartículas empregues nos protetores solares.

A maioria dos artigos avalia o efeito citotóxico de aglomerados de nanopartículas na escala micrométrica, contudo, neste trabalho tivemos como objetivo investigar a citotoxicidade de nanopartículas na escala nanométrica em

células da pele, na medida em que no filtro solar foram encontrados aglomerados nanométricos.

6.2. Caracterização físico-química e dispersão de nanopartículas de dióxido de titânio (fase cristalina - rutilo)

A segunda etapa do trabalho foi realizar a caracterização físico-química das nanopartículas de dióxido de titânio (rutilo) quando em contato com meio aquoso. A figura 5a demonstra aglomerados de nanopartículas de TiO_2 . Nas micrografias de MET observamos partículas individuais de aproximadamente 21 nm (Figs. 5b e c), confirmando o tamanho primário das nanopartículas, tal como descrito pelo fabricante. A estrutura cristalina, rutilo, das nanopartículas de TiO_2 foi confirmada por difração de elétrons (Figura 5d).

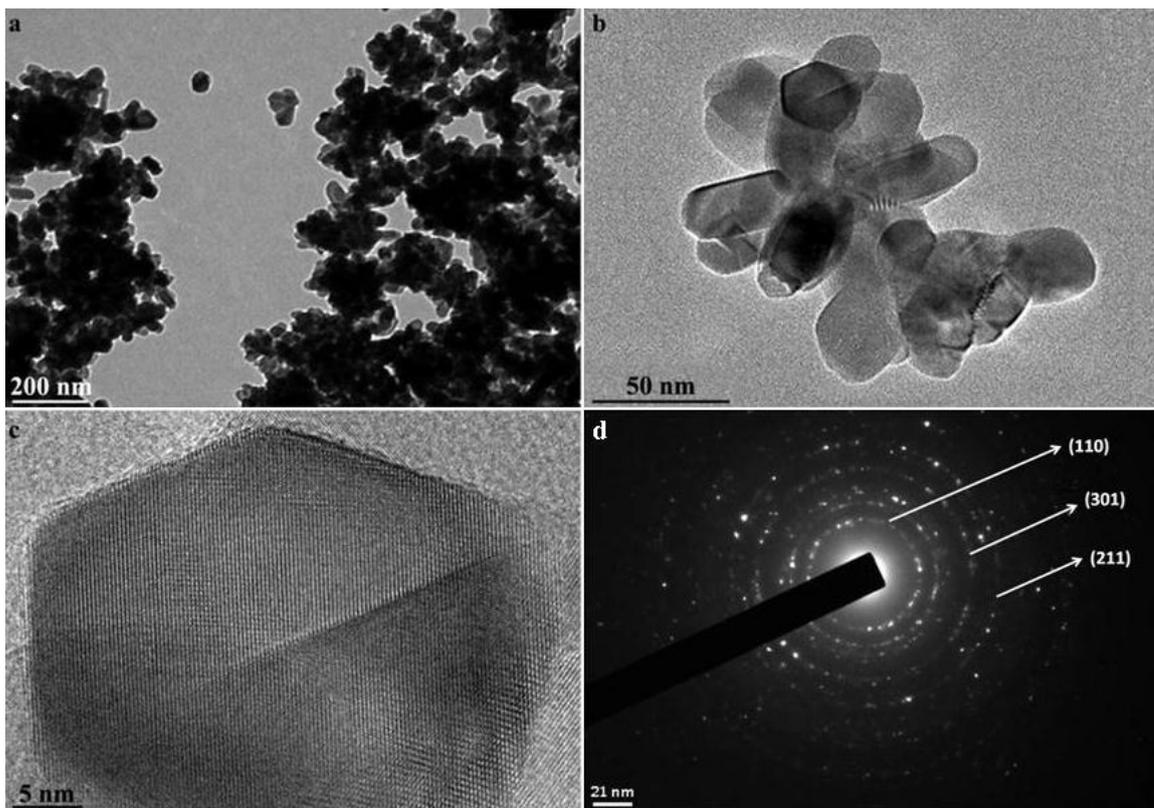


Figura 5. Caracterização físico-química de nanopartículas de rutilo: Micrografias de MET mostrando uma visão geral **(a)** dos aglomerados de nanopartículas, **(b)** um agregado de nanopartículas, onde se observa a morfologia primária de cada nanopartícula e **(c)** em um maior aumento, uma nanopartícula com sua configuração paracristalina e **(d)** padrão de difração de elétrons

indicando a fase cristalina rutilo. Note que as faces apresentadas (110), (211) e (301) são características de nanopartículas de rutilo.

Quando a solução de nanopartículas de TiO_2 (rutilo) em meio aquoso sem dispersão foi caracterizada pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), observou-se um tamanho médio de $477,7 \pm 25,2$ nm. Este resultado confirma a hipótese de que quando os nanomateriais entram em contato com meios aquosos, tendem a se aglomerar.

Na tentativa de reduzir o tamanho dos aglomerados de TiO_2 , utilizamos um sistema de ultrassom considerado um dos procedimentos-padrão para dispersar os nanomateriais em estudos toxicológicos.

Existem dois tipos de sistemas de ultrassom, o que usa modo direto e o de modo indireto (ver Figura 6).

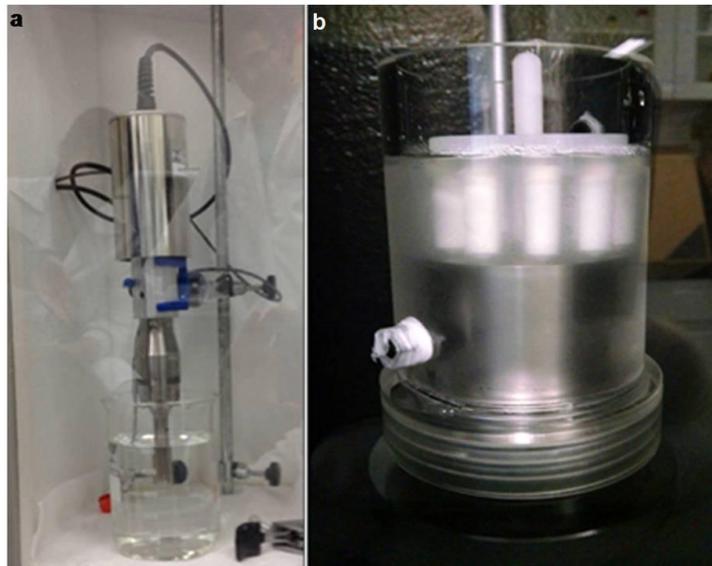


Figura 6. Sistemas de dispersão: (a) Sistema Direto: a sonda fica em contato direto com a amostra resultando em contaminação e (b) sistema indireto, a sonda fica em contato com um sistema de *ependorfs* evitando qualquer tipo de contaminação.

No presente estudo, foram preparadas suspensões aquosas de nanopartículas de rutilo, utilizando um sonicador de modo indireto, e posteriormente a caracterização do tamanho das nanopartículas foi realizada por DLS e MET.

As variáveis que permitem ser ajustadas num protocolo de dispersão podem ser: (1) a concentração da solução estoque, (2) amplitude, (3) tempo, (4) modo (contínuo ou pulsado). Desta forma, foram realizados diferentes testes de modo a definir um protocolo de dispersão para o rutilo com o menor tamanho médio possível dos aglomerados. Os seguintes testes foram realizados:

- **Variação da concentração da solução estoque e amplitude**

Com o intuito de observar o efeito da concentração e da amplitude de sonicação, um tempo de 5 minutos foi escolhido (Fig. 7). Notamos que para todas as concentrações testadas a mais elevada (10 mg/mL) permitiu a obtenção de um menor diâmetro médio dos aglomerados. Após o estabelecimento da concentração em 10mg/mL, o efeito da amplitude foi testado. Na sonicação com amplitude de 30% alcançamos um menor diâmetro médio de nanopartículas, assim como melhor índice de polidispersão (PDI). O PDI fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos e estabilidade (quanto mais próximo o valor do PDI estiver de zero mais homogeneia e estável é a dispersão). Com estes ensaios ficou definido que as sonicações das nanopartículas de rutilo seriam realizadas com 30% de amplitude e com 10mg/mL de concentração estoque.

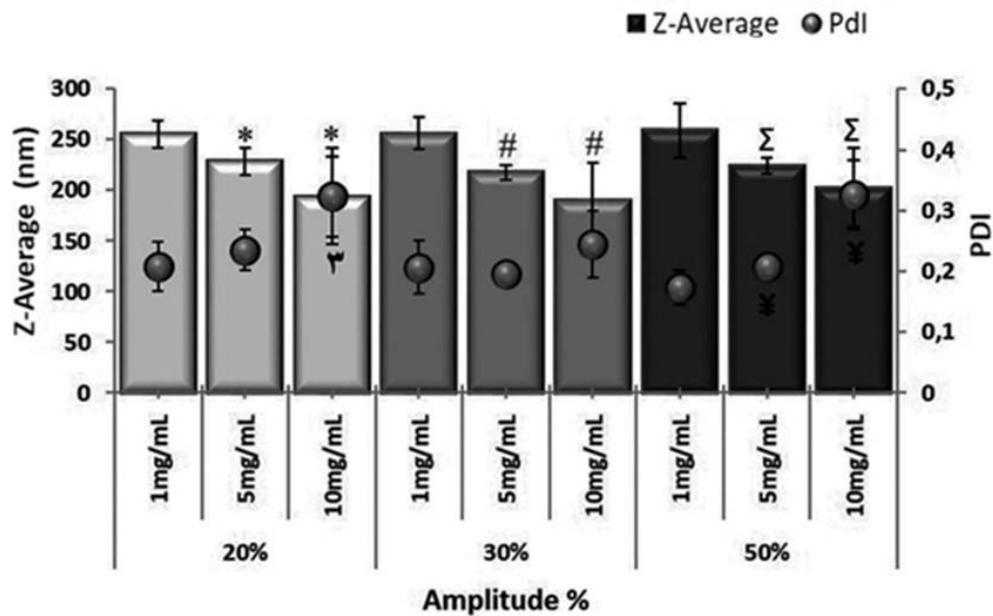


Figura 7. Protocolo de dispersão de nanopartículas em água: Protocolo de dispersão de nanopartículas em água: Gráfico com o diâmetro médio dos aglomerados (Z-average) e índice de polidispersão (PDI) obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico de Luz (DLS) das diferentes concentrações e amplitudes de sonicação. Os resultados são a média \pm SEM de três experimentos independentes. Z-Average: * $P < 0,05$ vs controle (1 mg/mL em 20%); # $P < 0,05$ vs controle (1 mg/mL em 30%); Σ $P < 0,05$ vs controle (1 mg/mL em 50%), PDI: ¶ $P < 0,05$ vs controle (1 mg/mL em 20%); ¶ $P < 0,05$ vs controle (1 mg/mL em 50%). Observe que para a concentração de 10 mg/mL em todas as amplitudes testadas o tamanho médio dos aglomerados foi menor, e para a amplitude de 30%, o valor de PDI foi menor.

Com a finalidade de reduzir o tamanho dos aglomerados de nanopartículas e evitar o aquecimento da amostra, diferentes tempos de sonicação foram testados utilizando a concentração e amplitude já definidas.

- **Tempo e modo de dispersão**

O rápido aquecimento da amostra pode gerar alteração nas propriedades físico-químicas das nanopartículas. De modo a evitar o aquecimento das nanopartículas, as sonicações foram realizadas em modo pulsado (80% de modo

pulsado). Na figura 8a estão apresentados os resultados dos diferentes tempos de sonicação testados. Como é possível verificar, quanto mais longo é o tempo de sonicação, menor é o tamanho médio dos aglomerados.

Ficou definido com estes últimos testes que as condições de dispersão de rutilo para uma concentração estoque de 10mg/mL é de 30 % de amplitude durante 15 minutos em modo pulsado. Tendo como base estes parâmetros, os resultados indicaram através das análises por DLS que a dispersão de nanopartículas de rutilo em água apresenta um diâmetro médio de $142,1 \pm 5,6$ nm e estes tamanhos estão de acordo com os resultados obtidos por MET (Fig.8b).

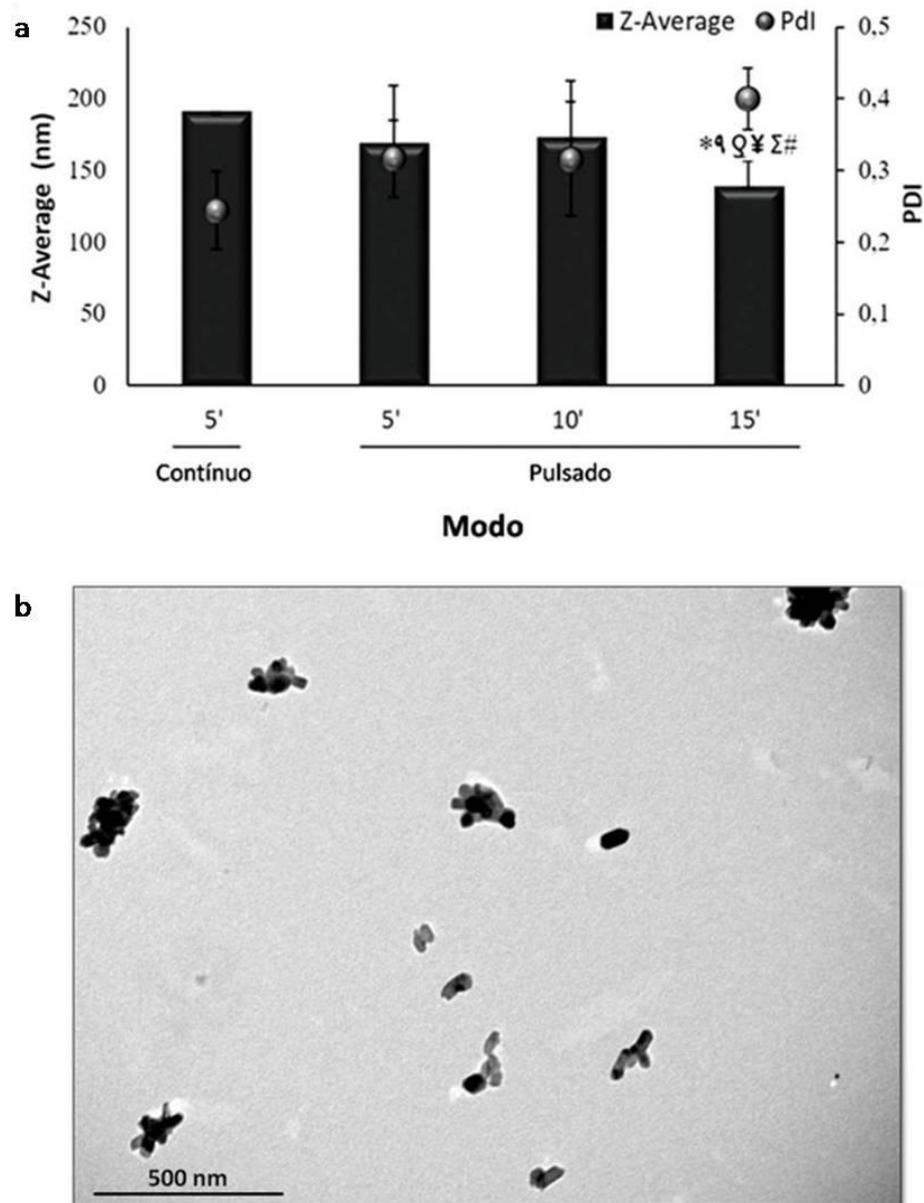


Figura 8. Protocolo de dispersão de nanopartículas em água: (a) Gráfico com o diâmetro médio dos aglomerados (Z-average) e índice de polidispersão (PDI) obtidos pela técnica de espalhamento dinâmico de Luz (DLS) dos diferentes tempos de sonicação e (b) MET das nanopartículas de rutilo dispersas com o protocolo final de dispersão (10mg/mL e 30 % de amplitude durante 15 minutos em modo pulsado). Os resultados são a média \pm SEM de três experimentos independentes. Z-Average: * $P < 0,05$ vs controle (5 min em modo contínuo); $qP < 0,05$ vs controle (5 min em modo pulsado); $qP < 0,05$ vs controle (10 min em modo pulsado), PDI: $\text{¥}P < 0,05$ vs controle (5 min em modo contínuo); $\Sigma P < 0,05$ vs controle (5 min modo pulsado); $\#P < 0,05$ vs controle (10 min modo pulsado). Note que para a concentração de 10 mg/mL, utilizando 30 % de amplitude durante 15 minutos em modo pulsado foi obtido um menor tamanho médio hidrodinâmico, que pode ser confirmada pela imagem de MET.

Testes de estabilidade demonstraram que 24 horas após a sonicação, o PDI diminuiu em média de 0,4 para 0,25, como observado na figura 9.

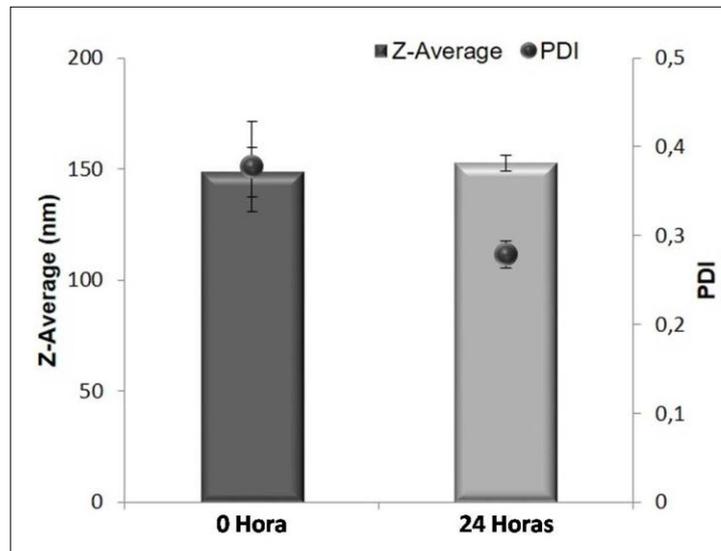


Figura 9. Estabilidade da dispersão: Diâmetro médio dos aglomerados (Z-average) e índice de polidispersão (PDI) após dispersão (0 hora) e após 24 horas de dispersão. Os resultados são a média \pm SEM de três experimentos independentes. Note a redução estatisticamente significativa do PDI para a dispersão após 24 horas.

Estes resultados demonstram que a dispersão está mais estável, de modo que para o estudo da dispersão das nanopartículas em meios biológicos, todas as dispersões utilizadas foram estabilizadas durante 24 horas.

6.3. Dispersão das nanopartículas em meios biológicos

Na tentativa de otimizar um protocolo de estabilização em meio de cultura, diferentes abordagens foram adotadas. A primeira etapa foi determinar se a dispersão de nanopartículas de rutilo se mantinha em nanoescala após a diluição em dois diferentes meios de cultura (DMEM e KGM), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). Estes meios foram selecionados, uma vez que os estudos

de citotoxicidade foram realizados com fibroblastos (meio utilizado: *DMEM High Glucose*) e queratinócitos (meio utilizado: KGM).

Os resultados nos diferentes meios mostraram um aumento significativo no diâmetro médio das nanopartículas e do índice de polidispersão. De modo a reduzir a aglomeração, albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como agente estabilizante. Diferentes concentrações de BSA foram testadas, mantendo a mesma adição do volume (Fig. 10a). Além disso, sabe-se que os meios biológicos testados são ricos em espécies iônicas, e que estas podem alterar a carga superficial das nanopartículas. Devido a este fato, medidas de potencial zeta foram realizadas (Fig. 10b).

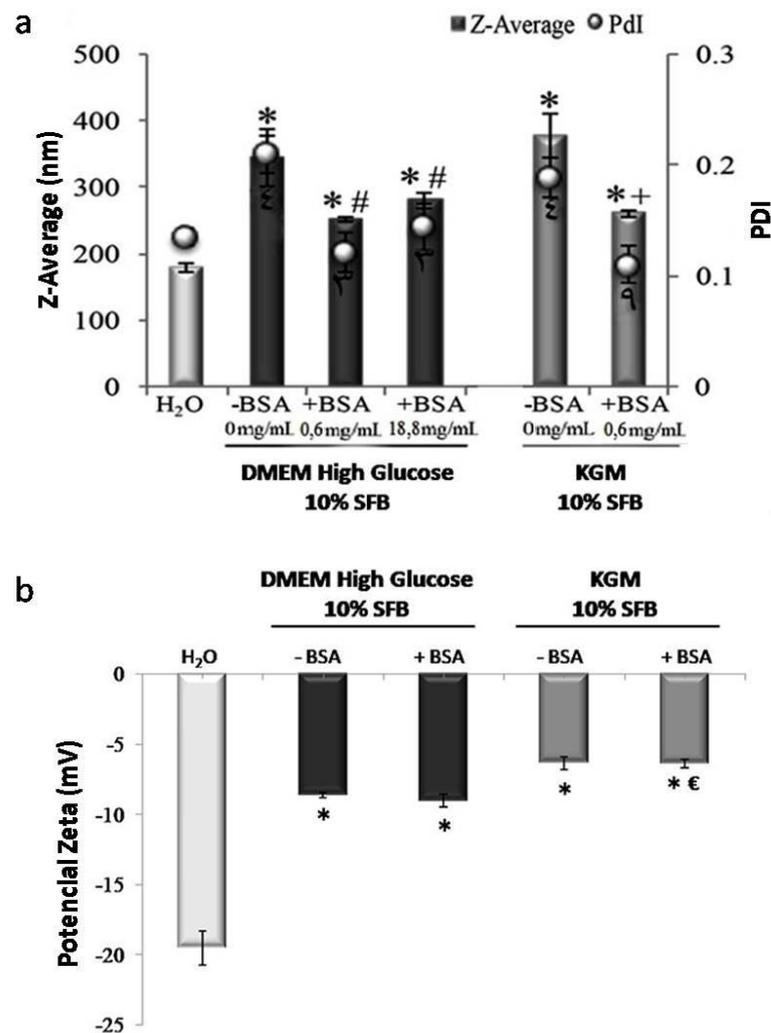


Figura 10. Dispersão das nanopartículas em diferentes meios de cultivo: (a) Diâmetro médio e PDI e **(b)** medidas de potencial zeta, dos aglomerados de nanopartículas após dispersão em água e interação com os diferentes meios de cultivo (DMEM *High Glucose* suplementado com 10 % de soro e KGM suplementados com 10 % de soro) com e sem contato com o agente estabilizante BSA. Os resultados são a média \pm SEM de três experimentos independentes. Z-Average: * $P < 0,05$ vs controle (H₂O); $\Sigma P < 0,05$ vs controle (BSA [0 mg /mL] em DMEM *High Glucose* 10% SFB); $\Upsilon P < 0,05$ vs controle BSA [6 mg/mL] em DMEM *High Glucose* 10% SFB; $\#P < 0,05$ vs controle (BSA [0 mg/ml] em KGM10% SFB). PDI: $\epsilon P < 0,05$ vs controle (H₂O); $\yenumber P < 0,05$ vs controle (BSA [0 mg/mL] em DMEM *High Glucose* 10% SFB); $\wp P < 0,05$ vs controle (BSA [0 mg/mL] em KGM10% SFB). Observe que a introdução de BSA reduziu significativamente o tamanho médio das nanopartículas e PDI em ambos os meios de cultivo, assim como também é possível notar que a carga de superfície das nanopartículas aumentou após o contato com meio de cultivo.

A introdução de BSA reduziu significativamente o tamanho das nanopartículas e o PDI em comparação com a diluição direta das nanopartículas em meio de cultura, independentemente da concentração usada em ambos os meios. Entre as diferentes concentrações de BSA estudadas, foi observada uma redução no tamanho médio das nanopartículas e PDI utilizando uma concentração final de BSA de 0,6 mg/mL para ambos os meios de cultura. De acordo com as medidas de potencial zeta, foi observado um aumento da carga superficial das nanopartículas quando em contato com o meio biológico, independente do BSA.

6.4. Adsorção de proteínas e íons do meio de cultura à superfície das nanopartículas

Para confirmar a adsorção de íons e proteínas sugerida pelos resultados de potencial zeta na superfície das nanopartículas, análises de EDS no modo STEM foram realizadas. Foi detectada a adsorção preferencial de íons de cálcio (Ca) e de fósforo (P) provenientes do meio de cultura às nanopartículas, resultado este, que não foi observado no aglomerado de nanopartículas em água (controle) (Fig. 11). O único elemento que mostrou diferença foi o Ca, onde o mapa revelou uma maior quantidade para o meio DMEM. Estudos realizados com as nanopartículas em meio de cultura sem soro, também mostraram a adsorção preferencial de íons de cálcio e de fósforo, indicando que a adsorção é independente das proteínas do soro. Além da adsorção de íons, foi possível observar a presença de enxofre (S) que é relativa à adsorção de proteínas às superfícies das nanopartículas. É importante reparar que a sua distribuição é bastante homogênea.

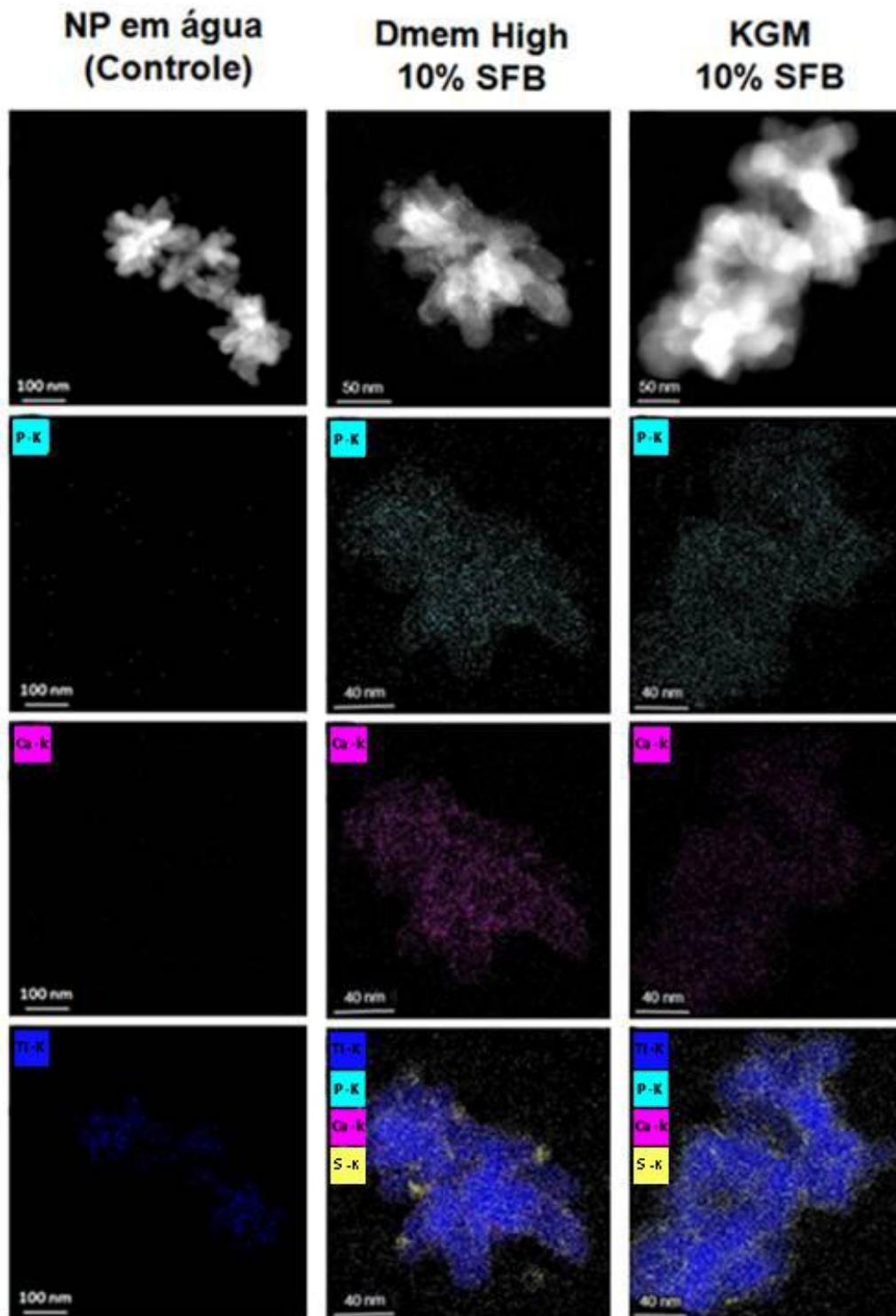


Figura 11. Formação de bio-complexos rutilo em meio de cultura: Análises dos mapas elementares de 1mg/mL de nanopartículas de rutilo diluídos em ambos os meios de cultivo (DMEM *High Glucose* 10% SFB e KGM 10% SFB) por EDS obtido no modo STEM. Note a adsorção preferencial de íons de elementos P-K, Ca-K sob as nanopartículas de TiO₂.

A fim de identificar as possíveis proteínas adsorvidas às nanopartículas, foi realizada análise proteômica. Na figura 12 encontram-se os resultados de eletroforese em gel de poliacrilamida para ambos os meios de cultivo.

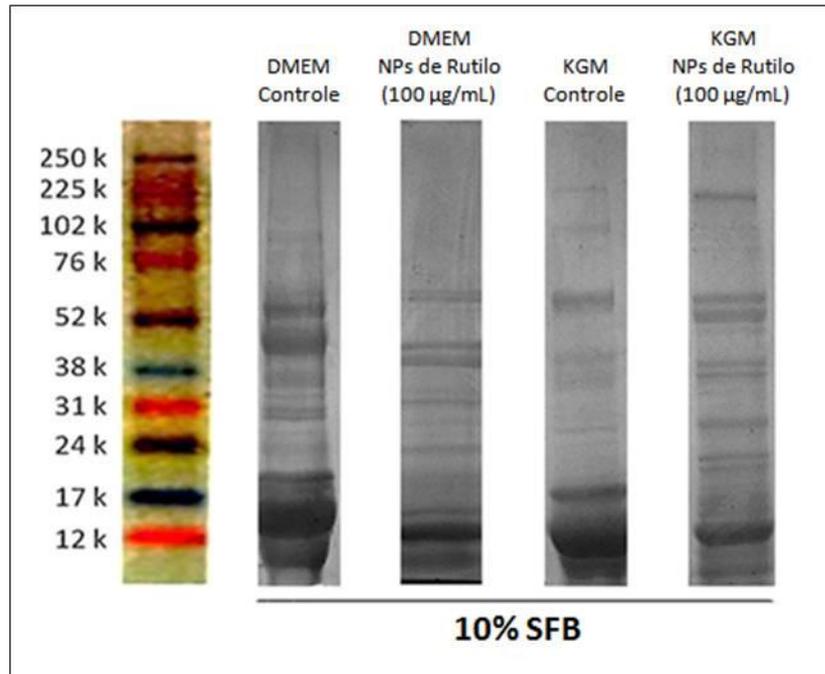


Figura 12. Análise proteômica: Gel de poliacrilamida das nanopartículas de rutilo (100 µg/mL) diluídos em ambos os meios de cultivo (DMEM *High Glucose* 10% SFB e KGM 10% SFB). Através desta imagem podemos concluir que existem proteínas adsorvidas à superfície das nanopartículas.

O gel de poliacrilamida apontou a presença tanto de diferentes como de semelhantes proteínas adsorvidas às nanopartículas (1 mg/mL) em ambos meios de cultura (DMEM e KGM) suplementados com 10% de SFB. Uma maior quantidade de bandas foi observada no meio KGM exposto a nanopartículas, quando comparado com DMEM.

Estas amostras foram depois analisadas por espectrometria de massa, onde foram reveladas 57 proteínas em comum e 44 e 40 proteínas diferentes em DMEM e KGM, respectivamente. Na figura 12 encontram-se as 20 proteínas mais abundantes em ambos os meios (Fig. 13a), assim como suas principais funções (Fig. 13b).

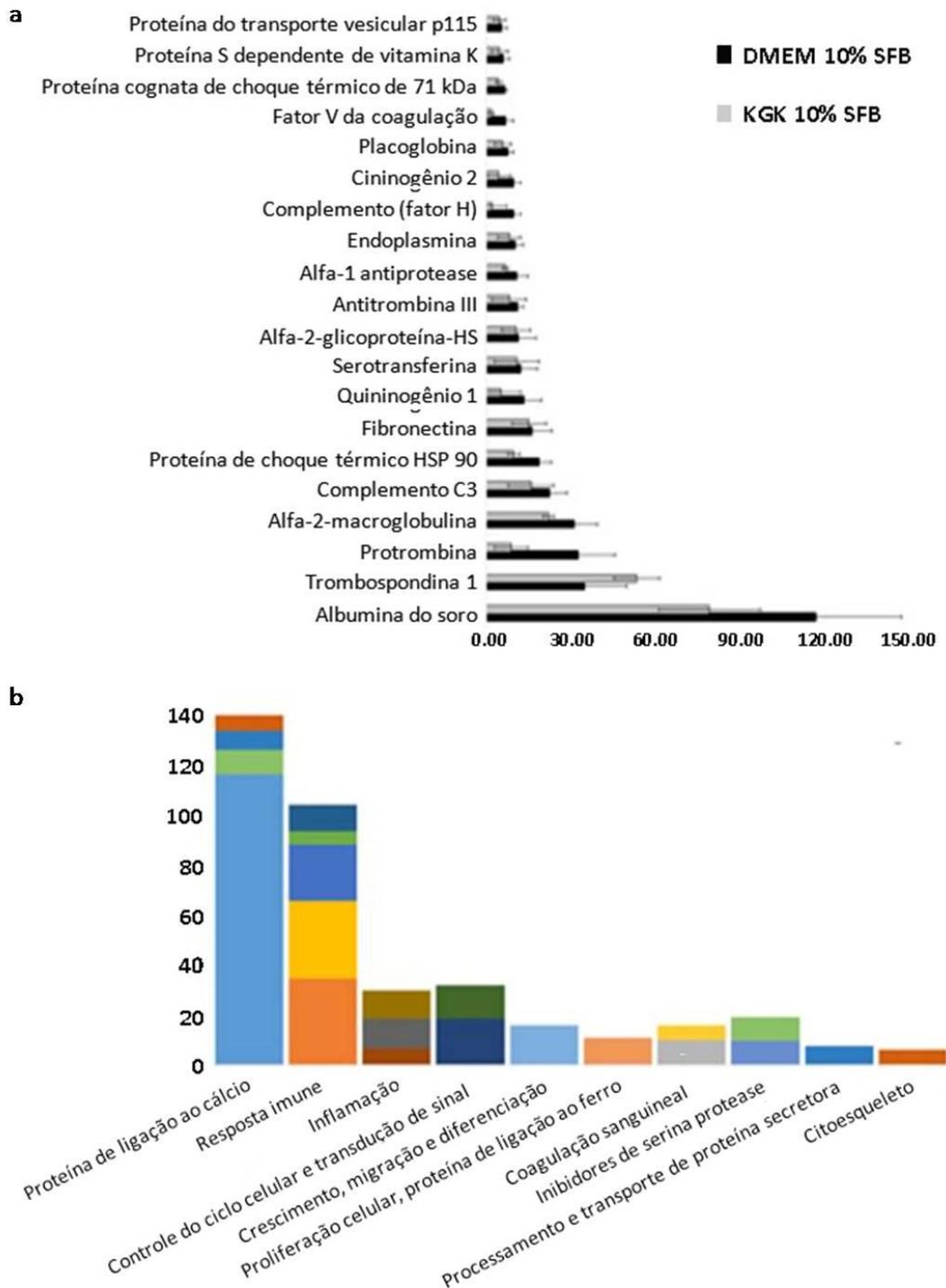


Figura 13. Identificação das proteínas e sua função: (a) As 20 proteínas corona mais abundantes e (b) as principais funções moleculares associadas às mesmas. Note que as proteínas albumina, tomboespondina e protrombina foram as mais presentes na superfície das nanopartículas e, entre as principais funções observadas estão a função de ligação ao cálcio e resposta imune.

Os resultados de adsorção de íons e proteínas confirmam a formação de um bio-complexo quando as nanopartículas entram em contato com o meio de cultura. Possivelmente este bio-complexo tem consequências no comportamento biológico.

6.5. Avaliação da citotoxicidade de nanopartícula de TiO₂ (rutilo)

Para todos os testes de citotoxicidade, optamos por trabalhar com cultura primária de fibroblastos e queratinócitos, uma vez que estes visam simular o que acontece quando as nanopartículas entram em contato com células que compõem a pele.

Os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% SFB mantendo uma morfologia alongada característica (Fig. 14a). Os queratinócitos por sua vez, foram cultivados com KGM suplementado com 10% SFB, contudo foi possível visualizar que rapidamente as células se diferenciavam perdendo a sua capacidade proliferativa (Fig. 14b). Levando em conta este fato, e seguindo a literatura, os queratinócitos foram cultivados somente com KGM (sem suplementação de soro), onde pode-se observar uma melhoria na morfologia e na capacidade proliferativa (Fig. 14c).

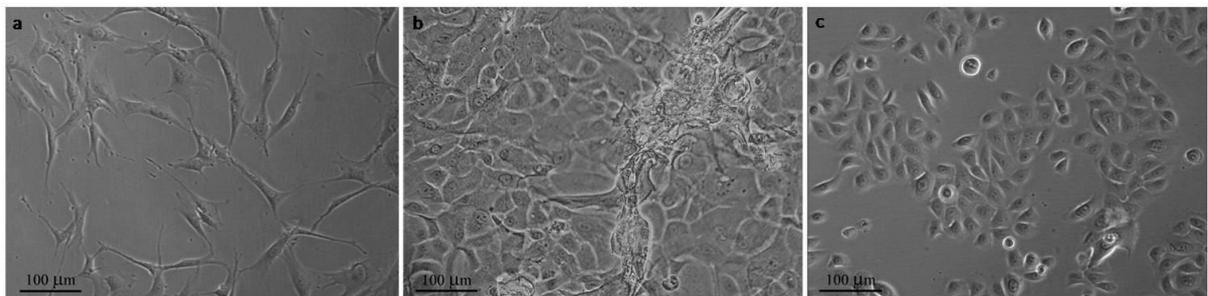


Figura 14. Cultura primária de células da pele em monocamada:(a) Fibroblastos cultivados em meio DMEM *High Glucose* 10% SFB, (b) queratinócitos cultivados em meio KGM 10% SFB e (c) queratinócitos cultivado em meio KGM sem soro. Note que os queratinócitos em meio KGM 10% SFB apresentaram o citoplasma aumentado, que são característicos de células diferenciadas.

Após esta evidência, foi necessário otimizar novamente a estabilidade das nanopartículas em KGM sem soro. Os resultados demonstraram que os aglomerados de rutilo em KGM estabilizados com BSA apresentam um tamanho médio de 266 nanômetros (Fig. 15a), correspondendo ao tamanho médio observado nos meios suplementados com SFB (DMEM e KGM), assim como também foi observado por medidas de potencial zeta o aumento da carga de superfície das nanopartículas após a adição do meio de cultivo KGM sem soro (Figura 15b).

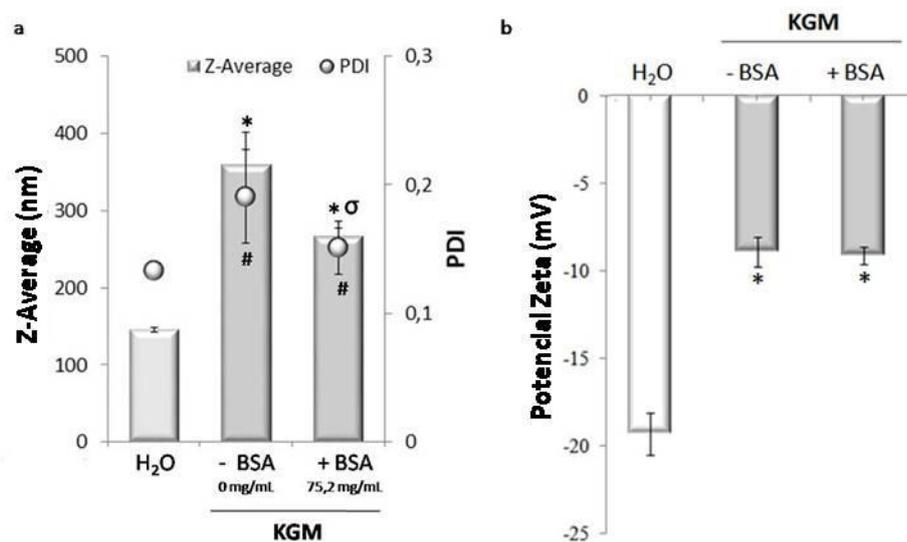


Figura 15. Dispersão em meios KGM sem soro: (a) Diâmetro médio e PDI e **(b)** medidas de potencial zeta, dos aglomerados de nanopartículas após dispersão em água e interação com os meios de cultivo KGM sem soro, com e sem contato com o agente estabilizante BSA. Os resultados são a média \pm SEM de três experimentos independentes. Z-Average: * P <0,05 vs controle (H₂O); σ P <0,05 vs controle (BSA [0 mg /mL]), PDI: # P <0,05 vs controle (H₂O); Potencial Zeta: * P <0,05 vs controle (H₂O). Observe que a introdução de BSA reduziu significativamente o tamanho médio das nanopartículas, assim como também é possível notar que a carga de superfície das nanopartículas aumentou após o contato com meio de cultivo.

Em relação à adsorção de proteínas, pelos resultados de SDS-PAGE é possível verificar que algumas das bandas presentes no KGM suplementado com soro são semelhantes às bandas de KGM controle indicando a presença de proteínas semelhantes. Da literatura sabe-se que as proteínas presentes no KGM

são preferencialmente: transferrina, insulina e epinefrina. Novos ensaios de espectrometria de massas são fundamentais para entender quais as proteínas adsorvidas às superfícies do rutilo (análises a realizar). Em relação à adsorção de íons, foi possível verificar a adsorção preferencial de íons de cálcio e de fósforo provenientes do meio de cultura às nanopartículas não estabilizadas com BSA (Fig. 16a) e estabilizadas com BSA (Fig. 16b).

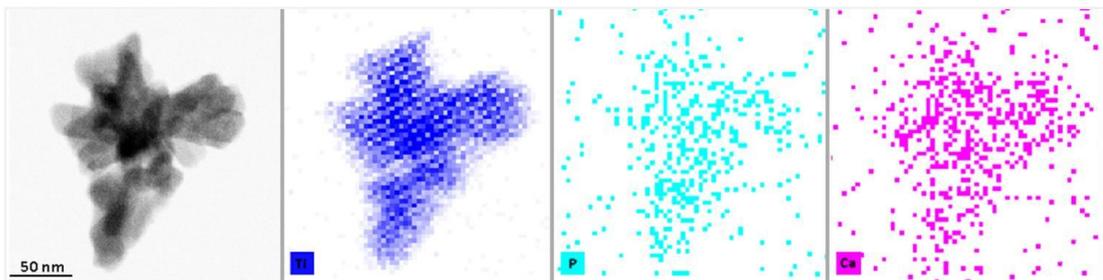


Figura 16. Formação de bio-complexos em meio de cultura KGM: Análises dos mapas elementares de 1mg/mL de nanopartículas de TiO_2 de rutilo estabilizadas com BSA e diluídas em meios de cultivo KGM sem soro por EDS obtido no modo STEM. Note a adsorção preferencial de íons de elementos P-K, Ca-K sob as nanopartículas de TiO_2 de rutilo estabilizadas com BSA e diluídas em meios de cultivo KGM sem soro por EDS obtido no modo STEM. Note a adsorção preferencial de íons de elementos P-K, Ca-K sob as nanopartículas de TiO_2 .

6.5.1. Avaliação da citotoxicidade por ensaio de vermelho neutro

Como já descrito, até o momento, não existe uma padronização para avaliação da toxicidade de nanomateriais. Como forma alternativa, a *Guideline* da OCDE 129 (*Organisation for Economic Co-operation and Development - Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests*) foi implementada como protocolo potencial validado para avaliar o efeito citotóxico das nanopartículas de rutilo. Na figura 17 estão apresentados os resultados obtidos no ensaio de vermelho neutro para os dois tipos celulares.

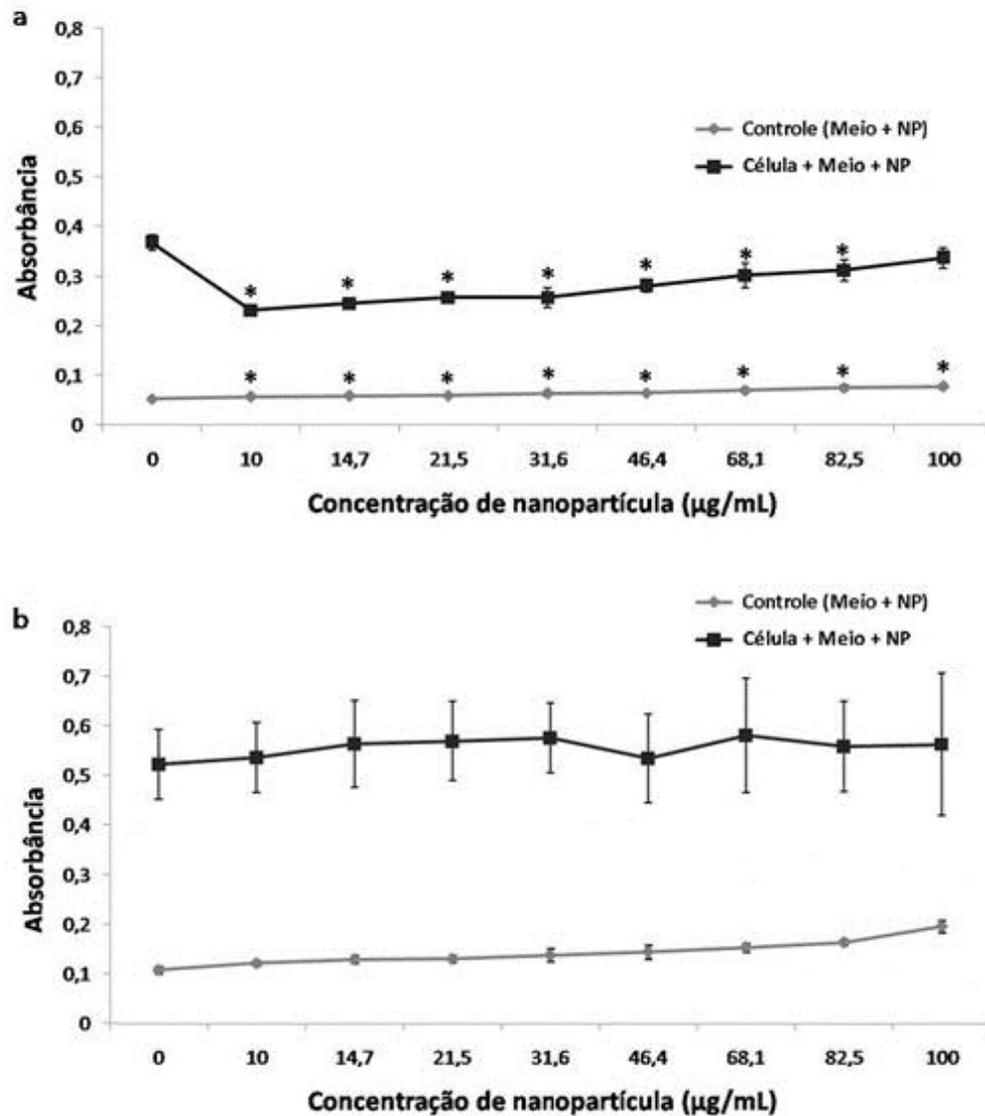


Figura 17. Ensaio de vermelho neutro: Testes realizados utilizando cultura primária de **(a)** fibroblastos e **(b)** queratinócitos. * $P < 0,05$ vs controle (0 µg/mL). Note que o aumento significativo da absorbância nos controles sugere interferência com as nanopartículas.

Com estes testes, foi possível visualizar um aumento significativo da absorbância no grupo controle dos queratinócitos à medida que a concentração de nanopartículas aumentava, o que sugere que as nanopartículas de rutílo parecem interferir com o ensaio de vermelho neutro.

6.5.2. Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular, para ambos tipos celulares, foi analisada por citometria de fluxo após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas utilizando marcação para anexina V e Iodeto de propídio (PI) (Fig. 18). A classificação das células foi feita de acordo com a intensidade de marcação. Considerou-se células vivas, as células sem marcação (-Anexina V / -PI), apresentadas no quadrante 4 (Q4), células em apoptose recente, células anexina V positivo e PI negativo (+Anexina V / -IP), apresentadas no quadrante 3 (Q3), células em apoptose tardia, as células anexina V positivo e PI positivo (+Anexina V / +IP), apresentadas no quadrante 2 (Q2) e células em necrose, células marcadas somente com PI (-AV/+IP), apresentadas no quadrante 1 (Q1).

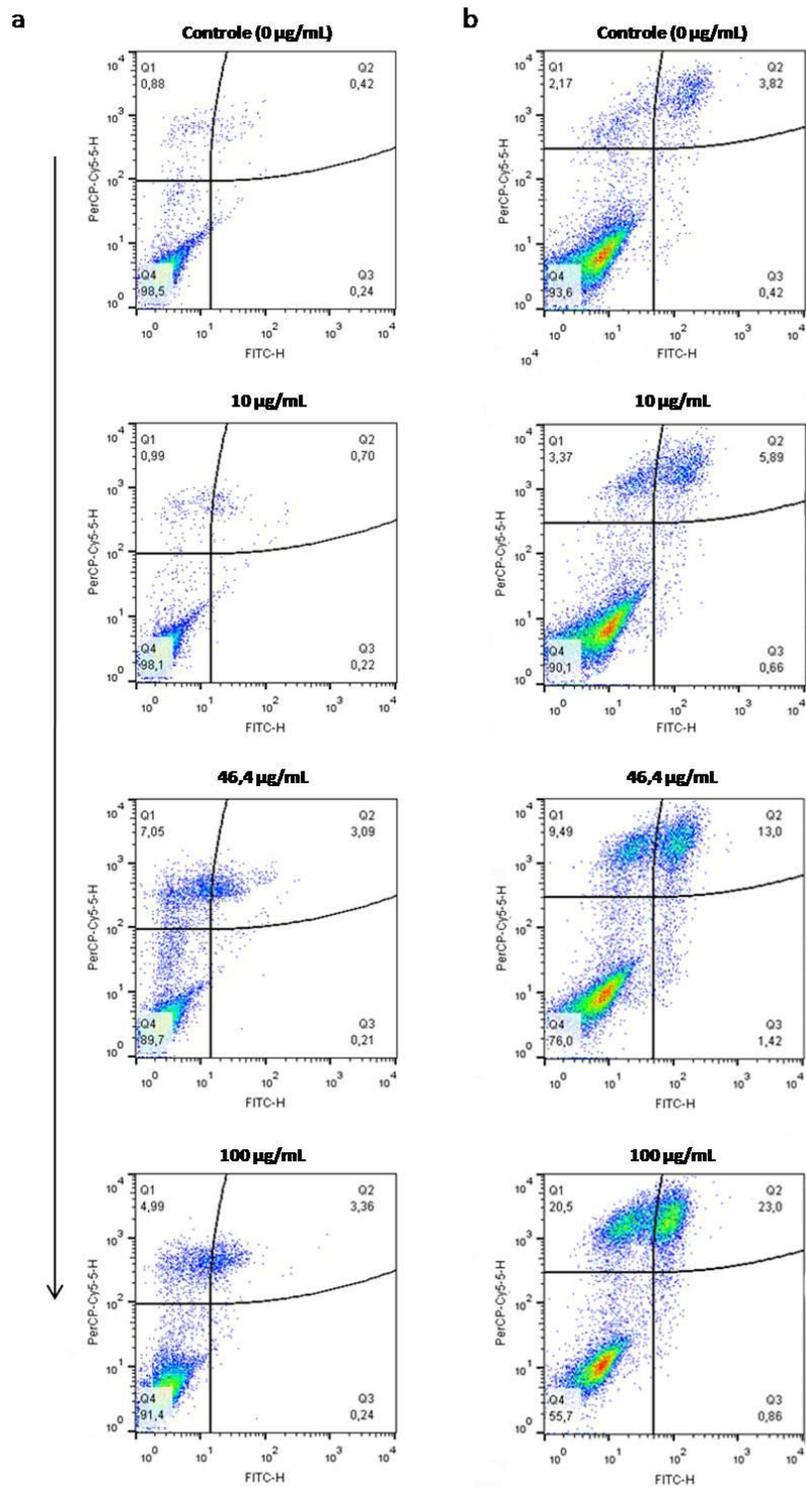


Figura 18. Citometria de fluxo: Histograma com a distribuição de **(a)** fibroblastos e **(b)** queratinócitos, de acordo com sua intensidade de marcação para anexina V e PI, após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas (imagem representativa de uma amostra). Observe que com o aumento da concentração de nanopartículas, a intensidade de marcação aumentou nos quadrantes Q1 e Q2.

Desta forma, foi possível observar que com o aumento da concentração das nanopartículas de rutilo, houve a tendência do aumento do número de células apoptóticas e necróticas.

Na figura 19 encontra-se a média dos resultados obtidos no teste de viabilidade celular por citometria de fluxo, separadas pela taxa de células viáveis, apoptóticas (apoptose recente e apoptose tardia) e necróticas.

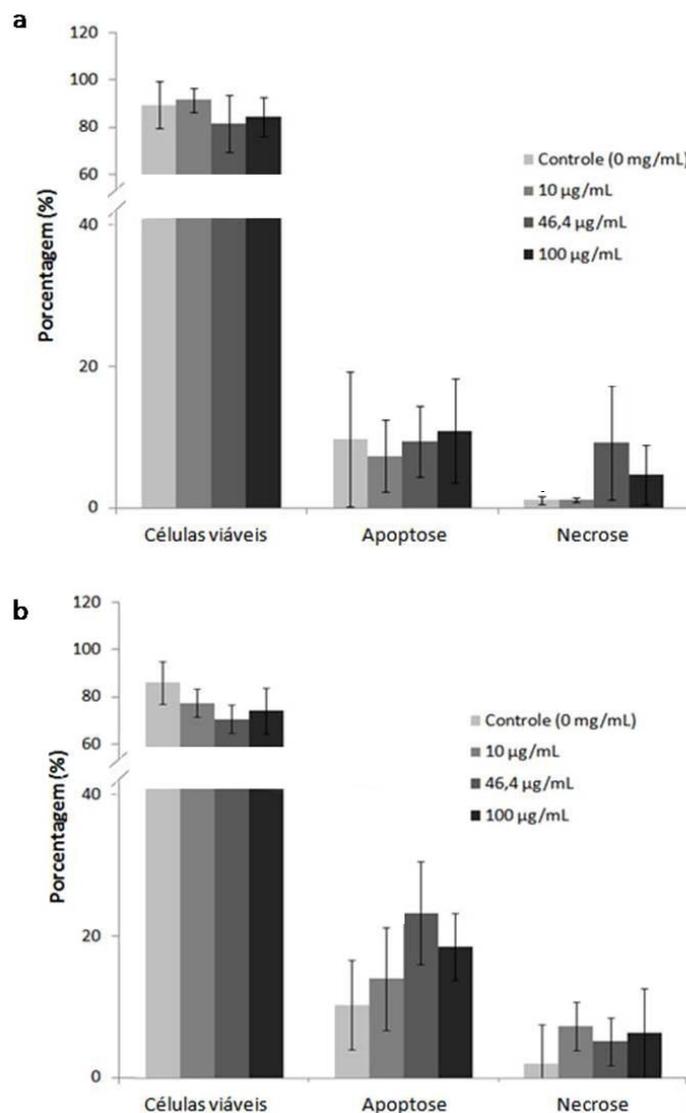


Figura 19. Viabilidade celular: Histograma da média de três experimentos independentes analisados por citometria de fluxo com marcação para anexina V-FITC e PI. **(a)** Fibroblastos e **(b)** queratinócitos, após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas. Não houve diferenças significativas. Note a tendência de morte celular com o aumento da concentração de nanopartículas.

Foi observado nos fibroblastos que não ocorreu redução significativa do número de células viáveis com o aumento da concentração de nanopartículas, contudo é possível observar uma tendência do aumento da taxa de necrose para as duas maiores concentrações, quando comparadas com seu controle. Todavia, no que diz respeito aos queratinócitos, houve uma tendência do aumento da taxa de apoptose e necrose com o aumento da concentração de nanopartículas.

As avaliações do ciclo celular foram realizadas através da análise do conteúdo de DNA nas mesmas condições dos testes de viabilidade (Fig. 20).

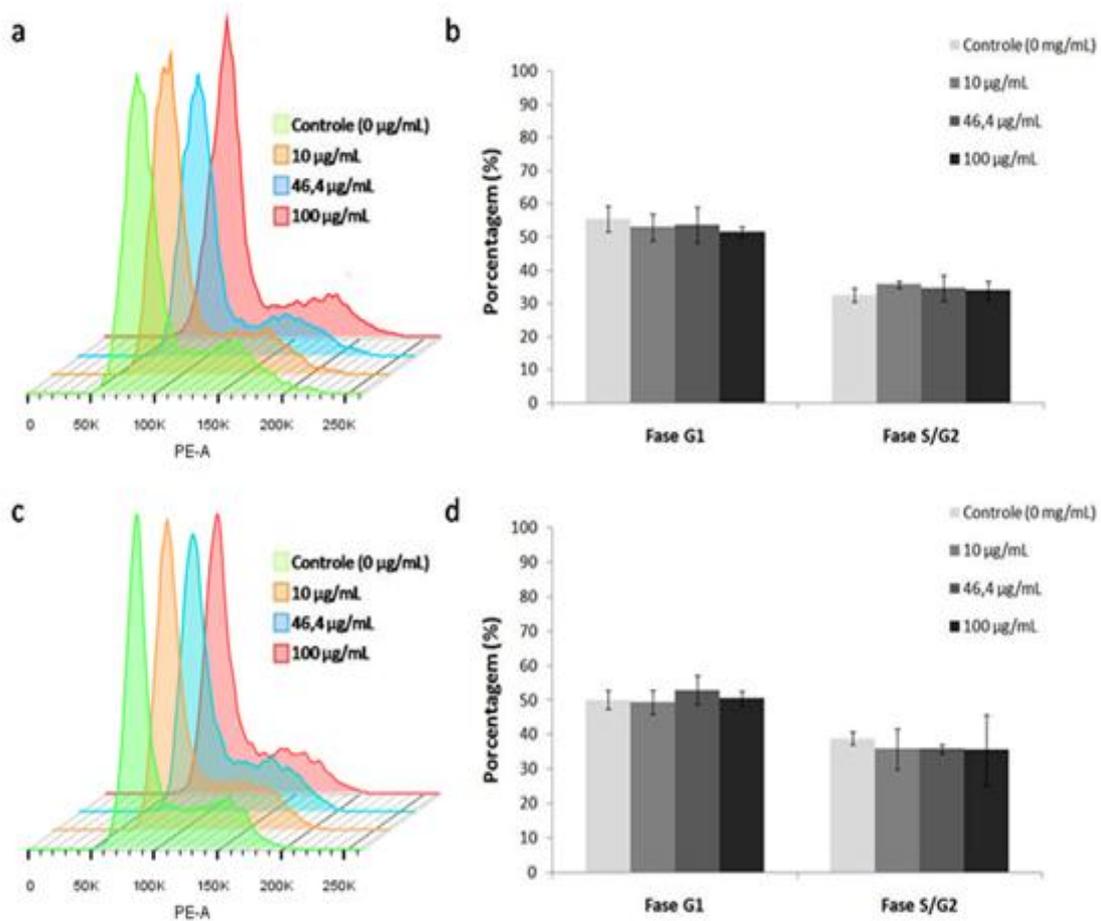


Figura 20. Ciclo Celular: Histograma do ciclo celular obtido por citometria de fluxo, após 48 horas de exposição à nanopartículas de TiO₂ em diferentes concentrações. **(a)** Fibroblastos e **(c)** queratinócitos (imagem representativa de uma amostra). Determinação quantitativa das fases do ciclo celular em **(b)** fibroblastos e **(d)** queratinócitos, em diferentes concentrações de nanopartículas, após 48 horas de exposição. Observe que não houve diferenças significativas nas fases do ciclo celular.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas das taxas de células na fase G1 e S/G2 entre as diferentes concentrações de nanopartículas para nenhum dos dois tipos celulares.

6.6. Morfologia e contagem celular

Na figura 21 pode-se observar imagens representativas das culturas de células em monocamada após 48 horas de exposição às nanopartículas, nas diferentes concentrações, obtidas por microscopia óptica. A redução do número de

células com o aumento da concentração de nanopartículas é visível para ambos os tipos celulares, assim como alterações na morfologia das células. O acúmulo de nanopartículas no citoplasma também foi observado, principalmente na concentração mais alta de nanopartículas.

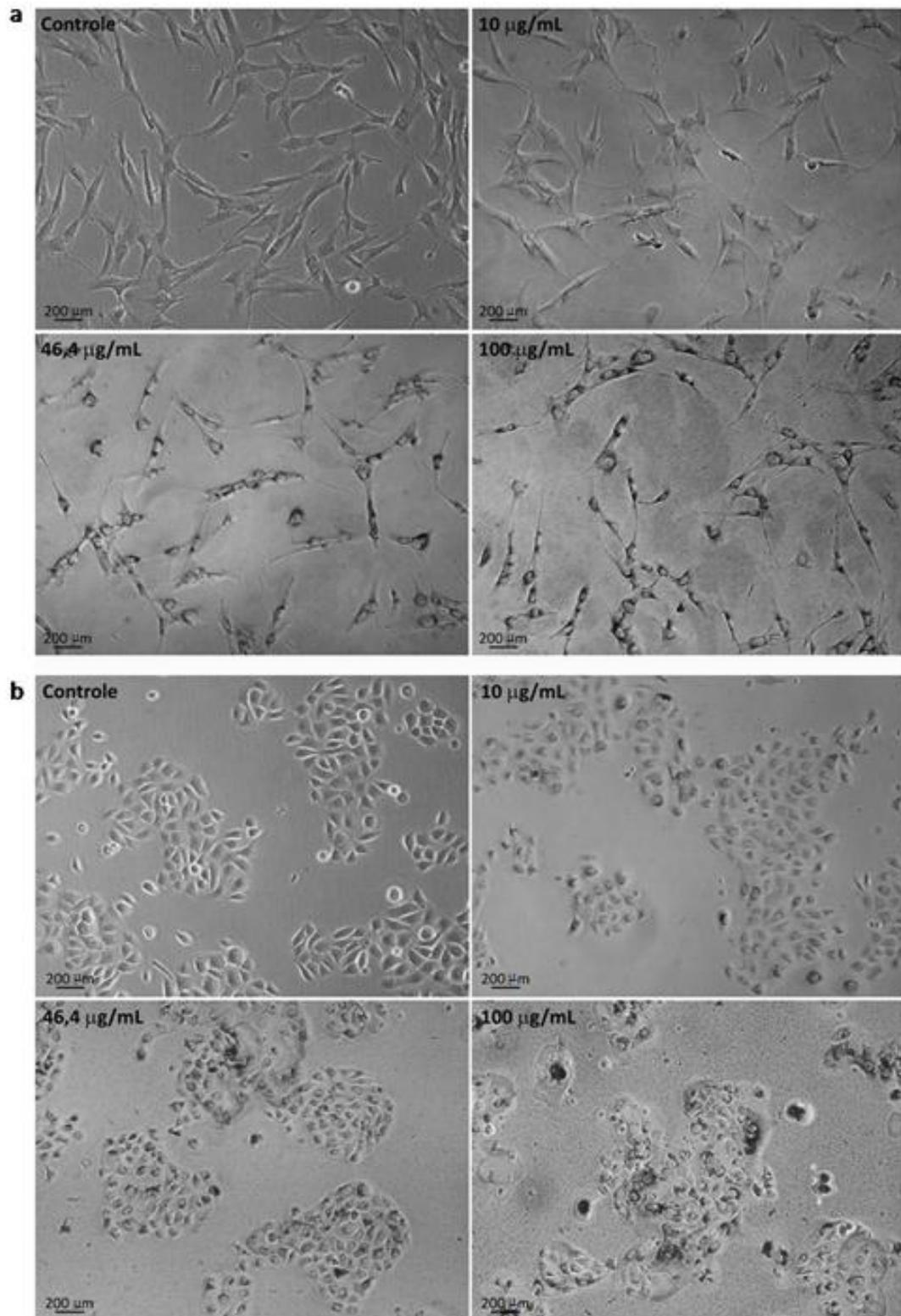


Figura 21. Imagens das culturas de células em monocamada, obtidas por microscopia óptica: Cultura primária de (a) fibroblastos e (b) queratinócitos, após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas de TiO_2 . Note a redução do número de células com o aumento da concentração de nanopartículas.

Uma contagem de células após 48 horas de exposição foi realizada para os dois tipos celulares. A média da quantificação de células para as diferentes concentrações estão apresentadas na figura 22.

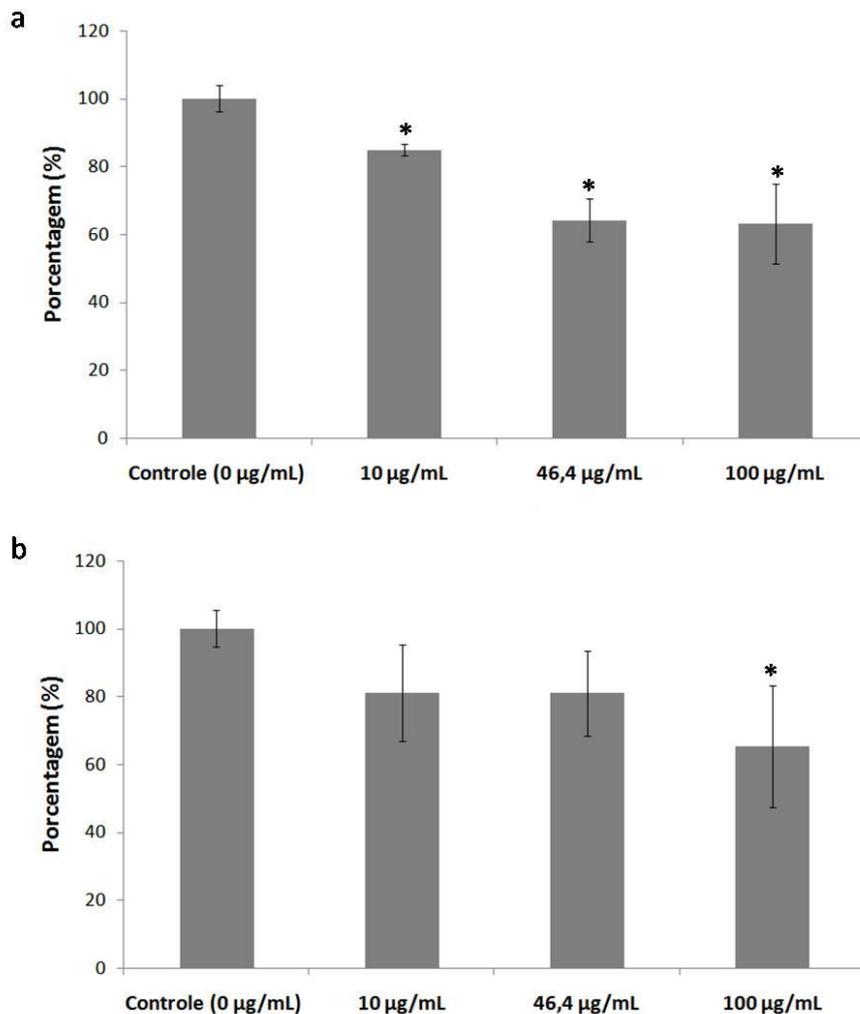


Figura 22. Quantificação celular: Número de células nas diferentes concentrações para (a) fibroblastos e (b) queratinócitos, após 48h de exposição a nanopartículas. Note a redução significativa do número de células com o aumento da concentração de nanopartículas.

Estes resultados mostram uma redução do número celular com o aumento da concentração de nanopartículas, após as 48 horas de exposição, para ambos os tipos celulares.

6.7. Avaliação da internalização celular

Os estudos da internalização de nanopartículas foram realizados por microscopia eletrônica de transmissão. Na figura 23, encontram-se as micrografias dos dois tipos celulares tratados e não tratados com nanopartículas de TiO_2 após 48 horas de exposição. É possível observar as organelas, como núcleo, mitocôndrias, retículo endoplasmático, entre outras. Pelas análises das micrografias é possível sugerir que as nanopartículas foram internalizadas por endocitose, como observado nas figuras 23c e d.

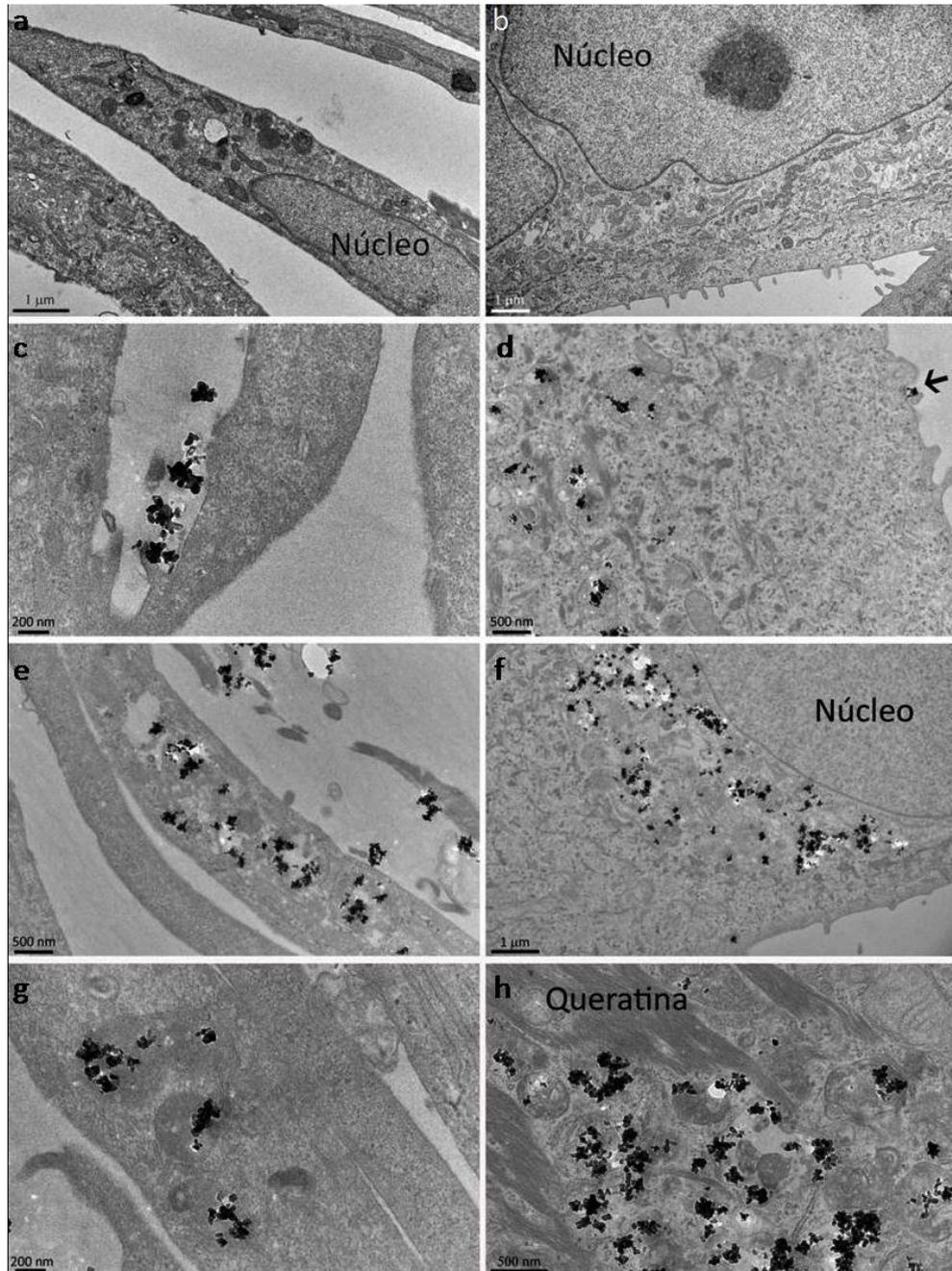


Figura 23. Estudo da internalização de nanopartículas: Micrografias eletrônicas de fibroblastos **(a)** não tratado (controle) e **(c, e, g)** tratados com nanopartículas e queratinócitos **(b)** não tratados (controle) e **(d, f, h)** tratados com nanopartículas de rutilo, após 48 horas de exposição. A seta indica um aglomerado de nanopartículas sendo endocitado.

Logo após internalização, aparentemente, as nanopartículas permanecem de preferência em estruturas microvesiculares com membrana bem definida e tendem a se acumular na região perinuclear, como observado na figura 23f.

7. DISCUSSÃO

A cada ano que passa, o mercado global vem gradativamente passando por períodos de transformações científicas e tecnológicas, resultando na ampla utilização da nanotecnologia em diferentes produtos [1-3]. Conseqüentemente, a exposição dos consumidores a nanopartículas vem aumentando.

Nanopartículas são muito utilizadas, como por exemplo em processos químicos, dispositivos médicos (implantes, próteses, sistemas de liberação controlada de fármacos), indústria alimentar, farmacêutica e de cosméticos [1-10]. Desta forma, é extremamente relevante avaliar a segurança destes nanomateriais.

O dióxido de titânio (TiO_2) vem chamando atenção para pesquisas uma vez que, além de estar no *ranking* entre os cinco nanomateriais mais utilizados, possui diversas aplicações, como em pigmento para papéis, plásticos e alimentos, como sistema de liberação de fármacos, cosméticos, entre outros [40]. Na área de cosméticos, principalmente em filtros solares, nanopartículas de TiO_2 são usadas regularmente, devido à sua capacidade de refletir e espalhar raios UVB (290–320 nm) e UVA (320–400 nm) [22]. No que diz respeito à regulamentação, o limite máximo permitido de TiO_2 em protetores solares é de 25% (v/v) [77] e atualmente as indústrias européias são obrigadas a declarar no rótulo da embalagem a presença de nanopartículas [78].

O tamanho, a forma, o estado de agregação e a estrutura cristalina das nanopartículas são importantes características físico-químicas que devem ser levadas em consideração, pois esses parâmetros podem afetar tanto a resposta celular bem como influenciar a sua capacidade de penetração na pele [51]. Devido a sua redução de tamanho, as nanopartículas passam a ter uma maior área de superfície por unidade de massa, aumentam a sua reatividade e, por conseqüência, influenciam a citotoxicidade [42-43].

O aumento da exposição dos indivíduos aos nanomateriais é de grande preocupação científica, o que tem gerado o avanço dos estudos sobre nanotoxicidade. Logo, é extremamente necessário que a segurança dessas partículas seja elucidada, para benefício e proteção dos consumidores. Contudo, é

importante referir que a regulamentação na área de nanotecnologia ainda está na sua infância. Atualmente existem projetos em todo o mundo, a desenvolverem regulamentação para a área de nanotecnologia. Um exemplo foi o projeto da União Europeia (EU), NanoReg (*A common European approach to the regulatory testing of Manufactured Nanomaterials*) que terminou no início deste ano e do qual o INMETRO participou. Deste projeto, um dos grandes problemas encontrados é que as nanopartículas podem interferir com os métodos de análise de viabilidade celular, havendo a necessidade de se desenvolverem novos métodos ou mesmo realizar adaptações nos já existentes.

7.1. Análises de protetor solar comercialmente disponível

As análises de MET realizadas neste estudo demonstraram que o protetor solar, comercialmente disponível, embora seja constituído por aglomerados micrométricos de nanopartículas de TiO_2 , também apresenta agregados na escala nanométrica. São com esses pequenos agregados micrométricos que surgem nossas preocupações, sendo uma das motivações que desencadeou este estudo. Na literatura, a maioria dos artigos avalia o efeito citotóxico de aglomerados de nanopartículas presentes em protetores solares, na escala micrométrica [34,75,79]. Da literatura, sabe-se que a morfologia alongada é característica de nanopartículas de TiO_2 na fase cristalina rutilo [80]. No presente estudo, por análise elementar realizada no EDS, confirmamos que as nanopartículas observadas no protetor solar são de dióxido de titânio, não tendo sido possível discernir em relação à sua estrutura cristalina.

Com base nestes resultados, o objetivo deste estudo foi o de investigar a citotoxicidade de nanopartículas de TiO_2 na escala nanométrica em células de pele (queratinócitos e fibroblastos primários) humana. Para tal, nanopartículas de TiO_2 na fase cristalina rutilo foram adquiridas comercialmente e utilizadas de modo a mimetizar as nanopartículas empregadas nos protetores solares.

7.2. Caracterização e dispersão de nanopartículas de rutilo

Após aquisição das nanopartículas de TiO_2 , foi realizada uma caracterização físico-química destas por diferentes técnicas. As análises obtidas por MET mostraram que o tamanho primário das nanopartículas estava entre 20 e 30 nanômetros, confirmando o tamanho descrito pelo fabricante. A estrutura cristalina do rutilo foi confirmada por difração de elétrons tendo como referência o estudo de Kowalski *et al.* (2009) [81]. Esses autores demonstraram que para o TiO_2 na fase cristalina rutilo, os planos (110), (211) e (301) são os mais intensos, sendo que a face (110) é a mais termodinamicamente estável e, portanto, é a dominante em seus cristalitos [81].

A técnica de DLS é não invasiva, muito utilizada para medir tamanho e distribuição de tamanho de moléculas ou partículas em suspensão. Desta forma, a leitura do tamanho médio das nanopartículas de TiO_2 em meio aquoso foi realizada, obtendo-se um tamanho médio de $477,7 \pm 25,2$ nm, confirmando os resultados de aglomeração observados por MET. A tendência para a aglomeração das nanopartículas quando em contato com meio aquoso, pode ser explicada pela redução do equilíbrio termodinâmico. Desta forma, as nanopartículas tendem a se aglomerar espontaneamente e, assim, reduzir a grande energia livre de superfície [82]. Esta aglomeração do TiO_2 em solução aquosa já havia sido descrita por Taurozzi *et al.* (2013) [83].

Com o objetivo de reduzir o tamanho médio destes aglomerados, utilizamos um sistema de ultrassom, uma vez que é um dos procedimentos mais usados para dispersar nanomateriais em estudos toxicológicos. Este sistema emprega o método de cavitação para facilitar a ruptura dos aglomerados e formar agregados na escala nanométrica [83-84]. No entanto, há dois tipos de sistema de ultrassom, o de modo direto e o indireto. No modo direto, a sonda fica em contato direto com a solução a ser dispersada enquanto que no modo indireto há um suporte para *ependorfs* e a solução a ser dispersada fica no seu interior. Na literatura há a descrição que no modo direto ocorreria a contaminação da amostra com partículas de alumínio, titânio e vanádio, provenientes da degradação da sonda [85]. Uma vez que trabalhamos

com sistemas biológicos e tentamos reduzir ao máximo as chances de contaminação, optamos por trabalhar com o modo indireto.

Como já descrito, algumas variáveis podem ser ajustadas em um protocolo de dispersão, como a concentração da solução estoque, a amplitude, o tempo de sonicação e o modo de sonicação (contínuo ou pulsado). Com o propósito de definir um protocolo de dispersão, com menor tamanho médio possível dos aglomerados, diferentes testes foram realizados.

Ao testar diferentes concentrações de nanopartículas verificamos que em maior concentração (10 de mg/mL) o diâmetro médio dos aglomerados foi menor. De acordo com Taurozzi *et al.* (2011), a sonicação com maior concentração de partículas tem a vantagem de ocorrência de uma maior frequência de colisão de partículas, aumentando a desaglomeração devido ao aumento do número de impactos de partícula-partícula [84].

Da literatura, sabe-se que a redução do tamanho da partícula depende da amplitude/energia aplicada por volume da dispersão [86]. Levando este fato em consideração, observamos que para amplitude de 30% foi alcançada uma melhor distribuição e menor diâmetro médio de nanopartículas, assim como melhor PDI. O PDI nos fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos e estabilidade (quanto mais próximo o valor do PDI estiver de zero mais homogênea e estável é a dispersão). Portanto, a conclusão obtida do primeiro teste de dispersão foi que as sonicações das nanopartículas de rutilo seriam realizadas com 30% de amplitude e com 10mg/mL de concentração estoque. Após fixar a concentração a ser trabalhada (10 mg/mL) e a amplitude (30%), o próximo teste foi o tempo e o modo (contínuo ou pulsado) de sonicação.

Sabe-se que o sonicador, também conhecido como ultrassom, ao ser aplicado em líquidos em altas intensidades, faz com que as ondas sonoras se propaguem para o líquido de dispersão, resultando em ciclos alternados de compressão (alta pressão) e rarefação (baixa pressão), que variam de acordo com a frequência aplicada. Durante a transição destes ciclos (de baixa pressão para alta pressão) são formadas pequenas bolhas de vácuo que colidem violentamente (fenômeno conhecido como cavitação), levando ao aquecimento da amostra.

Portanto, o aquecimento da amostra varia de acordo com a frequência e tempo de sonicação aplicados [84]. Muitos pesquisadores já descreveram como método alternativo para reduzir o aquecimento colocar a amostra a ser dispersada imersa em um recipiente com gelo ou água gelada [83-86].

Entretanto, nós observamos que com o tempo de 5 minutos de modo contínuo o aquecimento da suspensão foi considerável, mesmo quando esta se encontrava imersa em banho de água gelada. Por esta razão, um modo de operação pulsada (em vez do modo contínuo usado anteriormente) empregamos para testes de otimização adicionais. Os tempos de sonicação de 5, 10 e 15 minutos foram então testados sob uma amplitude de 30% num regime pulsado (8 segundos ligado e 2 segundos desligado). Conforme ilustrado nos resultados, não houve alteração no tamanho médio das partículas (grandes aglomerados foram observados assim como rápida sedimentação) até o tempo de 10 minutos de modo pulsado. Entretanto, aos 15 minutos de modo pulsado, os grandes aglomerados foram eliminados dando origem a uma média de distribuição de tamanho de partículas menor.

O aumento do tempo de sonicação muitas vezes leva à redução dos aglomerados de nanopartículas uma vez que aumenta a colisão entre as partículas, o que explicaria os resultados observados [84]. No entanto, deve-se tomar cuidado com o tempo aplicado, pois ele, assim como a potência aplicada, descrevem a quantidade de energia empregada à suspensão. Desde modo, períodos longos de sonicação levam ao aumento da energia efetiva fornecida, gerando aquecimento da amostra, que conseqüentemente, pode levar a alterações das propriedades físico-químicas do material, induzindo a reaglomeração e, até mesmo, à formação de agregados. Vale ressaltar que este fenômeno não foi observado no nosso estudo, entretanto, muitos estudos já evidenciaram este fenômeno, demonstrando o aumento do tamanho dos aglomerados das partículas a partir de um determinado limiar de energia de sonicação [86-88].

Estes resultados mostraram que a otimização do nosso protocolo de dispersão de nanopartículas de rutilo em água apresentou um tamanho hidrodinâmico médio de $142,1 \pm 5,6$ nm, o que está de acordo com as micrografias de TEM. Portanto, uma concentração de 10 mg/mL, um tempo de sonicação de 15

minutos e uma amplitude de 30% no modo de pulsado foram selecionados para testes adicionais.

Como o valor do PDI estava elevado, realizamos um teste de estabilidade após 24 horas. Neste tempo de estabilização o PDI apresentou uma redução estatisticamente significativa. Este resultado pode ser explicado, uma vez que, durante as 24 horas de estabilização os grandes aglomerados de nanopartículas sedimentam-se, deixando a suspensão mais homogênea e estável. Levando este fato em consideração, para o estudo da dispersão das nanopartículas em meios biológicos, todas as dispersões utilizadas, foram estabilizadas durante 24 horas.

7.3. Caracterização das nanopartículas de rutilo nos meios de cultura

Após finalizar o protocolo de dispersão em meio aquoso, as suspensões preparadas em água foram diluídas em dois diferentes meios de cultivo, DMEM, meio utilizado para cultivar fibroblastos e KGM, meio utilizado para cultivar queratinócitos, ambos suplementados com 10% FBS (v/v).

Após introduzidas nos respectivos meios de cultivo observamos que o tamanho médio das nanopartículas em ambos os meios aumentou significativamente, assim como o PDI. Possivelmente, cargas eletrostáticas atrativas parecem dominar, além disso as próprias proteínas do meio de cultura contribuiriam (ou parecem contribuir) para esta aglomeração [89]. Devido a este fato, uma grande variedade de estabilizantes tem sido estudada com o intuito de estabilizar nanopartículas em meios biológicos. Uma das opções mais atraentes tem sido a utilização de proteínas devido a sua biocompatibilidade e ao fato de que as mesmas podem mimetizar o revestimento real que as partículas espontaneamente adquirem quando introduzidas em matrizes biológicas [89].

A albumina de soro bovino (BSA) é frequentemente usada como agente estabilizante, pois é a proteína mais abundante no soro e está presente em concentração elevada em muitos meios de cultura utilizados para estudos toxicológicos [86,90-91]. Ji *et al.* (2010) demonstraram uma melhoria significativa na estabilidade das nanopartículas em uma variedade de meios biológicos, quando a

BSA é utilizada [92]. Possivelmente, os estabilizantes aderem-se à superfície das nanopartículas criando uma corona proteica de modo que, quando introduzido no meio de cultura, esta corona protege da reaglomeração [89]. Entretanto, recentemente, foi demonstrado que não só a BSA mas também polímeros, como por exemplo o polietilenoglicol (PEG), estabilizam nanopartículas de titânio em meio de cultivo [93].

Na tentativa de reduzir a aglomeração, neste estudo a BSA foi utilizada como agente estabilizante. No entanto, o próximo obstáculo foi encontrar a melhor concentração a ser utilizada deste estabilizante, a fim de aprimorar os resultados na busca por um tamanho médio menor das nanopartículas. Diferentes concentrações de BSA foram testadas. Foi possível observar uma redução no tamanho médio das nanopartículas e de PDI utilizando uma concentração final de 0,6 mg/mL de BSA (solução estoque de 6 mg/mL) para os dois tipos de meio. Observamos que a introdução da BSA levou a uma redução significativa do tamanho médio das nanopartículas como também a redução do PDI, quando comparados com a diluição direta das nanopartículas em meio de cultivo.

Quando se iniciaram os estudos *in vitro*, foi possível observar que, ao cultivar os queratinócitos em KGM suplementando com 10% FBS, as células rapidamente se diferenciavam e perdiam sua capacidade proliferativa. No meio KGM sem soro, permaneciam com o seu fenótipo e com sua capacidade proliferativa aumentada. Devido a esse fato, optamos por trabalhar com o meio KGM puro, sem soro, como já descrito na literatura [94]. Após esta evidência, foi necessário otimizar novamente a estabilidade das nanopartículas no meio KGM. Neste meio, foi necessário aumentar a concentração de BSA, assim como o volume adicionado para que tivesse uma boa estabilização das nanopartículas. Possivelmente, a ausência de SFB, que apresenta em sua formulação BSA, levou a uma maior aglomeração das nanopartículas e, devido a isso, uma maior concentração de BSA foi necessária (concentração final de 75,2 mg/mL).

A carga de superfície das nanopartículas pode ser examinada por medidas de potencial zeta. Os resultados de potencial zeta mostraram que as nanopartículas de TiO₂ mudam de um valor de potencial zeta negativo em água desionizada, para um valor maior quando dispersos em ambos os meios de cultivo, com e sem BSA. A

alteração do valor do potencial zeta se deve à complexidade do meio de cultura celular, que possui várias espécies iônicas, assim como uma mistura de diferentes quantidades de aminoácidos, vitaminas e glicose. A adsorção de proteínas do meio de cultivo à superfície das nanopartículas possivelmente atenua o efeito de aglomeração produzido por alterações desfavoráveis no pH e na força iônica [89].

Como os resultados de potencial zeta demonstraram alterações nos seus valores e estes podem ser devidos à adsorção de espécies iônicas e proteicas, análises de EDS e proteômica foram realizadas.

Por EDS foi possível observar a adsorção preferencial de cálcio (Ca) e fósforo (P) assim como de enxofre (S) derivado dos meios de cultivo à superfície das nanopartículas, para ambos os meios. Não foram encontradas diferenças significativas no teor dos elementos S e P. O mapa de Ca revelou uma ligeira diminuição no seu conteúdo no meio KGM uma vez que o conteúdo deste elemento neste meio é inferior quando comparado com o DMEM (0,1 mM de Ca no meio KGM suplementado com 10% de SFB e 0,2 mM de Ca no meio DMEM suplementado com 10% de SFB) [95-96]. A partir da literatura, sabe-se que os cátions divalentes, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , dos meios de cultura podem atuar como uma ponte eficaz para ligar moléculas negativamente carregadas da proteína BSA a superfícies carregadas negativamente de TiO_2 [95]. No entanto, estas adsorções de cátions foram também observadas quando nanopartículas de rutilo foram incubadas em ambos os meios, sem SFB e sem estabilização por BSA, sugerindo que a sua adsorção é independente de proteínas específicas e estaria relacionada com as propriedades superficiais do rutilo. Kokubo *et al.* (2004) explicaram como acontece a adsorção de íons, mostrando que a superfície do titânio apresenta grupos *ativos* hidroxilados (OH), que promovem sítios ativos para a adsorção de cálcio e fosfato. No presente estudo foi possível observar que as forças eletrostáticas fizeram que os grupos *ativos* hidroxilados, que são carregados negativamente, se combinassem com os íons de cálcio carregados positivamente (Ca^{2+}) dos meios de cultura [97].

Após o contato com fluidos biológicos, as nanopartículas são expostas à uma mistura complexa de proteínas capazes de formar uma proteína corona na superfície das nanopartículas [47-50,98]. A proteína corona tornou-se um tema predominante devido ao seu papel na determinação do destino final biológico dos

nanomateriais [67,98-101]. Por exemplo, a formação de uma proteína corona na superfície das nanopartículas pode modificar suas propriedades físico-químicas, como por exemplo a carga superficial e interferir nas suas funcionalidades nos microambientes biológicos, tais como captação celular, inflamação, acumulação, degradação e depuração [98]. Também é importante ressaltar que as superfícies das nanopartículas podem induzir mudanças conformacionais de uma proteína adsorvida podendo afetar a bio-reatividade das nanopartículas [98,101]. As interações proteínas-nanopartículas são fortemente influenciadas por fatores como as propriedades físico-químicas das nanopartículas, distribuição de tamanho, composição, forma, estrutura cristalina e revestimentos, bem como o efeito do microambiente biológico [98].

A adsorção de proteínas a nanopartículas de rutilo em meio contendo soro também foi investigada neste estudo para ambos os meios. Através do gel de poliacrilamida foi possível observar diferentes proteínas adsorvidas às nanopartículas de rutilo em ambos os meios, contudo, proteínas comuns também foram observadas. Esses resultados foram analisados por espectrometria de massa, que revelou 57 proteínas em comum, 44 e 40 proteínas diferentes em DMEM e KGM, respectivamente. A principal proteína corona adsorvida às nanopartículas de rutilo, para ambos os meios, foi a albumina, o que já era esperado, pois a BSA foi utilizada como estabilizante. A associação preferida de albumina com as superfícies de TiO_2 , assim como a sua capacidade para ligar vários substratos, já é bem conhecida e relatada [83].

Além da albumina, entre os principais componentes da corona formada estão as proteínas plasmáticas derivadas do soro bovino fetal, que pertencem a cascata de coagulação, como protrombina e alfa 2 macroglobulina e o grupo do complemento. A presença de outras duas proteínas importantes também foi relatada. A trombospondina, que pode ser derivada de plaquetas ativadas, e a fibronectina, que é produzida no fígado e circula no sangue ou é produzida por fibroblastos e imobilizada no soro da matriz extracelular. Tanto a trombospondina como a fibronectina são ligantes específicos para as integrinas, que medeiam a adesão celular à matriz extracelular.

Entre as principais funções associadas a estas proteínas corona, estão a ligação aos íons de cálcio, resposta imune e inflamação. Fazendo uma revisão da literatura, encontramos proteínas semelhantes adsorvidas em diferentes partículas. Morton *et al.* (2009) identificaram proteínas do plasma humano tais como, albumina, complemento C3, complemento (fator H), plaminogênio, IgG, entre outras adsorvidas às superfícies de nanopartículas de poliestireno [102]. Sund *et al.* (2011) mostraram a adsorção de proteínas com fibrinogênio, imunoglobulina, fibrina, albumina, proteínas do complemento e fibronectina, a diferentes nanopartículas, tais como TiO₂ e ZnO, nanotubos de carbono e SiO₂ (dióxido de silício) [103].

A adsorção de proteínas a nanopartículas de rutilo em meio KGM sem soro ainda não foi investigada, no entanto, este meio apresenta poucas proteínas em sua formulação. Entre estas proteínas encontram-se a insulina, epinefrina e a transferrina. As funções associadas a essas proteínas são a de transporte de glicose e de ferro, assim como afinidade pelo cálcio. Deste modo, possivelmente, estas são as proteínas a se adsorverem às nanopartículas, juntamente com o BSA, utilizado na estabilização das nanopartículas.

Neste contexto, as proteínas corona, bem como a adsorção de íons formam um bio-complexo que pode ser relevante para a internalização das nanopartículas, seu destino dentro da célula e seu efeito na biologia celular e/ou patologia. Por exemplo, Deng *et al.* (2011) demonstraram que quando o fibrinogênio, a partir do plasma sanguíneo, se adsorvia à superfície de nanopartículas de ouro, induziam o seu desdobramento (alteração na conformação da proteína, levando a perda de função), que, por sua vez, ativava o receptor Mac-1 (receptor de macrófago) nas células THP-1 (linhagem de monócitos humano) provocando ativação de citocinas inflamatórias [104].

7.4. Estudos toxicológicos com células de pele humana

De modo a tentar compreender a citotoxicidade das nanopartículas de rutilo em células da pele, utilizamos uma cultura primária de fibroblastos e de queratinócitos humanos. Os fibroblastos apresentaram uma morfologia fibroblastóide

característica, enquanto os queratinócitos cultivados com KGM suplementando com 10% apresentaram morfologia característica de células diferenciadas e senescentes, como já demonstrado por Yoram *et al.* (2008) [105]. Esta cultura apresentou uma população heterogênea, alterações no tamanho citosólico e no conteúdo das organelas perinucleares assim como perda da capacidade proliferativa. No entanto, quando cultivamos os queratinócito em meio KGM sem soro, observamos uma população mais homogênea, com citoplasma bem definido e boa capacidade proliferativa. Levando estes resultados em consideração, como já mencionado anteriormente, optamos por trabalhar com queratinócitos em meio KGM sem soro.

Existem muitos ensaios toxicológicos padronizados disponíveis para avaliar a resposta a uma substância química. No entanto, até o momento, não existe uma padronização para avaliação da toxicidade de nanopartículas, o que dificulta as comparações entre resultados e o consenso sobre a toxicidade de um material. Como forma alternativa, o que tem sido feito são adaptações dos procedimentos padrões utilizados para outras substâncias [88]. Como por exemplo, a utilização de ISO (Órgão Internacional de Padronização) e *Guias da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development - Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests)*. A *Guideline* da OECD 129 vem sendo implementada como potencial protocolo alternativo validado para avaliar o efeito citotóxico das nanopartículas. Este guia baseia-se na avaliação da viabilidade celular com o vermelho neutro. Este é solúvel em água e passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos. Algumas substâncias, muitas das vezes, danificam as membranas celulares resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Desta forma, é possível distinguir entre células vivas e mortas ou danificadas, pela medida de intensidade de cor na cultura de células, por espectrofotômetro [106].

Os nossos resultados sugerem que as nanopartículas de rutilo interferem com o método de análise (vermelho neutro), uma vez que foi observado um aumento significativo da absorbância no grupo controle à medida que a concentração de nanopartículas aumentava. Contudo ensaios adicionais são necessários para confirmar esta interferência.

Guadagnini *et al.* (2013) demonstraram que nanopartículas de TiO₂ e de óxido de ferro interferiram nos ensaios de vermelho neutro e MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Eles também demonstram que o aumento dos valores de absorvância para estes corantes pode ser atribuído às propriedades de adsorção de luz destas nanopartículas [107]. Holder *et al.* (2012) demonstraram que além dos ensaio de MTT, o LDH (lactato desidrogenase) também interfere com nanopartículas produzindo uma falsa avaliação da toxicidade [108].

Devido a este problema, a viabilidade celular, para ambos tipos celulares, foi analisada por citometria de fluxo após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de nanopartículas, 0 µg/mL (controle), 10 µg/mL, 46,4 µg/mL e 100 µg/mL, utilizando marcação para anexina V e Iodeto de propídeo (PI). Este tipo de marcação já está bem descrito na literatura sendo uma das mais utilizadas para identificar e quantificar células apoptóticas e necróticas por citometria de fluxo [109-110].

A anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídios de membrana e possui alta afinidade por fosfatidilserina. Levando em consideração que a fosfatidilserina é predominantemente voltada para a superfície interna da bicamada lipídica em células viáveis, nas células em início da apoptose as membranas plasmáticas sofrem uma desorganização o que faz com que as fosfatidilserinas sejam translocadas para a porção externa da bicamada, tornando a anexina V um bom marcador de células apoptóticas. Em contrapartida, o PI é um marcador nuclear utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas, uma vez que é uma molécula que se intercala no DNA, desde que a membrana da célula tenha perdido a permeabilidade seletiva. Devido ao seu elevado peso molecular, o PI não consegue penetrar em células intactas e por esta razão é um marcador utilizado para identificar células que perderam a integridade da membrana, como ocorre com células em necrose [109].

Os resultados de viabilidade celular demonstraram que no caso dos fibroblastos, não houve diferenças significativas no número de células viáveis nem na taxa de apoptose nas diferentes concentrações de nanopartículas. No entanto, houve uma tendência ao aumento da taxa de necrose para as duas maiores concentrações de nanopartículas, quando comparadas com seu controle. No que diz

respeito aos queratinócitos, houve uma tendência a ao aumento da taxa de apoptose e necrose com o aumento da concentração de nanopartículas. Liu *et al.* (2010) demonstraram a diminuição significativa da viabilidade celular de *PC12* (feocromocitoma de ratos) com concentrações crescentes de TiO_2 , assim como o aumento da apoptose [111]. Outros estudos também demonstraram que nanopartículas de TiO_2 induzem morte por apoptose em diferentes tipos celulares, tais como osteoblastos [112], células da microglia e neurônios [113], células estaminais mesenquimais[114] e necrose em fibroblastos [115].

Sabe-se que a morte por apoptose geralmente ocorre quando há uma alteração significativa do ambiente interno e que as espécies reativas de oxigênio são um fator importante no processo apoptótico. A geração excessiva de espécies reativas de oxigênio induz a permeabilidade da membrana mitocondrial e interfere na cadeia respiratória, desencadeando o processo apoptótico [116]. Wright *et al.* (2017) demonstraram em células HaCat (linhagem de queratinócitos normais de humanos), que os níveis de espécie reativa de oxigênio aumentaram imediatamente após o tratamento com nanopartículas de TiO_2 , sendo este o precursor da morte celular [117].

O ciclo celular de uma célula é definido como a sequência de acontecimentos que levam ao crescimento e a sua divisão, de forma contínua e repetitiva. O ciclo celular está dividido em 4 fases: fase G1 (que significa intervalo (Gap)), durante a qual a célula cresce e restabelece o tamanho normal, fase S (síntese) durante a qual a célula duplica não somente seu DNA, mas todas as estruturas celulares, aumentando assim , de modo significativo, seu tamanho, fase G2, a célula se prepara para a divisão celular, sintetizando proteínas específicas para produção do fuso mitótico e verificando fatores restritivos à sua progressão e a fase M (mitose) quando ocorre a divisão celular propriamente dita [118]. O ciclo celular foi analisado por citometria de fluxo e não observamos diferenças estatisticamente significativas no percentual de células nas fases G1 e S/G2 nas diferentes concentrações de nanopartículas para os dois tipos celulares. Assim como nossos resultados, Chieh-*et al.* (2016) demonstraram que a exposição de TiO_2 às células epiteliais brônquicas não gerou diferenças significativas no ciclo celular [119].

Tucci *et al.* (2013) também demonstraram que a exposição de TiO₂ não gerou diferenças significativas nas fases do ciclo celular de queratinócitos (HaCaT) [76].

Contudo, por microscopia óptica conseguimos observar uma redução do número de células com o aumento da exposição de nanopartículas. A redução da quantidade de células é visível, assim como alterações na morfologia e o aumento do acúmulo de nanopartículas no citoplasma. Com intuito de fazer uma quantificação nas diferentes concentrações, realizamos contagens após 48 horas de exposição para ambos os tipos celulares, de modo a complementar os resultados obtidos por citometria de fluxo. Observamos que para os fibroblastos houve uma redução significativa no número de células com o aumento da concentração, já para os queratinócitos, só foi encontrada uma redução significativa do número de células para aquelas tratadas com 100 µg/mL de nanopartículas. Sugerimos que as nanopartículas de rutilo deixam de alguma forma as células mais sensíveis, principalmente com o aumento das concentrações de nanopartículas. Desta forma, a redução no número de células para maiores concentrações de nanopartículas seria explicada tendo em vista que, durante as trocas de meio, possivelmente as mais sensíveis foram removidas.

7.5. Estudos de internalização das nanopartículas nas células de pele

Uma vez que os bio-complexos formados em torno das nanopartículas de rutilo interagem com as membranas celulares e predizem uma relação com a internalização das nanopartículas, realizamos um estudo da internalização de nanopartículas de rutilo por MET, utilizando os dois tipos celulares estudados. Pelas micrografias confirmamos o papel ativo do bio-complexos no comportamento celular, indicando sua internalização em ambas as células da pele humana. Possivelmente, as proteínas de membrana como a fibronectina e trombospondina, que foram identificadas adsorvidas nas superfícies das nanopartículas, poderiam estar envolvidas na internalização das mesmas em fibroblastos. Por outro lado, é possível que as proteínas epinefrina e transferrina possam estar adsorvidas às superfícies das nanopartículas facilitando a sua internalização em queratinócitos. A internalização de nanopartículas em linhagens celulares da pele já foi documentada

por outros autores [83-84,120]. Chieh- *et al.* (2016), estudaram a internalização de diferentes tamanhos de nanopartículas de TiO₂ em diferentes tipos celulares, entre eles, linhagem de fibroblastos da mucosa oral (OMFs), linhagem de células epiteliais brônquicas humanas normais (BEAS) e linhagem de fibroblastos pulmonares (WI-38) [119]. Foi demonstrada internalização dos diferentes tamanhos de nanopartículas em todos os tipos celulares, sugerindo a incorporação por endocitose. Além disso, houve migração preferencial das nanopartículas para a região perinuclear, em todos os tipos celulares estudados.

Observamos por MET formação de projeções citoplasmáticas próximas às nanopartículas, sugerindo uma indução mediada pelo receptor de macro endocitose. Em ambos os casos observaram-se nanopartículas dentro de diferentes vesículas delimitadas por membrana, acumuladas principalmente na área perinuclear. Resultado esse que pode ser explicado, uma vez que, organelas como lisossomos, possuem função de degradação e digestão de partículas originárias do meio exterior ou mesmo interno. Com as maiores concentrações de nanopartículas, as vesículas citoplasmáticas foram ocasionalmente danificadas, levando à liberação das nanopartículas e, conseqüentemente, dispersão destas no citoplasma. Já foi relatado que as nanopartículas podem absorver prótons, induzindo a ruptura da vesícula através do inchaço e um aumento da pressão osmótica [120].

É importante salientar que todos os ensaios com fibroblastos e queratinócitos humanos foram realizados em cultura de monocamada, o que é diferente da estrutura da nossa pele, que possui a camada cornea capaz de proteger contra a entrada das nanopartículas e subsquentes alterações na viabilidade celular.

Consideramos importante caracterizar cuidadosamente as propriedades físico-químicas dos nanomateriais nos sistemas biológicos antes de quaisquer estudos toxicológicos *in vitro*. A atual literatura de toxicologia carece de dados que permitam aos toxicologistas e órgãos reguladores desenvolver "regras básicas" que possam ser usadas para avaliar os possíveis riscos gerados. A falta de caracterização da partícula pode levar pesquisadores a obter diferentes resultados utilizando os mesmos materiais, devido a diferenças sutis da partícula ou até mesmo

devido a pequenas variações no meio de dispersão usado, gerando conflitos nos resultados das propriedades das partículas e nos resultados de toxicidade [121].

A informação sobre as características da nano-bio interface é crucial para a compreensão da relação entre as propriedades físico-químicas dos nanomateriais e sua toxicidade. Desde há muito tempo os cientistas têm se interessado em estudar a toxicidade dos nanomateriais em ambientes biológicos sem considerar as propriedades da nano-bio interface. Até o momento, os requisitos da OCDE sobre as propriedades físico-químicas dos nanomateriais fabricados não levam em conta o entendimento da nano-bio interface. Do nosso ponto de vista, pode-se sugerir que o bio-complexo gerado em torno das nanopartículas de rutilo é formado por meio de um processo dinâmico com diferentes padrões temporais, como uma possível “impressão digital” para as nanopartículas reconhecidas pelas células da pele (ver Fig. 21).

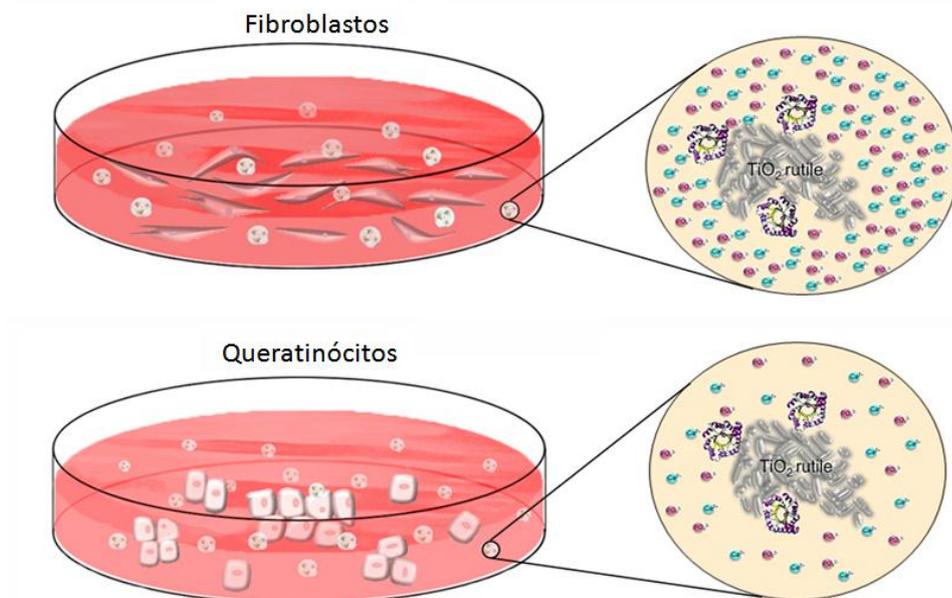


Figura 24. Modelo meramente ilustrativo do bio-complexo de proteína e íons adsorvidos às nanopartículas: Note que a quantidade de adsorção de Ca e P é maior em DMEM 10% SBF comparando com KGM. Isto acontece devido a quantidade de íons no meio DMEM ser maior.

Portanto, no presente estudo, sugerimos que as células da pele “sentem e vêem” um bio-complexo constituído principalmente por cálcio, fósforo, bem como

moléculas orgânicas (proteínas) que mascaram as nanopartículas rutilo. A ação combinada de proteínas e íons é extremamente importante e necessária para a absorção de nanopartículas e o tráfego intracelular. A formação deste bio-complexo pode alterar as atividades biológicas das células podendo facilitar a internalização das nanopartículas *in vitro* [70,100].

8. CONCLUSÃO

Com este trabalho concluímos que:

- ❖ O protetor solar disponível comercialmente apresenta nanopartículas de dióxido de titânio com aglomerados na escala micrométrica e nanométrica;
- ❖ Houve formação de um bio-complexo nas superfícies das nanopartículas devido à adsorção seletiva de íons como cálcio e fósforo e proteínas como albumina, fibronectina e trombospomdina, do meio de cultivo às nanopartículas;
- ❖ No que diz respeito às análises de viabilidade por citometria de fluxo, não houve alterações da viabilidade para os fibroblastos, contudo a viabilidade foi afetada para elevadas concentrações de NPs para os queratinócitos. Tanto para os fibroblastos, quanto para os queratinócitos, não foram encontradas diferenças significativas entre as fases do ciclo celular, contudo o aumento da concentração de nanopartículas levou a uma redução significativa do número de células cultivadas em monocamada.
- ❖ Aparentemente, as nanopartículas são internalizadas por endocitose, tanto nos queratinócitos quanto nos fibroblastos primários da pele humana e que estas, após internalizadas ficam em estruturas microvesiculares que se localizam preferencialmente na região perinuclear.

9. REFERÊNCIAS

1. **Wang, S. Q., Tooley, I.R.**, 2011. Photoprotection in the Era of Nanotechnology, Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery. Frontline Medical Communications: Parsippany, 30, 210–213.
2. **Davis, J., Long T. C., Shatkin, J. A.**, 2010. Nanomaterial case studies: Nanoscale titanium dioxide in water treatment and in topical sunscreen. Environmental Protection Agency. EPA/600/R-09/057F
3. **Fujishima, A., Rao, T. N., Tryk, D.A.**, 2000. Titanium dioxide photocatalysis. Journal of Photochemistry and Photobiology, 1, 1-21.
4. **Jacobs, J. F., Van de Poel, I., Osseweijer, P.**, 2010. Sunscreens with titanium dioxide (TiO₂) nano-particles: A societal experiment. Nanoethics, 4, 103–113.
5. **Pelgrift, R. Y., Friedman, A. J.**, 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. Advanced Drug Delivery Reviews, 65, 1803–1815.
6. **Rahmani, A., Samarghandi, M., Samadi, M., Nazemi, F.**, 2009. Photocatalytic disinfection of coliform bacteria using UV/TiO₂. Journal of Research in Health Sciences,, 9, 1–6.
7. **Sethi, D., Pal, A., Sakthivel, R., Pandey, S., Dash, T., Das, T., Kumar, R.**, 2014. Water disinfection through photoactive modified Titania. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 130, 310–317.
8. **Tsuang, Y. H., Sun, J. S., Huang, Y. C., Lu, C. H., Chang, W.H. S., Wang, C.C.**, 2008. Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles. Artificial Organs, 32, 167–174.
9. **Kongsong, P., Sikong, L., Niyomwas, S., Rachpech, V.**, 2014. Photocatalytic antibacterial performance of glass fibers thin film coated with n-doped SnO₂/TiO₂. The Scientific World Journal, 214, 444-449.

10. **Schilling, K., Bradford, B., Castelli, D., Dufour, E., Nash, J.F., Pape, W., Schulte, S., Tooley, I., van den Bosch, J., Schellauf, F.,** 2010. Human safety review of “nano” titanium dioxide and zinc oxide. *Photochemistry and Photobiology Sciences*, 9, 495–509.
11. **Comissão europeia.** Recommendation on the definition of a nanomaterial (2011/696/EU).
12. **Shi, H., Magaye, R., Castranova, V., Zhao, J.,** 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 10, 15-48.
13. **Hong, F., Yu, X., Wu, N., Zhang, Y.,** 2016. Progress of in vivo studies on the systemic toxicities induced by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Research*, 6, 115-133.
14. **Warheit, D. B, Webb, T. R, Reed, K.L, Sayes, C. M.,** 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology*, 230, 90–104.
15. **Nohynek, G. J., Dufour, E. K., Roberts, M. S.,** 2008. Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacology and Physiology journal*, 21, 136-149.
16. **Miquel-Jeanjean, C., Crepel, F., Raufast, V., Payré, B., Dados, G., Bessou-Touya, S. Duplan, H.,** 2012. Penetration study of formulated nanosized titanium dioxide in models of damaged and sun-irradiated skins. *Photochemistry and Photobiology*, 88, 1513–1521.
17. **Eckes B, Krieq, T.,** 2004. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 33, 77-6.
18. **Dhouailly D, Martinez, I. O., Fliniaux, I., Missier, S., Viallet, J. P., Thelu, J.,** 2004. Skin field formation: morphogenetic events. *The International Journal of Developmental Biology*, 48, 85-91.

19. **Koster M. I., Roop, D. R.,** 2004. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *European Journal of Cell Biology*, 83, 625-629.
20. **Kupper T. S., Fuhlbrigge R. C.,** 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Reviews Immunology*, 4, 211-222.
21. **INCA**, www2.inca.gov.br, acessado em 20 de abril de 2017.
22. **Gerhard J. N., Jurgenn L., Christele, R., Michael, R.,** 2007. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical Reviews in Toxicology*, 37, 251–277.
23. **Cross, S. E., Innes, B., Roberts, M. S., Tsuzuki, T., Robertson, T. A., McCormick, P.,** 2007. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacology and Physiology*. 20, 148–154.
24. **Tyner, K. M., Wokovich, A. M., Doub, W. H., Buhse, L. F., Sung, L.-P., Watson, S. S., Sadrieh, N.,** 2008. Comparing methods for detecting and characterizing metal oxide nanoparticles in unmodified commercial sunscreens. *Nature Nanotechnology*. 4, 145–159.
25. **Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC)**, www.abihpec.org.br, acessado em 20 de abril de 2017.
26. **Masanori., H., Sakiko, S., Haruhisa, K., Yosuke, T., Ayako, N., Yasukazu, Y.,** 2016. Does photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles correspond to photocytotoxicity? Cellular uptake of TiO₂ nanoparticles is important in their photocytotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 1537-6516.
27. **Hirakawa, K., Mori, M., Yoshida, M., Oikawa, S., Kawanishi, S.,** 2004. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, 38, 439–447.
28. **Sanders, K., Degn, L. L., Mundy W. R., Zucker, R. M., Dreher, K., Zhao, B., Roberts, J. E.,** 2012. In vitro phototoxicity and hazard identification of nano-scale titanium dioxide. *Toxicology Applied Pharmacology* 258, 226–236.

29. **Ma, H., Brennan, A., Diamond, SA.,** 2012. Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 2099–2107.
30. **Xiong, S., Tang, Y., Ng, H. S.,** 2013. Specific surface area of titanium dioxide (TiO₂) particles influences cyto- and photo-toxicity. *Toxicology*, 304, 132–140.
31. **Wolf, R., Wolf, D., Morganti, P., Ruocco, V.,** 2001. Sunscreens. *Clinics in Dermatology*, 19, 452-459.
32. **Rampaul, A., Parkin, I.P., Cramer, L.P.,** 2007. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 191, 138–148.
33. **González, S., Lorente, F. M., Calzada, Y. G.,** 2008. The latest on skin photoprotection. *Clinics in Dermatology*, 26, 614-626.
34. **Kullavanijaya, P., Lim, H.W.,** 2005. Photoprotection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52, 937-958.
35. **Jaim, S. K., Jaim, N.K.,** 2010. Multiparticulate carriers for sun-screening agents. *International Journal of Cosmetic Science*, 32, 89-98.
36. **Matej, S., Metka, F., Jana, P., Sasa, N.,** 2011. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiology Oncology*, 45, 227-247.
37. **Wiesenthal, A., Hunter, L., Wang, S.,** 2011. Nanoparticles: small and mighty. *International Journal Dermatology*, 50, 247–254.
38. **Donachie. M. J.,** 1988. *Titanium: A Technical Guide*. American Society for Metals, Metals Park, OH, (ISBN 0-87170-309-2).
39. **Simon, W., Fage, J. M., Stig, S. J., Jacob, P.,** 2016. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact Dermatitis*, 74, 323-345.

40. **Peira, E., Turci, F., Corazzari, I.,**2014. The influence of surface charge and photo-reactivity on skin-permeation enhancer property of nano-TiO in ex vivo pig skin model under indoor light. *International Journal of Pharmaceutics*, 467, 90–99.
41. **Banfield, J. F., Zhang, H.,** 2001. Nanoparticles in the environment. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 44, 1-58.
42. **Burleson, D. J., Driessen, M. D., Penn, R. L.,** 2004. On the characterization of environmental nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering journal*, 39, 2707-2753.
43. **Kamat, P. V.,** 2002. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry*, 106, 7729-7744.
44. **Chiara, U., Patricia, U., Douglas, G., Edyta, B., Eugenia, V. J., Jessica, P., François, R.,**2016. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicology in vitro*, 31, 137-145.
45. **Mano, S. S., Kanehira, K., Sonezaki, S., Taniguchi, U.,** 2012. Effect of Polyethylene Glycol Modification of TiO₂ Nanoparticles on Cytotoxicity and Gene Expressions in Human Cell Lines. *The International Journal of Molecular*, 13, 3703-3717.
46. **Mingsheng, X., Jie, L., Hideo, I., Qingsong, M., Daisuke, F., Huanxing, S., Hongzheng, C., Nobutaka, H.,** 2012. Formation of Nano-Bio-Complex as Nanomaterials Dispersed in a Biological Solution for Understanding Nanobiological Interactions. *Scientific Reports*, 2, 406-412.
47. **Keselowsky, B. G., Collard, D. M., Garcia, A. J.,** 2004. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. *Biomaterials* 25, 5947–5954.
48. **Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A. Linse, S.,** 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona

- using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 2050–2055.
49. **Lunqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T. & Dawson, K. A.**, 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impact. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 14265–14270.
 50. **Ehrenberg, M. S., Friedman, A. E., Finkelstein, J. N., Oberdorster, G. & McGrath, J. L.**, 2009. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials*, 30, 603–610.
 51. **Ribeiro, A. R., Piperni, S. G., Travassos, R., Lemgruber, L. Silva, R. C., Rossi, A. L., Farina, M., Anselme, K., Shokuhfar, T., Shahbazian-Yassar, R., Borojevic, R., Rocha, L. A., Weeckmann, J., Granjeiro, J. M.**, 2016. Trojan-Like Internalization of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles by Human Osteoblast Cells. *Scientific Reports*, 6, 23615-33626.
 52. **Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S. K., Stauber, R. H.**, 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology*, 8, 772–781.
 53. **Ellingsen, J. E.**, 1991. A study on the mechanism of protein adsorption to TiO₂. *Biomaterials*, 12, 593–696.
 54. **Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S.**, 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 2050–2055.
 55. **Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A.**, 2011. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 2525–2534.

56. **Monteiro-Riviere, N. A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A. O., Riviere, J. E.**, 2011. Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study. *Toxicology Sciences*, 123, 264–280.
57. **Sadrieh, N., Wokovich, A. M., Gopee, N. V., Zheng, J., Haines, D., Parmiter, D., Siitonen, P. H., Cozart, C. R., Patri, A. K., McNeil, S. E., Howard, P. C., Dup, W. H., Buhse, L. F.**, 2010. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicology Sciences*, 115, 156–166.
58. **Pflucker, F., Hohenberg, H., Holzle, E., Will, T., Pfeiffer, S., Wepf, R., Diembeck, W., Wenck, H., Gers-Barlag, H.**, 1999. The outermost stratum corneum layer is an effective barrier against dermal uptake of topically applied micronized titanium dioxide. *International Journal of Cosmetic Science*, 21, 399–411.
59. **Filipe, P., Silva, J. N., Silva, R., Cirne, J. L., Marques, G. H., Alves, L. C., Santus, R., Pinheiro, T.**, 2009. Stratum Corneum Is an Effective Barrier to TiO and ZnO Nanoparticle Percutaneous Absorption. *Skin Pharmacology and Physiology*, 22, 266–275.
60. **Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, Bi, L., Xu, H., Yang, X., Zeng, F. D.**, 2009. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology*, 191, 1–8.
61. **Tan, M., Commens, C.A., Burnett, L., Snitch, P.J.**, 1996. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *Australasian Journal Dermatology*, 37, 185–187
62. **Baroli, B., Enna, M. G., Loffredo, F., Isola, M., Pinna, R., López-Quintela, M. A.**, 2007. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *Journal of Investigative Dermatology's*, 127, 1701-1712.
63. **Lekki, J. Stachura, Z., Dąbroś, W., Stachura, J., Menzel, F., Reinert, T., Butz, T., Pallon, J., Gontier, E., Ynsa, M. D., Moretto, P., Kertesz, Z.**

- Szikszi, Z.**, 2007. On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 260, 174–177.
64. **Kimura, E., Kawano, Y., Todo, H., Ikarashi, Y., Sugibayashi, K.**, 2012. Measurement of Skin Permeation/Penetration of Nanoparticles for Their Safety Evaluation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 35, 1476–1486.
65. **Saquib, Q., Al-AA Khedhair, Siddiqui, MA., Abou-Tarboush, F. M., Azam, Um., Musarrat, J.**, 2012. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicology in Vitro*, 26, 351–361.
66. **Foroozandeh, P., Aziz, A. A.**, 2015. Merging Worlds of Nanomaterials and Biological Environment: Factors Governing Protein Corona Formation on Nanoparticles and Its Biological Consequences. *Nanoscale Research Letters*, 10, 221-233.
67. **Choi, S. J., Choy, J. H.**, 2014. Biokinetics of zinc oxide nanoparticles: toxicokinetics, biological fates, and protein interaction. *IJN9 Suppl*, 2, 261–269.
68. **Cynthia, L. B., Therry, T., Michael, D. Mason, John, P. W.**, 2014. Titanium Dioxide Nanoparticles are not Cytotoxic or Clastogenic in Human Skin Cells. *Journal Environmental & Analytical Toxicology*, 4, 239-254.
69. **Stearns R.C., Paulauskis J.D., Godleski J.** 2001. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24, 108–115.
70. **Shukla, R. K., Sharma, V., Pandey, A. K., Singh, S., Sultana, S., Dhawan, A.**, 2011. Genotoxicidade mediada por ROS induzida por nanopartículas de dióxido de titânio em células epidérmicas humana. *Toxicology In Vitro*, 25, 231-241.
71. **Sayes, C.M., Wahi, R., Kurian, P. A.**, 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *ToxicolSci*, 92, 174–185.

72. **Jaeger, A., Weiss, D. G., Jonas, L., Kriehuber, R.,** 2012. Oxidative stress induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes. *Toxicology*, 296, 27–36.
73. **Yin, J. J., Liu, J., Ehrenshaft, M., Roberts, J. E., Fu, P. P., Mason, R. P., Zhao, B.,** 2012. Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes—generation of reactive oxygen species and cell damage. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263, 81–88.
74. **Ghiazza, M., Alloa, E., Oliaro-Bosso, S., Viola, F., Livraghi, S., Rembges, D., Capomaccio, R. B., Rossi, F., Ponti, J., Fenoglio, I.,**2014. Inhibition of the ROS-mediated cytotoxicity and genotoxicity of nano-TiO₂ toward human keratinocyte cells by iron doping. *Journal of Nanoparticle Research*, 16, 1–17.
75. **Park, Y. H., Jeong, S. H., Yi, S. M., Choi, B. H., Kim, Y. R., Kim, I. K., Kim, M. K., Son, S. W.,** 2011. Analysis for the potential of polystyrene and TiO₂ nanoparticles to induce skin irritation, phototoxicity, and sensitization. *Toxicology In Vitro*, 25, 1863–1869.
76. **Tucci P., Porta, G., Agostini, M., Dinsdale, D., Lavicoli, I., Cain, K., Finazzi-Agró, A., Melino, G., Willis, A.,**2013. Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes. *Cell Death and Disease*, 4, 549-560.
77. **Taurozzi, J. S., Hackley, V. A., Wiesner, M. R.,** 2013. A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. *Nanotoxicology*, 7, 389–401.
78. **BRASIL a, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução de Diretoria Colegiada N^o 47, de 16 de março de 2006. (D.O.U. 20/03/2006).
79. **Oberdörster G.,** 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*, 267, 89-105.

80. **Tilly, T. B., Kerr, L. L., Braydich-Stolle, L. K., Schlager, J. J., Hussain, S. M., 2014.** Dispersions of geometric TiO₂ nanomaterials and their toxicity to RPMI 2650 nasal epithelial cells. *J Nanopart Res*, 16, 1–15.
81. **Huei-Siou, C., Chaochin, S., Ji-Lian, C., Tsai-Yin, Y., Nai-Mu, H., Wen-Ren, L., 2011.** Preparation and Characterization of Pure Rutile TiO₂ Nanoparticles for Photocatalytic Study and Thin Films for Dye-Sensitized Solar Cells. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 869618-869624.
82. **Kowalski, P. M., Meyer, B., Marx, D., 2009.** Composition, structure, and stability of the rutile TiO₂ (110) surface: Oxygen depletion, hydroxylation, hydrogen migration, and water adsorption, *Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics*, 79, 115410-115426.
83. **Murray, C. B., Norris, D. J., Bawendi, M. G., 1993.** Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society*, 115, 8706-8715.
84. **Taurozzi, J. S., Hackley, V. A., Wiesner, M. R., 2011.** Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. *Nanotoxicology*, 5, 711–729.
85. **Wu, W., Ichihara, G., Suzuki, Y., Izuoka, K., Oikawa-Tada, S., Chang, J., Sakai, K., Miyazawa, K., Porter, D., Castranova, V., Kawaguchi, M., Ichihara, S., 2014.** Dispersion Method for Safety Research on Manufactured Nanomaterials. *Industrial Health*, 52, 54–65.
86. **Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., Coester, C., Tuomi, T., Rehberg, M., Krombach, F., 2008.** Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle and Fibre Toxicology*, 5, 14-28.
87. **Vasykiv, O., Sakka, Y., 2001.** Synthesis and Colloidal Processing of Zirconia Nanopowder. *Journal of the American Ceramic Society*, 84, 2489-2494.

88. **Taurozzi, J. S., Hackley, V. A., Wiesner, M. R.,** 2010. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment - issues and recommendations. *Nanotoxicology*, 5, 711-729.
89. **Taurozzi, J. S., Hackley, V. A., Wiesner, M. R.,** 2012. A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. *Nanotoxicology*, 7, 389-401.
90. **Payne, C. C., Fleischere, C. K.,** 2014. Secondary Structure of Corona Proteins Determines the Cell Surface Receptous Used by Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry*, 118, 14017-14026.
91. **Guiot C., Spalla O.,** 2013. Stabilization of TiO₂ nanoparticles in complex medium through a pH adjustment protocol. *Environmental Science & Technology*. 47, 1057-1064.
92. **Ji, Z. X., Jin, X., George, S., Xia, T. A., Meng, H. A., Wang, X.,** 2010. Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. *Environmental Science & Technology*, 44, 7309–7314.
93. **Maliheh, H. N., Mostafa, R., Ali, R. N., Hamed, M., Reza, N., Hadi, H., Majid, J., Mahdi, S.,** 2015. Stabilizing and dispersing methods of TiO₂ nanoparticles in biological studies. *Journal of Paramedical Sciences*, 6, 2008-4978.
94. **Yoram, S., Zeev, M., Yael, L., Lilian, V., Rami, N., François, M. B., Yoram, M.,** 2008. Aged keratinocyte phenotyping: Morphology, biochemical markers and effects of dead sea minerals. *Experimental Gerontology*, 43, 947–957.
95. **Horie, M., Nishio, K., Fujita, K., Endoh, S., Miyauchi, A., Saito, Y., Iwahashi, H.,** 2009. Protein Adsorption of Ultrafine Metal Oxide and Its Influence on Cytotoxicity toward Cultured Cells. *Chemical Research Toxicology*, 22, 543–553.
96. **Lamb, R., Ambler, C. A.,** 2013. Keratinocytes Propagated in Serum-Free, Feeder-Free Culture Conditions Fail to Form Stratified Epidermis in a Reconstituted Skin Model. *PLoS ONE*, 8, 52494-52502.

97. **Kokubo, T., Kim, H. M., Kawashita, M., Nakamura, T.,** 2004. Bioactive metals: preparation and properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15, 99-107.
98. **Foroozandeh, P., Aziz, A. A.,** 2015. Merging Worlds of Nanomaterials and Biological Environment: Factors Governing Protein Corona Formation on Nanoparticles and Its Biological Consequences. *Nanoscale Research Letters*, 10, 221-233.
99. **Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K.,** 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, 17-71.
100. **Shukla, R. K., Kumar, A., Vallabani, N., Pandey, A. K.,** 2014. Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. *Nanomedicine*, 9, 1423–1434.
101. **Oberdörster, G.,** 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* 2, 8-43.
102. **Morton, S. E., Alan, E. F., Jacob, N. F.,** 2009. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials*, 30, 603–610.
103. **Sund, J., Alenius, H., Vippola, M., Savolainen, K., Puustinen, A.,** 2011. Proteomic Characterization of Engineered Nanomaterial–Protein Interactions in Relation to Surface Reactivity. *American Chemical Society Nano*, 5, 4300–4309
104. **Deng, Z. J., Liang, M., Monteiro, M., Toth, I., Minchin, R. F.,** 2011. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotechnology*, 6, 39–44.
105. **Yoram, S., Zeev, M., Yael, L., Lilian, V., Rami, N., François, M. B., Yoram, M.,** 2008. Aged keratinocyte phenotyping: Morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals. *Experimental Gerontology*, 43, 947–957.

106. **Fan C., Chen C., Fu J. W. X., Ren Z., Wang G. Q.,** 2015. Black Hydroxylated Titanium Dioxide Prepared via Ultrasonication with Enhanced Photocatalytic Activity. *Scientific Reports.* 5, 11712-11722.
107. **Guadagnini, R., Halamoda, K. B., Walker, L., Pojana, G., Magdolenova, Z.,** 2015. Toxicity Screenings of Nanomaterials: Challenges Due to Interference With Assay Processes and Components of Classic in Vitro Tests, *Nanotoxicology*, 9, 13-24.
108. **Amara L., Holder, R. G., Donald, L., Catherine, P. K.** 2012. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chemical Research in Toxicology*, 25, 1885–1892.
109. **Zucker, R. M., Ortenzio, J. N., Boyes, W. K.,** 2016. Characterization, detection, and counting of metal nanoparticles using flow cytometry. *Cytometry Part A*, 89, 869-883.
110. **Stoyan, T., Wenbo, S., James, P., Valery, V. T., Vladimir, P. Z.,** 2009. Flow Cytometry with Gold Nanoparticles and their Clusters as scattering Contrast Agents: FDTD Simulation of Light-Cell Interaction. *Journal of Biophotonics*, 2, 505-520.
111. **Liu, S, Xu, L., Zhang, T., Ren, G., Yang, Z.,** 2010. Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology*, 267, 172–177.
112. **Pioletti, D.P., Takei, H., Kwon, S.Y., Wood, D., Sung, K.L.,** 1999. The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research* 46, 399–407.
113. **Long, T.C., Tajuba, J., Sama, P., Saleh, N., Swartz, C., Parker, J., Hester, S., Lowry, G.V., Veronesi, B.,** 2007. Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environmental Health Perspectives* 115, 1631–1637.
114. **Wang, M.L., Tuli, R., Manner, P.A., Sharkey, P.F., Hall, D.J., Tuan, R.S.,** 2003. Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in

response to titanium particles. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 21, 697–707.

115. **Osano, E., Kishi, J., Takahashi, Y.**, 2003. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 17, 41–47.
116. **Jezek P., Hlavatá L.**, 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 2478-2503.
117. **Wright, C., Anand, K. V., Lyer, L. W., Nianqiang, W., Juan, S. Y., Yon, R., Neelam, A.**, 2017. Effects of titanium dioxide nanoparticles on human keratinocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 40, 90-100.
118. **Bruce, A., Alexander, J., Julian, L., Martin, R., Keith, R., Peter, W.**, 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 4th edition, 1616.
119. **Chieh-Wei, C., Jing-Hong, H., Tsung-Ching, L., Yi-Hua, J., Michael, H., Chung-Hsuan, C., Yeu-Kuang, H., Ru-Shi, L.**, 2016. Evaluation of the intracellular uptake and cytotoxicity effect of TiO₂ nanostructures for various human oral and lung cells under dark conditions. *Toxicology Research*, 5, 303-311.
120. **Zhao, Y., Howe, J. L. C., Yu, Z., Leong, D. T., Chu, J. J. H., Loo, J. S. C., Woei Ng, K.**, 2012. Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles Induces Autophagy in Primary Human Keratinocytes. *Small*, 9, 387–392.
121. **Iversen, T. G., Skotland, T., Sandvig, K.**, 2011. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6, 176–185.