

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio dopadas
ou não com európio em queratinócitos humanos

Felipe Fernandes de Oliveira

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel
em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio dopadas
ou não com európio em queratinócitos humanos

Felipe Fernandes de Oliveira

Orientador: Jair Pereira da Cunha Junior

Co-orientadora (a): Hellen Dayane Silva Borges

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel
em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio dopadas
ou não com európio em queratinócitos humanos

Felipe Fernandes de Oliveira

Orientador: Jair Pereira da Cunha Junior

Co-orientadora (a): Hellen Dayane Silva Borges

Homologado pela Coordenação do Curso de Biotecnologia em __/__/____

Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio dopadas
ou não com európio em queratinócitos humanos

Felipe Fernandes de Oliveira

Aprovado pela Banca Examinadora em: __/__/____ Nota: _____

Jair Pereira da Cunha Junior

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família que sempre me apoiou em todas minhas decisões, minha mãe Vanderli, meu pai Ronaldo e minha irmã Laryssa.

Aos meus amigos que me acompanharam nessa jornada biotecnológica, Serena, Fernanda e Vinícius, foi mais divertido com a companhia de vocês. À todos os outros colegas que foram sempre gentis.

Ao Lucas por ser um amigo tão agradável quanto o sopro de uma brisa numa tarde de verão.

À Tatiana por ser a secretária mais prestativa que um curso possa ter, sua eficiência é memorável.

À todos os professores que me ajudaram a conquistar conhecimento, não teria sido possível sem vocês.

Ao Jair, por ser um orientador atencioso e me apoiado com ideias e conhecimento.

À minha co-orientadora Hellen que me ajudou com sua expertise em cultura de células, seu conhecimento foi crucial para a realização desse trabalho.

À todas pessoas que tenham me ajudado a alcançar meus objetivos.

RESUMO

As nanopartículas possuem diversos usos de acordo com suas características físico-químicas apresentadas em seus variados tamanhos. Podem estar presentes em diversos produtos de uso no cotidiano. As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO), por exemplo, por apresentarem capacidade de absorção e reflexão do espectro ultravioleta (UV) são utilizadas em protetores solares. Embora sejam usadas em larga escala, as interações destas nanopartículas com a pele humana podem causar danos e esse efeito deve ser estudado. Assim, o presente estudo visa avaliar a toxicidade destas nanopartículas, em suas versões dopadas e não dopadas com európio, em cultura de células de queratinócitos humanos (HaCat), com a finalidade de observar a alteração morfológica celular desencadeada por essas nanopartículas e se há produção da citocina interleucina 8 (IL-8), citocina altamente secretada por esse tipo celular em processo inflamatório. As células foram incubadas por 24 horas com as nanopartículas de TiO_2eZnO nas concentrações 0,1; 1; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. A análise morfológica em microscopia de contraste de fase não mostrou alteração na morfologia das células em nenhum dos tratamentos com as diferentes concentrações testadas. O tratamento das células HaCat com as nanopartículas não estimulou a produção de IL-8, indicando que as nanopartículas não provocaram uma inflamação em células HaCat. Os dados sugerem que estas nanopartículas não possuem caráter tóxico às células HaCat, visto que em nenhum dos tratamentos apresentou alterações na viabilidade celular. No entanto, testes adicionais são necessários para confirmar a concentração máxima que pode ser utilizada dessas nanopartículas sem alterar a viabilidade desses tipos celulares. Com base nesses dados, novos ensaios podem ser realizados para avaliar se essas nanopartículas apresentam caráter fotoprotetor após exposição à radiação ultravioleta.

Palavras-chave: Dióxido de titânio, európio, HaCat, nanopartículas, óxido de zinco.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 Pele	2
1.3 Apoptose em queratinócitos	3
1.4 Nanotecnologia	4
1.5 Nanopartículas de ZnO	5
1.6 Nanopartículas de TiO ₂	6
1.7 Európio	7
1.8 Justificativa	7
2 OBJETIVOS	8
2.1 Objetivos gerais	8
2.2 Objetivos específicos	8
3 METODOLOGIA	8
3.1 Cultivo celular	8
3.2 Nanopartículas	9
3.3 Ensaio <i>in vitro</i> da resposta efetora da linhagem de queratinócitos.....	9
3.4 Análise de viabilidade celular.....	10
3.5 Quantificação de IL-8 por ELISA	10
3.6 Análise estatística	11
4 RESULTADOS	11
4.1 Morfologia celular	11
4.2 Viabilidade celular.....	22
4.3 Produção de IL-8	24
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 Irradiância solar e fotoprotetores

Grande parte da extensão territorial do Brasil está localizada na região intertropical do planeta. Na Figura 1 Pereira *et al.*(2017) mostra a irradiância global horizontal diária recebida. Ela é definida como taxa de energia total por área que incide sobre uma superfície horizontal.

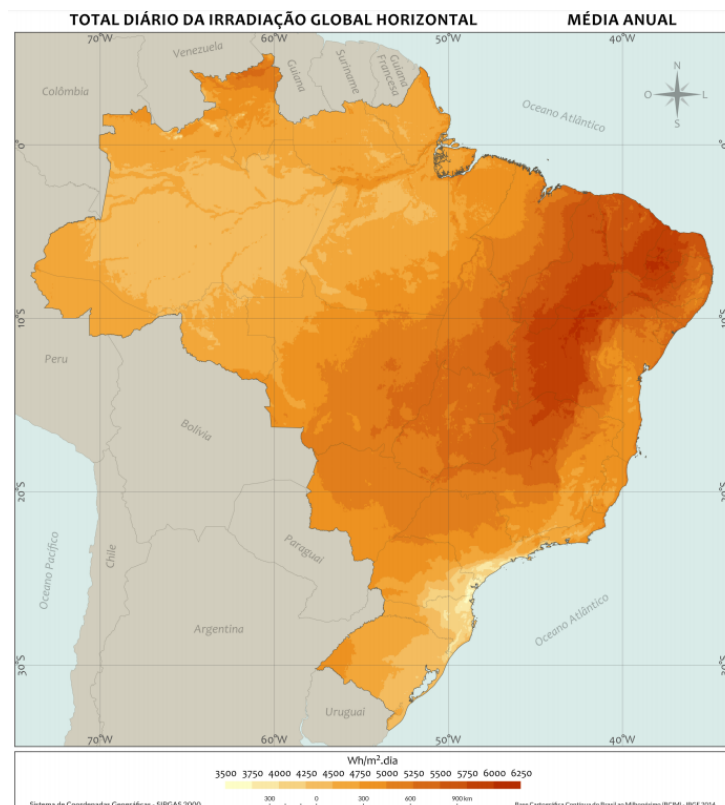


Figura 1: Taxa de irradiância global horizontal recebida diariamente no Brasil montado a partir da média anual de cada localidade (PEREIRA *et al.*, 2017).

Parte do espectro solar irradiado é composto pela radiação ultravioleta (UV) e estudos mostram que ela é o principal agente causador dos cânceres de pele. A radiação UV é dividida em radiações UVA, UVB e UVC, sendo que esta última não possui interação danosa com a superfície da pele. Apesar da radiação UVA compor 95% do espectro UV, sua capacidade carcinogênica, em outras palavras, capacidade de induzir o surgimento de câncer, é relativamente baixa quando se comparado à radiação UVB, cerca de 10.000 vezes menor. Os raios UVB, apesar de constituírem apenas 5% do espectro, têm um alto potencial carcinogênico e são capazes de danificar o DNA por formar dímeros de pirimidina ciclobutano e fotoprodutos pirimidina-pirimidina, contribuindo ainda com mutações no gene p53 (TYAGI *et al.*, 2015), além de induzir a formação de EROs.

Atualmente diversos protetores solares possuem em sua composição nanopartículas capazes de amenizar a agressão causada na pele pelos raios UV, como nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnO) e de Dióxido de Titânio (TiO₂), por bloquearem a penetração da radiação UV (DRANSFIELD, 2000).

1.2 Pele

A pele desempenha funções vitais à sobrevivência dos animais, como proteção a desidratação, armazenamento de moléculas como carboidratos e gorduras, atividade sensorial a estímulos como dor e frio que são de extrema importância para manter a integridade do corpo, participa da produção da vitamina D₃ e da termorregulação. Além disso, atua como uma eficiente barreira contra estresses ambientais, como atrito e ação da radiação ultravioleta (UV) (VISSCHER, 2009; SODRÉ *et al*, 2004).

É composta por três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme ou camada subcutânea, sendo esta última ligada aos órgãos e onde se encontra o tecido adiposo. A epiderme é subdividida em estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal. O estrato córneo é a camada mais exterior da pele e é composto por queratinócitos em seu estágio final de diferenciação. As células desta camada não possuem núcleo e são altamente queratinizadas, o que confere proteção ao meio exterior. Próximo ao estrato córneo encontra-se o estrato granuloso, onde se é possível notar grânulos de querato-hialina nas células. Estas células ainda são capazes de sintetizar proteínas relacionadas ao processo de queratinização e secretam no meio extracelular diversos lipídeos, que promovem uma barreira à perda de água (SODRÉ *et al*, 2004).

Mais internamente encontra-se o estrato espinhoso, onde os queratinócitos apresentam uma forma poliédrica. Filamentos de citoqueratina e projeções curtas ligadas por desmossomos são perceptíveis, o que confere a esta camada um aspecto espinhoso em cortes histológicos. Nessa camada celular também estão presentes as células de Langerhans, células dendríticas capazes de fagocitar invasores e apresentar antígenos derivados deles em sua membrana plasmática para reconhecimento e ativação do sistema imune, constituindo a primeira barreira caso o estrato córneo seja rompido (SODRÉ *et al*, 2004).

Na camada mais interna da epiderme está o estrato basal ou germinativo que recebe esse nome devido à grande atividade mitótica que nele se encontra. É dele que partem os queratinócitos que irão se diferenciar até chegar à camada mais externa. Os melanócitos também estão no estrato basal e possuem a função de proteção contra a radiação UV por meio da melanina, molécula da qual se derivou seu nome. Ao serem estimulados com radiação UV

os melanócitos transportam a melanina para o núcleo das células epidérmicas com o propósito de proteger o DNA (VISSCHER, 2009; SODRÉ *et al*, 2004).

Na derme estão presentes os vasos sanguíneos e linfáticos, anexos cutâneos e terminações nervosas. É dividida em derme papilar, que contem fibras elásticas que conferem elasticidade à pele, e derme reticular, onde fibras de colágeno promovem proteção ao estiramento (SODRÉ *et al*, 2004).

1.3 Apoptose em queratinócitos

Dentre os diversos processos que mantêm a homeostase do corpo, a apoptose destaca-se com grande importância estando diretamente ligada ao crescimento, desenvolvimento e manutenção de tecidos. Estima-se que em um indivíduo adulto cerca de 50 bilhões de células entram em processo apoptótico todos os dias. Quando se trata da pele, a apoptose se torna um processo crucial, visto que, a proliferação celular e migração de células da camada mais interior até o estrato córneo dependem deste processo. Além disso, é um processo vital no que se tange à eliminação de células que tenham acumulado mutações ou que tenham sofrido danos ao DNA cujo reparo não foi possível (RAJ; BRASH; GROSSMAN, 2006).

Ao longo da vida nossos corpos são expostos diariamente a diferentes compostos químicos: benéficos, alguns sem qualquer tipo de ação e outros extremamente perigosos à saúde. A pele, como principal interface entre o ambiente e o corpo, está sujeita a diversas injúrias promovidas por tais compostos e a apoptose atua eliminando as células danificadas. Um agente nocivo quando em excesso é a radiação UV. As células da pele, quando estimuladas com radiação UV em doses altas e por longo período de exposição, produzem e acumulam radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses radicais livres são capazes de interagir e danificar o DNA. Quando a própria célula não consegue reparar o dano causado em seu material genético, ela inicia o processo de apoptose para impedir que esse dano seja replicado durante a proliferação celular. O dano ao material genético pode causar uma mutação particular no gene p53, responsável por codificar uma proteína de mesmo nome. A proteína p53 atua diretamente no ciclo de divisão celular, impedindo que a mesma ocorra caso exista algum dano irreparável no DNA. Alterações na p53 podem causar resistência à apoptose e conseqüentemente promover proliferação celular descontrolada a partir de uma célula fora do seu estado íntegro (SILVA *et al.*, 2013).

Com base em estudos já publicados sabe-se que a expressão do mRNA que codifica a interleucina 8(IL-8) em queratinócitos humanos é aumentada mediante exposição à radiação UVA, que expressa essa citocina 3 horas pós exposição. Esta citocina além de possuir

atividade pró inflamatória (WU *et al.*, 2008) está também relacionada a algumas doenças dermatológicas, como a dermatite atópica (AMARBAYASGALAN *et al.*, 2013).

1.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar da ciência que trabalha com o desenvolvimento e aplicação de diversos materiais, sistemas e componentes na escala nanométrica variando entre 0,1 a 100 nm (SAHOO; LABHASETWA, 2003). Sua aplicabilidade é vasta. Na área alimentícia pode estar presente em nanopartículas sólidas lipídicas, nanoemulsão, nanoencapsulamento e até mesmo em embalagens com seus polímeros convencionais substituídos por nanocompósitos (ASSIS *et al.*, 2012).

As nanopartículas têm um grande destaque devido às características físico-químicas que seus compostos apresentam em escala nano, sendo sintetizadas e estudadas para diversos fins. Nanopartículas de TiO₂ estão sendo utilizadas junto com água como nanofluido para transferência de calor em processos industriais na metalurgia, química e geração de energia. A transferência é dada por meio de um composto intermediário que irá transportar o calor de uma fonte quente para uma fonte fria e geralmente se usa água ou etileno glicol, porém ambos possuem baixa capacidade térmica quando comparados com sólidos de mesmo uso. Porém, a elaboração de um nanofluido com água, nanopartículas de TiO₂ e estabilizantes permite um aumento na eficiência deste processo (ESFE *et al.*, 2017). Nanopartículas de N-trimetilquitosana utilizadas como nanocarreadores para aciclovir mostrou uma potencialização na biodisponibilidade da droga em testes *in vivo* e *ex vivo* realizados em ratos Wistar (MEDIKONDURI *et al.*, 2016). Além disso, podem atuar também como adjuvante em vacinas, onde o grau de hidrofobicidade da nanocápsula que leva o antígeno define a capacidade da resposta imune que será promovida (SHIMA *et al.*, 2013).

Células epiteliais secretam vesículas extracelulares contendo anexina A1, uma proteína de caráter anti-inflamatório capaz de regenerar a mucosa intestinal. Dessa forma, a administração de anexina A1 exógena encapsulada em nanopartículas poliméricas foi capaz de acelerar feridas no intestino murino induzidas por biópsia e sua aplicação sistêmica acelerou recuperação de feridas causadas por colite induzida, sugerindo que essa possa ser uma estratégia de tratamento para doenças crônicas intestinais (LEONI *et al.*, 2015).

Trabalho feito com “nanoclusters” de ouro (Au-NCs) associados a cisteína averiguou um novo processo de síntese deste compósito para promover maior estabilidade. Au-NCs são biomarcadores com baixa toxicidade, boa biocompatibilidade, propriedades luminescentes com potencial candidato a substituto para quantum dots. Podem ser utilizados em conjunto

com cisteína para diagnósticos para diversas doenças, como edema de fígado e câncer de mama, mas a conjugação com a cisteína resulta em um composto de baixa estabilidade. Este trabalho conseguiu sintetizar o composto com estabilidade de 6 meses, tempo considerável que pode viabilizar seu uso (BORGHEI; HOSSEINI; GANJALI, 2017).

Com base nesses estudos é possível observar que a nanotecnologia e, em especial o desenvolvimento de nanopartículas, é de extrema importância para o desenvolvimento nanobiotecnológico atual com diversos usos na área biomédica destacando a aplicação de nanocarreadores de drogas, adjuvantes vacinais e elaboração de novos métodos de diagnóstico com aplicabilidade no tratamento de doenças.

1.5 Nanopartículas de ZnO

Nanopartículas de ZnO têm sido largamente utilizadas em diversas áreas da indústria devido às suas características físico-químicas. Sua propriedade fotocatalizadora faz com que essas nanopartículas possam ser utilizadas em processos de biorremediação de água presente em medicamentos. Devido a sua capacidade de absorver e refletir a radiação UV, essas nanopartículas se tornaram um excelente componente para fotoprotetores. Em forma de pó podem ser utilizadas em pigmentos, vidros e até mesmo como fonte de Zn em alimentos (HOFFMANN *et al.*, 1995).

Nanopartículas de ZnO possuem atividade antimicrobiana e quando associadas na proporção de 1:1 com ácido cítrico se mostraram um promissor ingrediente para prevenção e tratamento de acne causada pela bactéria *Propionibacterium acnes* (BAE; PARK, 2016). Ação antibacteriana também foi mostrada contra *Staphylococcus aureus* com a atividade inibitória inversamente proporcional ao tamanho da nanopartícula (RAGHUPATHI; KOODALI; MANNA, 2011).

Tratamentos com nanopartículas de diversos óxidos, incluindo o ZnO, em culturas de células de mesotelioma humano MSTO-211H e fibroblasto 3T3 de roedor mostraram que todas as células de ambas linhagens tratadas com nanopartículas de ZnO morreram depois de uma exposição em concentrações acima de 15ppm, sugerindo que a toxicidade do ZnO se deve ao fato da liberação de Zn^{2+} solubilizado no meio (BRUNNER *et al.*, 2006).

Embora existam estudos avaliando a toxicidade das nanopartículas de ZnO, nem todos eles têm como foco a fototoxicidade, ou seja, o quão tóxicas essas nanopartículas podem ser quando expostas à luz, algo pertinente uma vez que elas são encontradas em formulações de fotoprotetores. Em 2011 uma pesquisa utilizando nanopartículas de ZnO no nematóide *Caenorhabditis elegans* nas condições de iluminação artificial e iluminação natural avaliou tal

perspectiva. As nanopartículas de ZnO possuem um gap energético de 3,37 eV (elétron-volt), o que corresponde ao comprimento de onda de 368 nm, e ao serem excitadas com comprimentos de onda inferiores a esse valor interagem com H₂O formando radicais hidroxilas, e com o O₂, reduzindo-o a íons superóxidos, ambos EROs de extrema reatividade nas células. O trabalho mostrou que a iluminação natural promoveu um dano maior em relação à iluminação artificial na presença das nanopartículas em ambos os casos que essa fototoxicidade está diretamente correlacionada à produção de EROs (MA *et al.*, 2011).

O fato de se ter pouca informação sobre a capacidade de penetração das nanopartículas de ZnO na pele intacta, torna seu uso preocupante e se faz necessário avaliar tal processo (VINARDELL *et al.*, 2017).

1.6 Nanopartículas de TiO₂

As nanopartículas de TiO₂ possuem propriedades fotocatalíticas interessantes para tratamento de água com compostos orgânicos. Estudos mostram que sua forma cristalina é capaz de degradar azul de metileno presente na água quando expostos à radiação UV, e tal efeito pode ser maximizado quando a nanopartícula é dopada com Fe³⁺ (SOOD *et al.*, 2015) ou dopada com Fe³⁺ e incrustada com nanopartículas ainda menores de ouro (Au) (PAL; KRYSHI, 2016). Testes realizados com nanopartículas de TiO₂ dopadas com nitrogênio também se mostraram promissores (AZIZI; MOLANI, 2016). Um outro estudo mostrou ainda que essas nanopartículas podem ser utilizadas em matriz polimérica para separação de gases, gerando um poliestireno de alto impacto e baixo custo (SAFAEI; MARJANI; SALIMI, 2016).

Apesar da baixa toxicidade das nanopartículas de TiO₂, o potencial carcinogênico destas nanopartículas já havia sido mostrado por Lee, Trochimowicz e Reinhardt (1985), que estudaram a resposta pulmonar de ratos quando expostos a estas nanopartículas em um intervalo de 2 anos. Por outro lado, estudos mostram que sua capacidade de penetração na pele intacta é mínima atingindo apenas as camadas mais externas do estrato córneo (SENZUI *et al.*, 2010).

Assim como as nanopartículas de ZnO, as nanopartículas de TiO₂ têm um amplo uso e está presente em diversos produtos como pasta de dentes, tratamentos para acne e em fotoprotetores por terem uma boa capacidade de reflexão da radiação UV (CROSERIA *et al.*, 2015). Um estudo mostrou que um bom protetor solar a base de nanopartículas de TiO₂ deve conter uma mistura de nanopartículas entre os tamanhos 50 e 120 nm devido aos diferentes comprimentos de onda que compreendem o espectro UV que cada tamanho consegue refletir (POPOV *et al.*, 2005).

1.7 Európio

Európio (Eu), elemento químico de número atômico 63, tem recebido bastante atenção devido às suas propriedades luminescentes. Sondas feitas com Eu apresentam, em termos de milissegundos, uma longa vida quando comparado a sondas orgânicas, que geralmente duram na escala de nanossegundos (HEFFERN; MATOSZIUK; MEADE, 2013). Diversos estudos com quantum dots trabalham com o Eu como sensores luminescentes (HONG; PEI; GUO, 2012; LANG *et al.*, 2011). Além disso, Eu pode ser usado como material dopante em nanopartículas para alterar suas características. Nanopartículas de BiFeO₃ dopadas com Eu³⁺ apresentaram um aumento em sua propriedade ferromagnética (CHAKRABARTI *et al.*, 2011).

A citotoxicidade e captura de Eu³⁺ em células FaDu, linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide, depende da sua concentração e do meio em que se encontra, podendo se conjugar com proteínas séricas reduzindo sua toxicidade ou formando um composto secundário que reduz a concentração de Eu³⁺ livre e conseqüentemente diminuindo a toxicidade (SACHS *et al.*, 2015).

Biocompatibilidade é um quesito de suma importância quando se trata de compostos e materiais que entram em contato direto com o organismo humano. Um produto com alta eficiência, porém bioincompatível, o torna inviável. Sabe-se que pequenas alterações em nanopartículas, seja em tamanho ou dopagem, alteram seu comportamento e a dopagem com Eu pode ser avaliada a fim de se saber se sua presença induz aumento ou redução da toxicidade das nanopartículas.

1.8 Justificativa

A pele constitui a principal mecanismo de barreira contra agentes externos. Estudos mostram que nanopartículas de TiO₂ e ZnO utilizadas em protetores solares são incapazes de invadir a pele intacta, mas injúrias na mesma podem ser uma porta de entrada para tais partículas. A ação tóxica dessas nanopartículas ainda são pouco conhecidas, portanto é importante a avaliação dessa atividade que deve ser um fator crítico na escolha de qual nanopartícula utilizar na formulação de produtos tópicos.

A nanotecnologia, e em especial o desenvolvimento de nanopartículas, é crucial para a indústria tecnológica, apresentando grande importância na área biomédica onde pode atuar em nanocarreadores de drogas, adjuvantes vacinais e desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico com aplicabilidade no tratamento de diversas doenças.

Com base nessas informações fica evidente a necessidade de observar o efeito dessas nanopartículas em linhagens de queratinócitos humanos, visto que podem ser utilizadas como modelo *in vitro* para avaliação homeostase e patofisiologia da pele em diversas doenças, especialmente porque a dopagem com európio permite reunir maiores informações sobre todas as aplicabilidades das nanonopartículas e capacidade de distribuição e absorção dessas formulações devido às suas propriedades luminescentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar as alterações de morfologia, viabilidade celular e efeitos imunomodulatórios de nanopartículas de TiO₂ e ZnO dopadas ou não com Európio em linhagem de queratinócitos humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular após tratamentos com diferentes concentrações de nanopartículas de TiO₂ e ZnO com e sem dopagem com Európio em células HaCat.
- Avaliar a morfologia dos queratinócitos em microscopia de contraste de fase após o tratamento com as nanopartículas.
- Quantificar a citocina humana IL-8 secretada pelos queratinócitos após o tratamento com as nanopartículas.
- Avaliar se a dopagem com Európio interfere no perfil das nanopartículas nos parâmetros avaliados.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo celular

Os queratinócitos humanos imortalizados utilizados para este experimento foram adquiridos no banco de células do Rio de Janeiro - BCRJ (código BCRJ: 0341). As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm², utilizando meio Dulbecco's Eagles modificado (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO) inativado a 56° C, com 1% de antibiótico (10.000 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina), aminoácidos essenciais e L-glutamina, em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂.

3.2 Nanopartículas

As nanopartículas de óxido de zinco e óxido de zinco dopado com európio (ZnO-Eu), dióxido de titânio e dióxido de titânio dopado com európio (TiO₂-Eu) foram cedidas pelo Professor Dr. Noélio Oliveira Dantas e pela Professora Dr^a Anielle Christine Almeida Silva do Laboratório de Novos Materiais Isolantes Semicondutores do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia. Para suspensão, cada nanopartícula em pó foi pesada e sua massa transferida para um almofariz de ágata onde se adicionou o volume de água necessário para atingir a concentração desejada, o conteúdo foi então macerado para promover sovatação das nanopartículas até atingir uma solução homogênea. A sovatação é necessária para garantir a solubilização completa de cada nanopartícula a fim de evitar a formação de precipitado e garantir a solubilidade ideal das mesmas na cultura de células.

3.3 Ensaio *in vitro* da resposta efetora da linhagem de queratinócitos

A função efetora da linhagem de queratinócitos mantidos em cultura como descrito anteriormente, foi analisada pela produção de IL-8 após estimulação com as diferentes concentrações de nanopartículas de ZnO e TiO₂ dopadas ou não com Eu.

O meio de cultura foi retirado da garrafa e seu interior lavado com PBS 1x. As células foram então tripsinizadas para seu descolamento utilizando 3 mL de solução composta por 0,25% de Tripsina e 0,2% de EDTA preparadas em solução de NaCl 0,9%. Após descolamento das células, a ação da tripsina foi interrompida utilizando meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. O conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo falcon e centrifugado a 400 xG durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio DMEM completo. Uma alíquota foi retirada para contagem celular em Câmara de Neubauer e analisados quanto à viabilidade celular utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripán a 0,4% em PBS 0,01M, pH 7,2 para a utilização em experimentos de estimulação celulares. A concentração celular foi obtida através da seguinte equação:

$$C = n \cdot 2 \cdot 10^4$$

Onde C é a concentração celular e n é o número de células contadas na Câmara de Neubauer.

As células foram transferidas para um placa de cultura de 96 poços na concentração de 10^5 células/poço e incubadas na estufa a 37°C a 5% de CO₂ para crescimento e adesão por 24 horas. Após a aderência das células, foi removido o sobrenadante e a placa foi lavada com PBS 0,01M, pH 7,2 e adicionados os estímulos ZnO (0,1, 1, 10 e 20 µg/mL), ZnO-Eu (0,1, 1,

10 e 20 $\mu\text{g/mL}$), TiO_2 (0,1, 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) e $\text{TiO}_2\text{-Eu}$ (0,1, 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) diluídos em meio incompleto. A placa de cultura foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C para posterior análise da produção de IL-8.

3.4 Análise de viabilidade celular

Após 24 horas de tratamento com as nanopartículas incubadas em estufa a 37°C a 5% de CO_2 , foram adicionados 100 μL do reagente MTT (3-(4,5-dimetiltioazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) por poço e então incubadas por 4 horas. A placa foi centrifugada a 405 xG durante 10 minutos a 18°C . O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan presente nas células foram solubilizados pela adição de 100 μL de solução SDS a 10% e N,N-dimetilformamida. A placa foi incubada *overnight* (18 horas) a temperatura ambiente. Leituras foram realizadas a 570nm em leitor de placas BiotekEpoch para avaliar o efeito sobre a viabilidade celular.

3.5 Quantificação de IL-8 por ELISA

A produção de IL-8 pelas células HaCat tratadas com as nanopartículas de TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Eu}$, ZnO , ZnO-Eu (0,1, 1, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) foi avaliada por meio do ensaio ELISA sanduíche usando o kit de detecção para IL-8 humano (BD OptEIA™). Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com 50 μL de anticorpo monoclonal específico para IL-8 diluído em tampão carbonato de sódio pH 9,5, 0,1 M, na proporção 1:250. A placa foi incubada a 4°C *overnight*. Para bloqueio dos sítios não específicos foram utilizados 150 μL /poço de tampão fosfato de sódio com soro fetal bovino a 10%, pH=9,5, 0,1M por 1 hora. Padrões de IL-8 foram adicionados em cada poço em diluição dupla seriada para a construção da curva padrão e as amostras diluídas em 1:10 utilizando tampão fosfato de sódio com soro fetal bovino a 10% como diluente. A placa foi incubada por 2 horas para que a IL-8 se ligasse ao anticorpo imobilizado. Adicionou-se então o anticorpo anti-IL-8 humano biotilado conjugado com estreptavidina-peroxidase juntamente com estreptavidina, sendo ambos com diluição na proporção de 1:250 e incubados por 1 hora. Lavagens com tampão fosfato de sódio com tween a 0,05% (PBS-T) foi feita entre cada etapa. A revelação foi feita com adição de substrato TMB seguida pela adição da solução de parada (H_2SO_4 , 2N) e a leitura em leitor de placas a 450 e 750 nm. Os valores obtidos foram convertidos em valores concentração usando o software Microplate Reader usando a curva padrão construída a partir de diluições de IL-8 em concentrações conhecidas.

3.6 Análise estatística

O dados obtidos do experimento foram analisados no software GraphPad Prism (versão 5.0) para comparar o efeito dos diferentes tratamentos. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni com significância para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

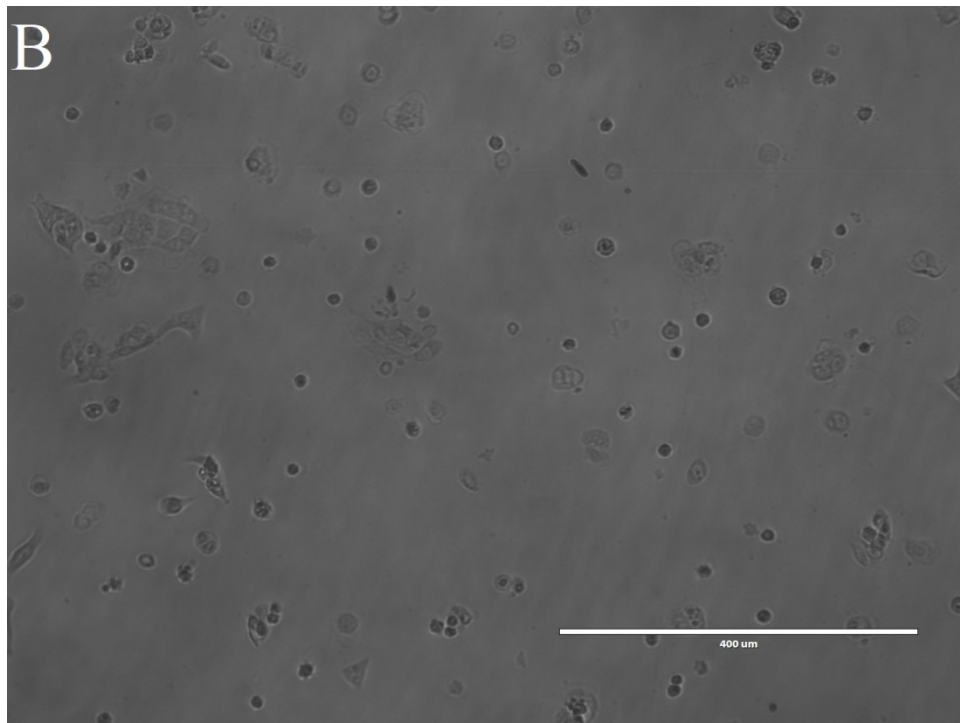
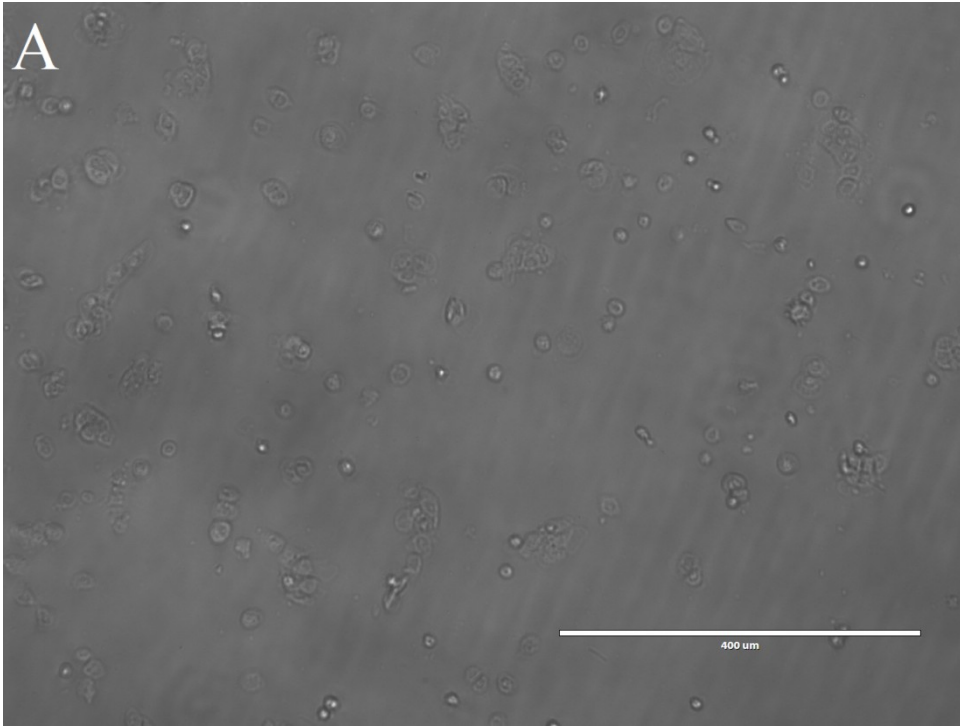
4.1 Morfologia celular

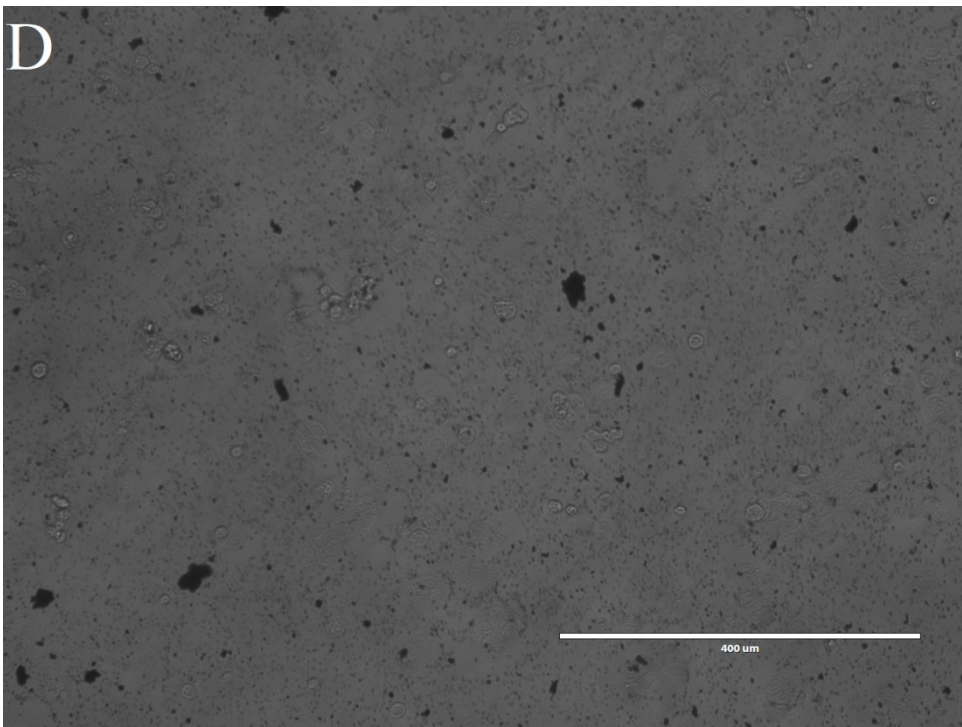
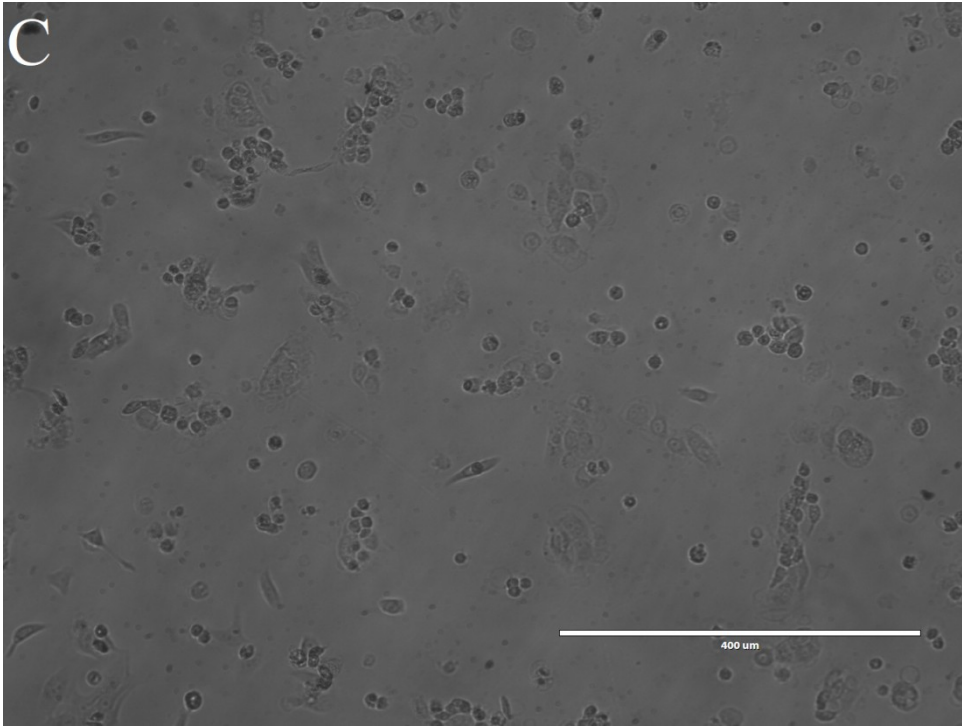
Após 24 horas de estímulo a placa de cultura celular foi analisada em microscopia de contraste de fase para avaliar se houve alteração da morfologia celular. A figura 2 mostra o tratamento com nanopartículas de TiO_2 . A figura 2A representa o controle negativo onde utilizou-se apenas o meio DMEM. É possível perceber que não houve alterações significativas na morfologia das células após o tratamento com as nanopartículas de TiO_2 nas concentrações de 0,1; 1; 10; 20 $\mu\text{g/mL}$ (figuras 2B, 2C, 2D, 2E respectivamente), porém é possível perceber, no entanto, a presença das nanopartículas.

Na figura 3 observa-se as imagens das células quando tratadas com nanopartículas de TiO_2 -Eu. Novamente não é possível perceber alterações morfológicas nas células HaCat em nenhuma das concentrações testadas (figuras 3B, 3C, 3D, 3E) em relação ao controle (figura 3 A).

Já na figura 4 são mostradas a morfologia das células tratadas com as diferentes concentrações nanopartículas de ZnO (figuras 4B, 4C, 4D, 4E) em relação ao controle (figura 4 A). Não é possível perceber alteração morfológica celular.

Quando as células foram estimuladas com as nanopartículas de ZnO -Eu também não houve alteração morfológica celular como mostra a figura 5.





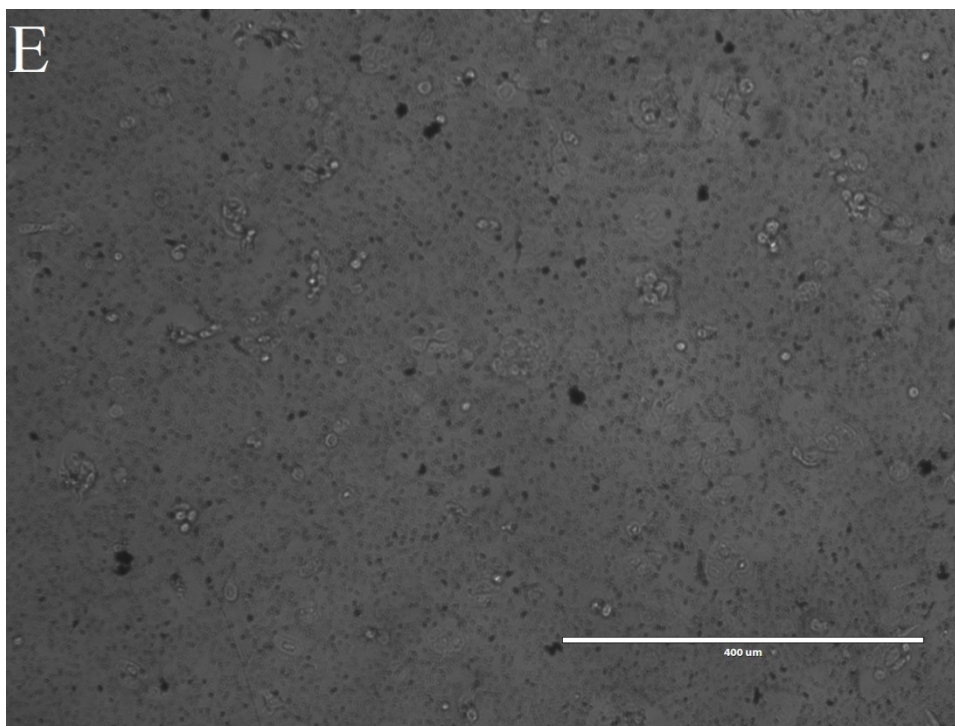
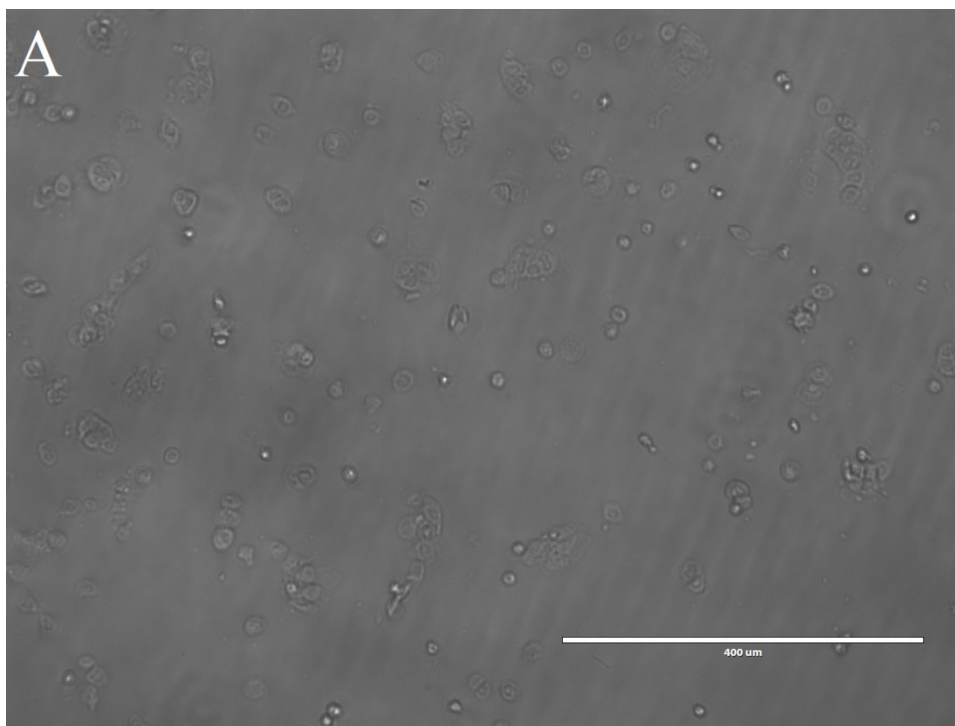
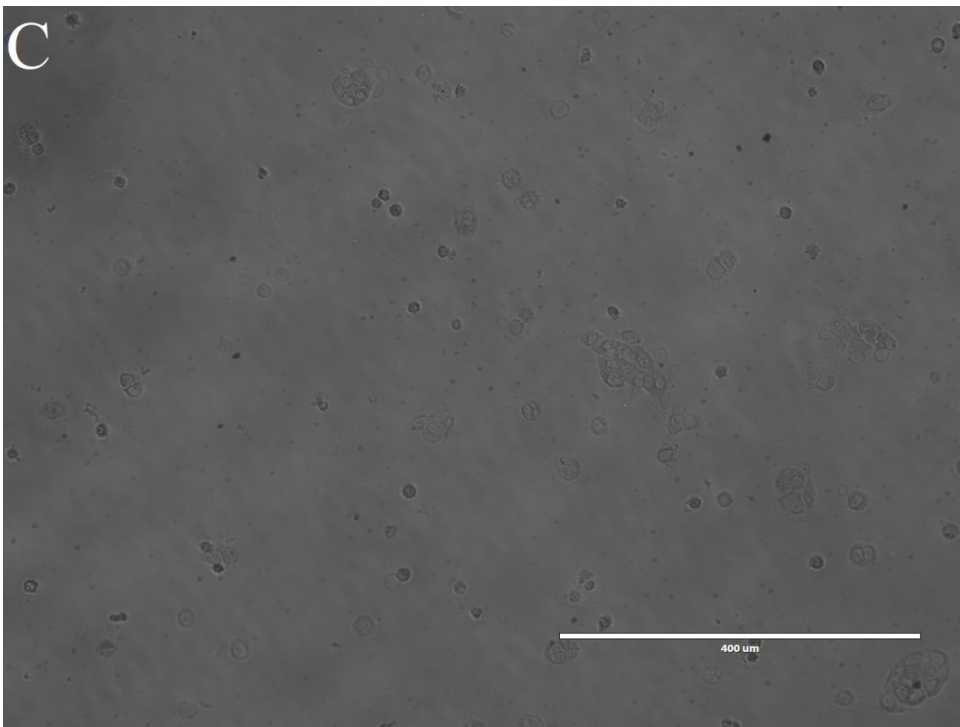
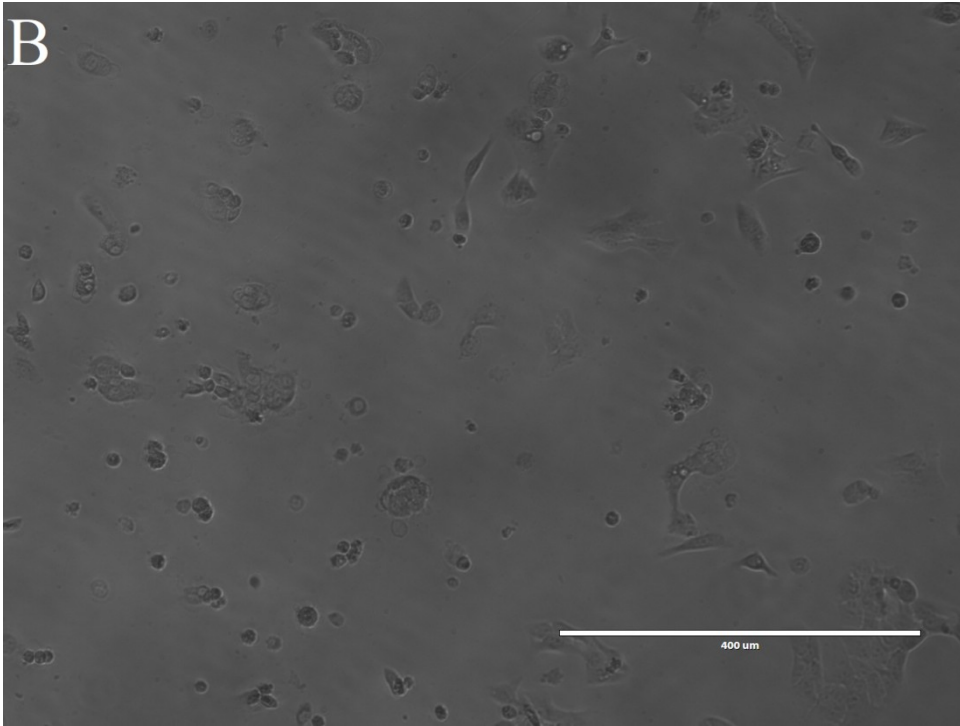


Figura 2: Análise da morfologia de células HaCatestimuladas com nanopartículas de TiO_2 nas concentrações 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (B), 1 $\mu\text{g/mL}$ (C), 10 $\mu\text{g/mL}$ (D) e 20 $\mu\text{g/mL}$ (E) em microscopia de contraste de fase. Após 24 hora de estímulo com TiO_2 foram capturadas imagens da morfologia celular no aumento de 10x. Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo (A).





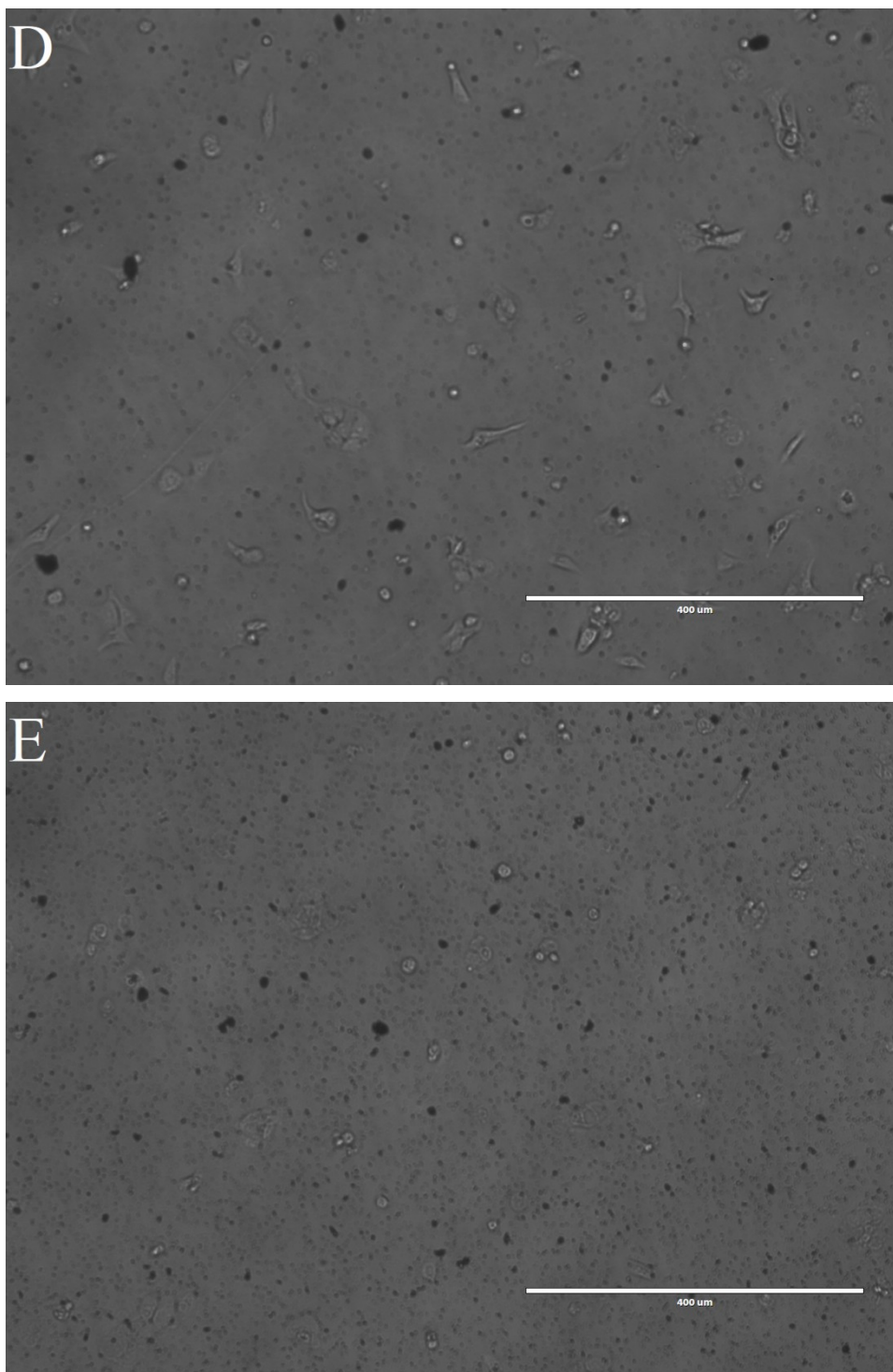
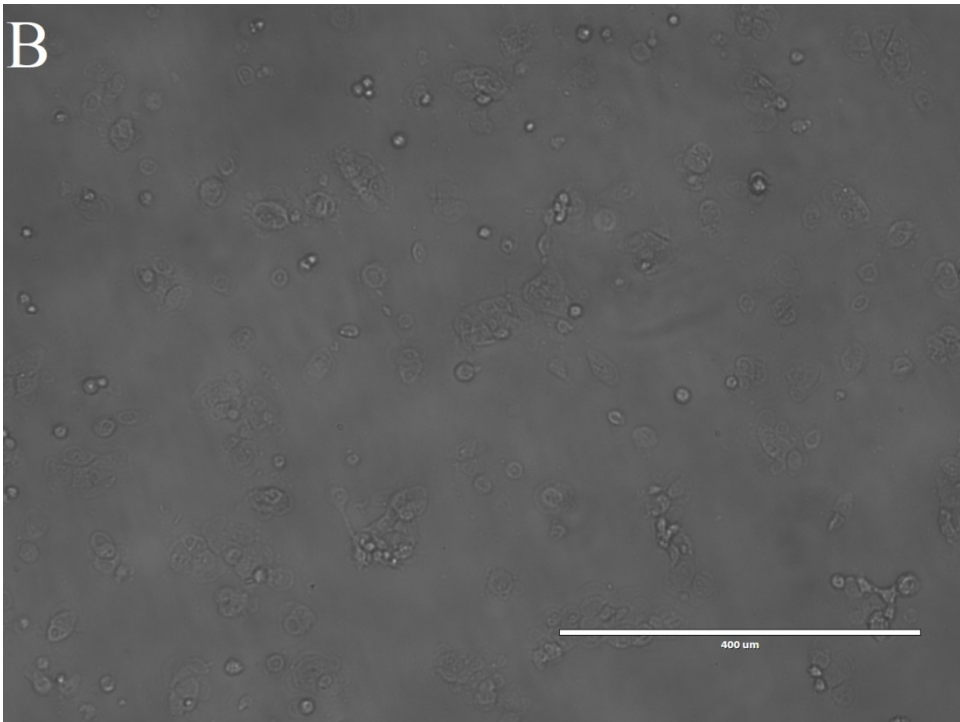
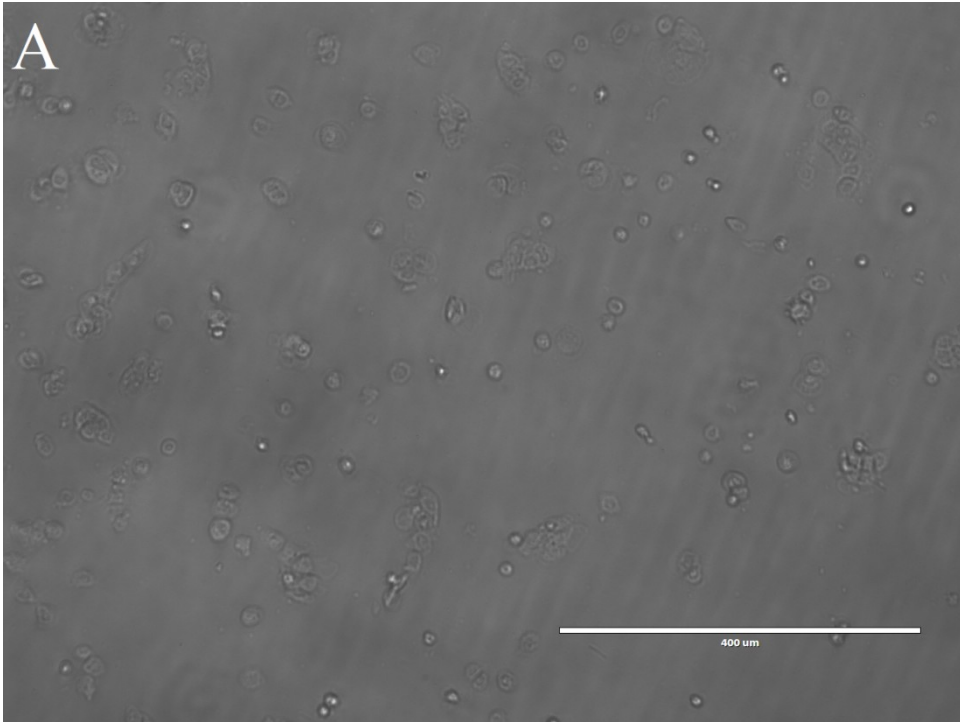
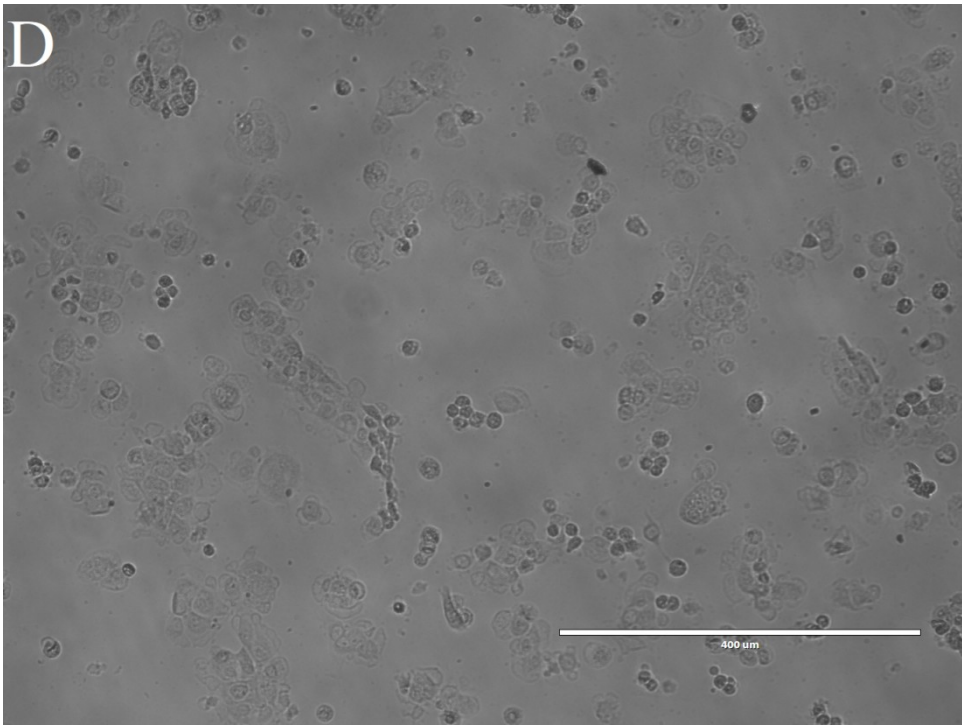
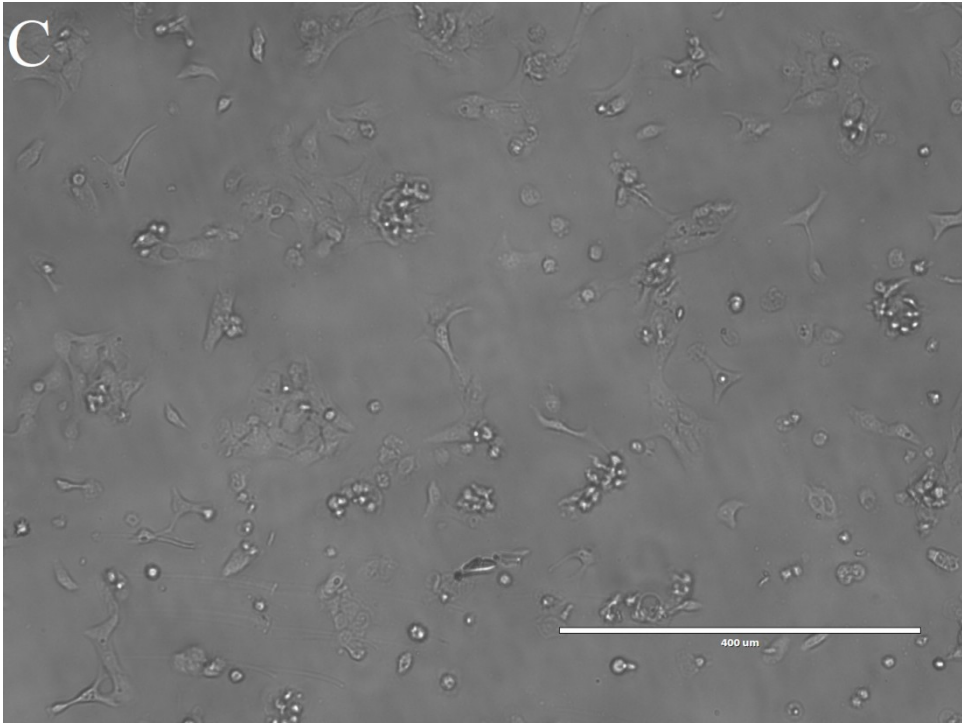


Figura 3: Análise da morfologia de células HaCat estimuladas com nanopartículas de TiO₂-Eu nas concentrações 0,1 µg/mL (B), 1 µg/mL (C), 10 µg/mL (D) e 20 µg/mL (E) em microscopia de contraste de fase. Após 24 hora de estímulo com TiO₂-Eu foram capturadas imagens da morfologia celular no aumento de 10x. Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo (A).





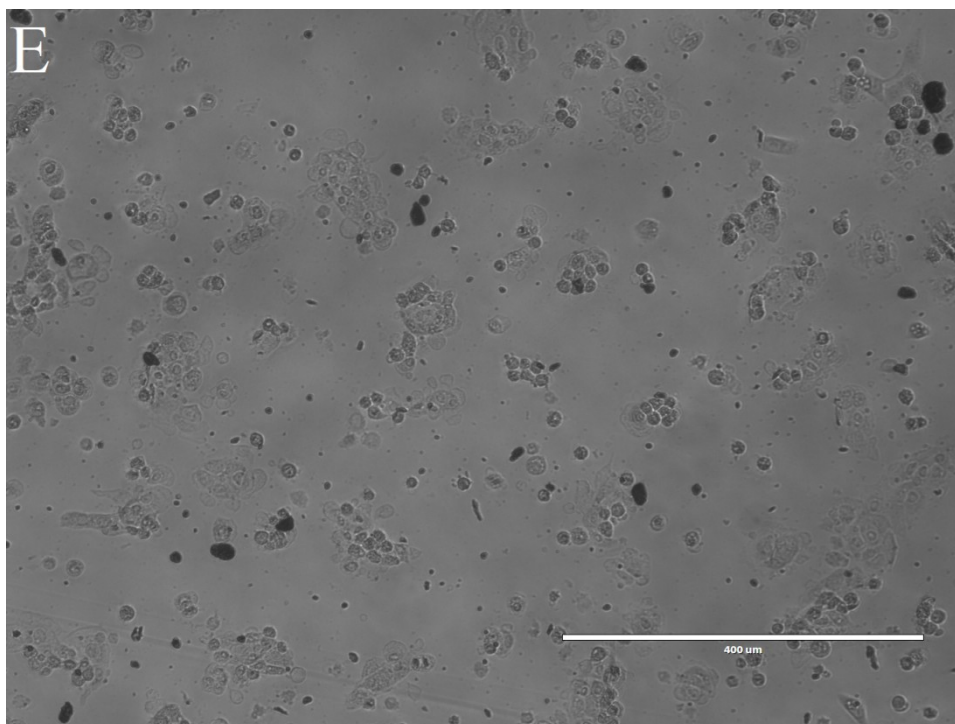
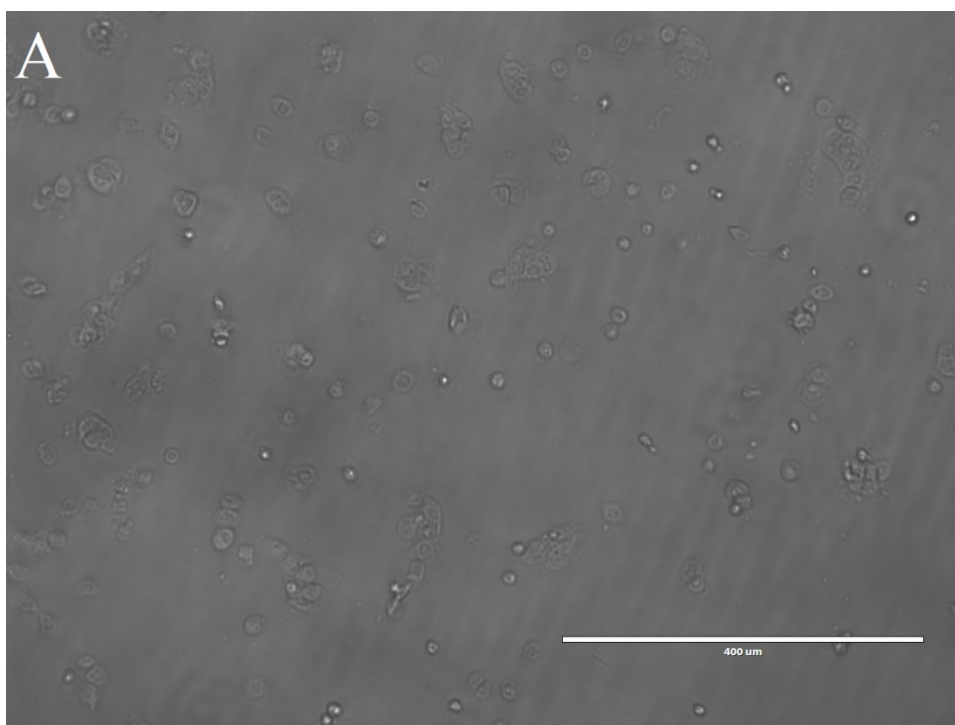
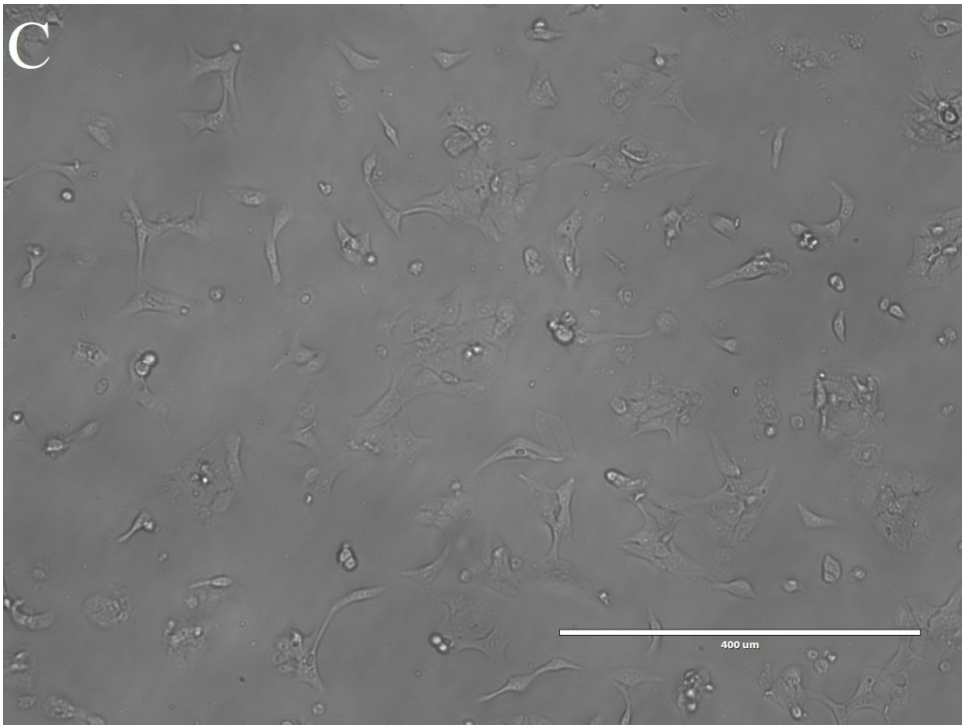
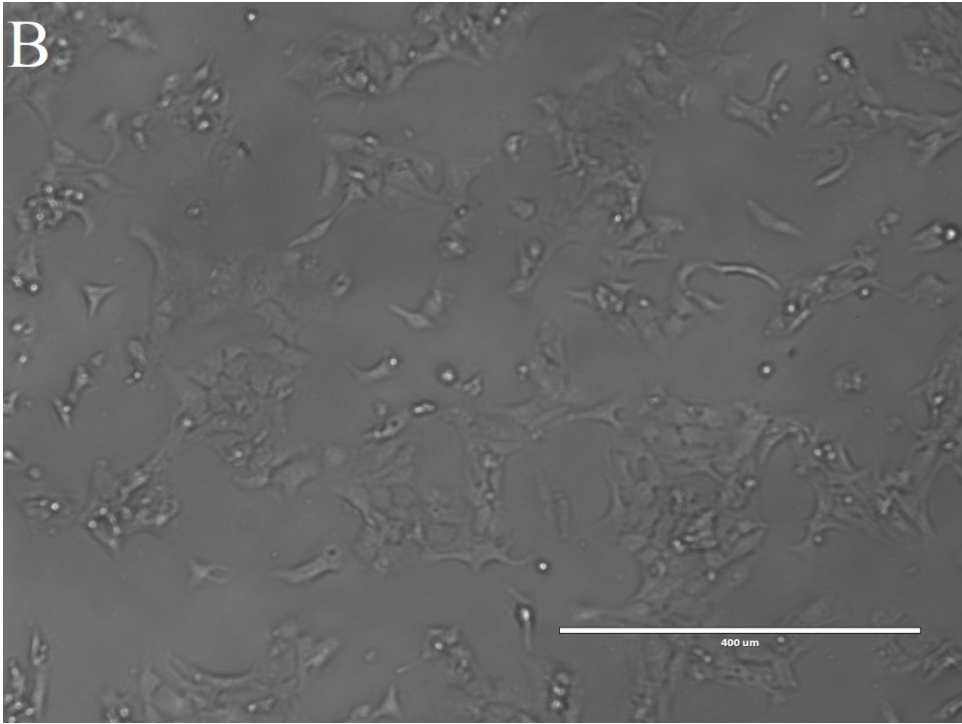


Figura 4: Análise da morfologia de células HaCat estimuladas com nanopartículas de ZnO nas concentrações 0,1 µg/mL (B), 1 µg/mL (C), 10 µg/mL (D) e 20 µg/mL (E) em microscopia de contraste de fase. Após 24 hora de estímulo com ZnO foram capturadas imagens da morfologia celular no aumento de 10x. Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo (A).





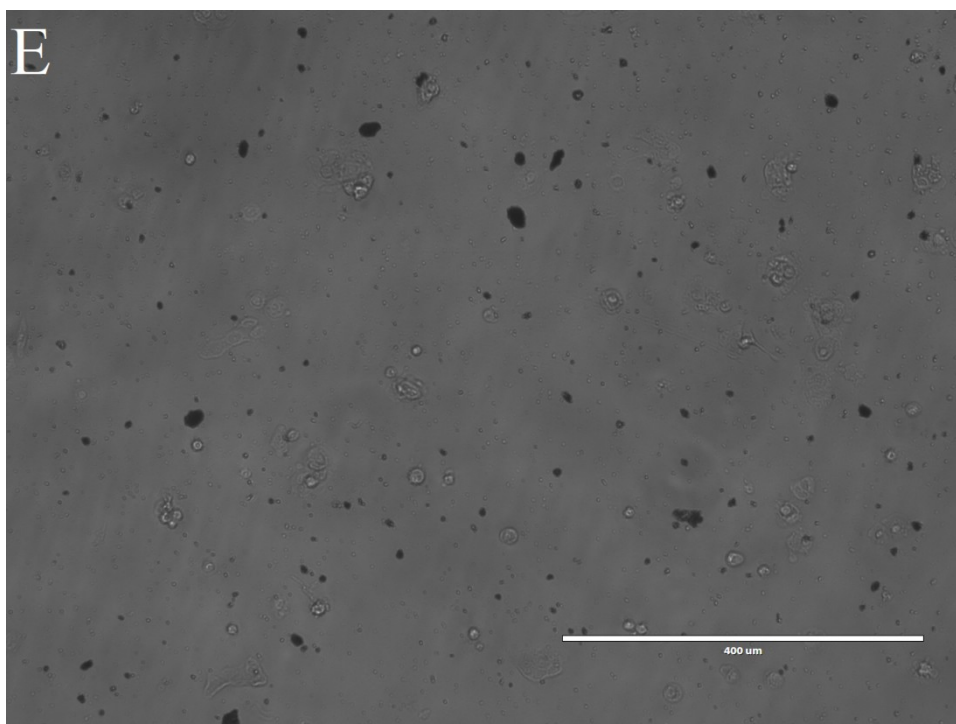
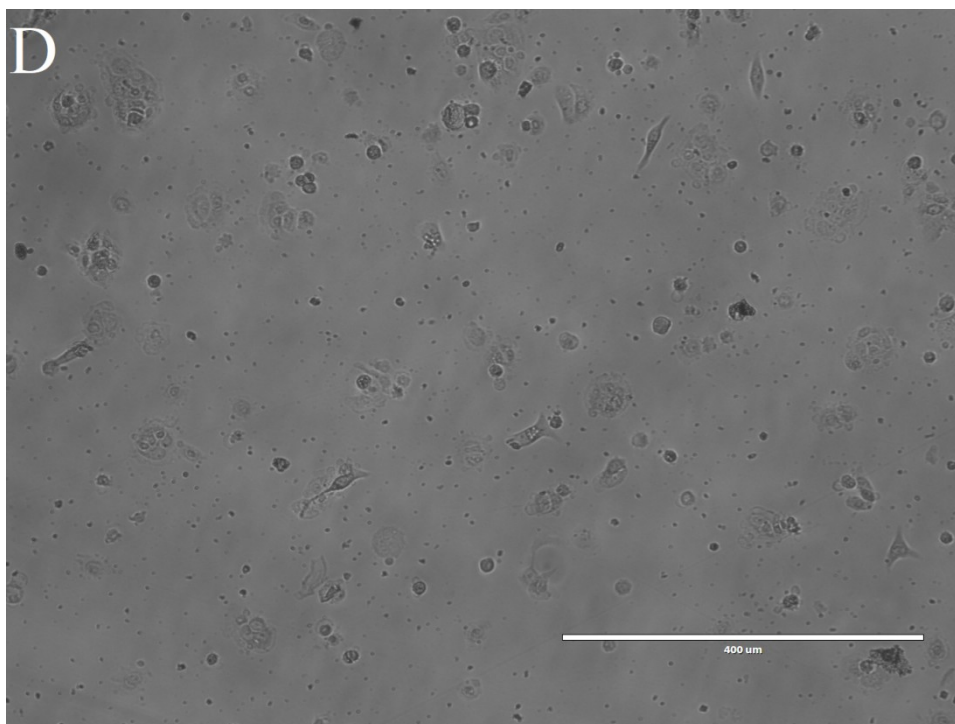


Figura 5: Análise da morfologia de células HaCat estimuladas com nanopartículas de ZnO-Eu nas concentrações 0,1 µg/mL (B), 1 µg/mL (C), 10 µg/mL (D) e 20 µg/mL (E) em microscopia de contraste de fase. Após 24 hora de estímulo com ZnO-Eu foram capturadas imagens da morfologia celular no aumento de 10x. Meio DMEM incompleto foi usado como controle negativo (A).

4.2 Viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade célula foi realizado o ensaio MTT. Em nenhum dos tratamentos com nanopartículas de TiO₂ (figura 6), TiO₂-Eu (figura 7), ZnO (figura 8) e ZnO-Eu (figura 9) foi possível perceber alteração com significância na viabilidade celular.

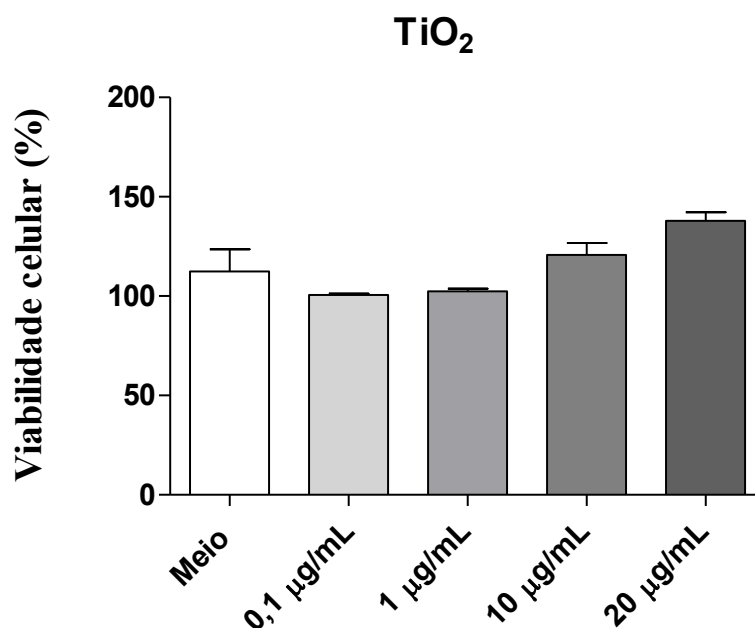


Figura 6: Análise da viabilidade de células HaCat por ensaio de MTT após tratamento com nanopartículas de TiO₂ em diferentes concentrações. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 horas de estímulo com TiO₂ (0,1; 1; 10 e 20 µg/mL). Meio DEMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como mediana ± variância. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni com significância para $p < 0,05$. Significância estatística indicada por asterisco (*).

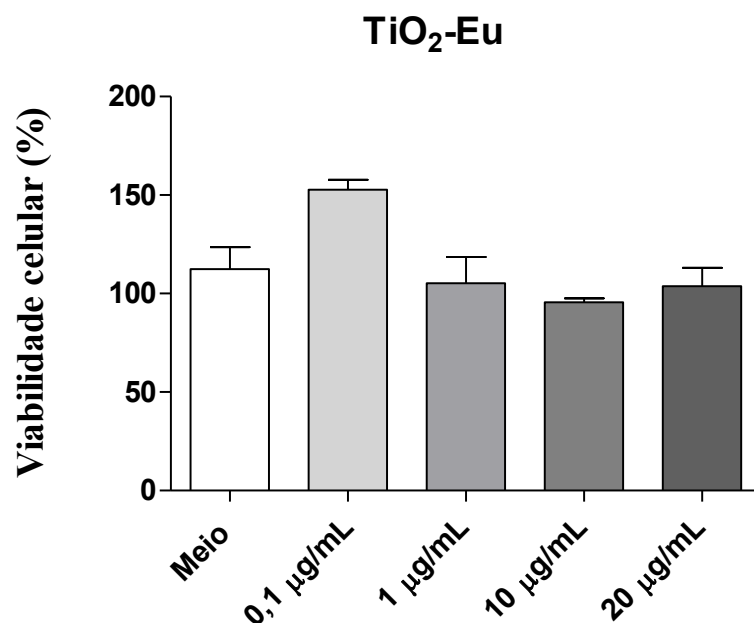


Figura 7: Análise da viabilidade de células HaCat por ensaio de MTT após tratamento com nanopartículas de TiO₂-Eu em diferentes concentrações. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 horas de estímulo com TiO₂-Eu (0,1; 1; 10 e 20 µg/mL). Meio DEMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como mediana ± variância. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni com significância para $p < 0,05$. Significância estatística indicada por asterisco (*).

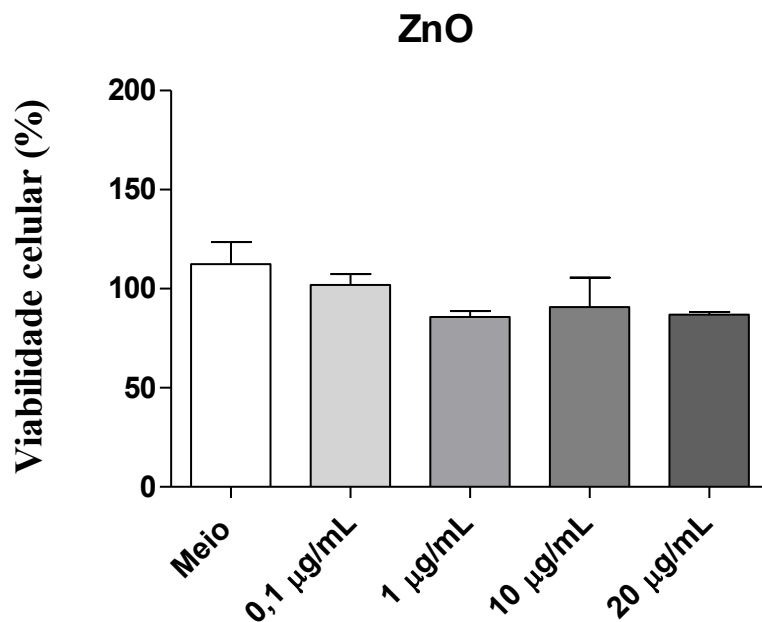


Figura 8: Análise da viabilidade de células HaCat por ensaio de MTT após tratamento com nanopartículas de ZnO em diferentes concentrações. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 horas de estímulo com ZnO (0,1; 1; 10 e 20 µg/mL). Meio DEMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como mediana ± variância. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni com significância para $p < 0,05$. Significância estatística indicada por asterisco (*).

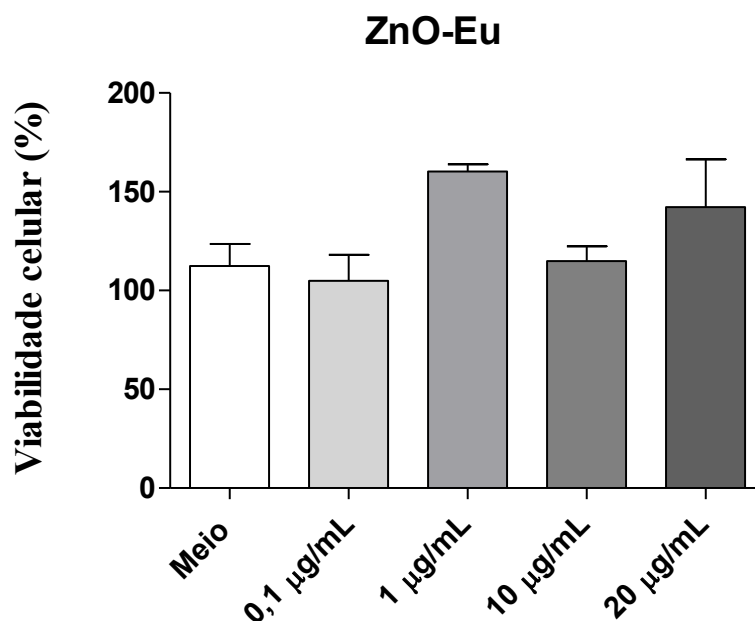


Figura 9: Análise da viabilidade de células HaCat por ensaio de MTT após tratamento com nanopartículas de ZnO-Eu em diferentes concentrações. O número de células viáveis (%) foi analisado após 24 horas de estímulo com ZnO-Eu (0,1; 1; 10 e 20 µg/mL). Meio DEMEM incompleto foi usado como controle negativo. Os dados são expressos como mediana ± variância. As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas por Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni com significância para $p < 0,05$. Significância estatística indicada por asterisco (*).

4.3 Produção de IL-8

Não houve produção de IL-8 pelas células HaCat com os tratamentos com as nanopartículas de TiO₂, TiO₂-Eu, ZnO e ZnO-Eu, com base na análise realizada no software MicroplateReader a partir do ensaio ELISA e por isso os dados não são mostrados.

5 DISCUSSÃO

Os dados de análise da morfologia celular sugerem que é preciso se atentar ao método de solubilização utilizado ou até mesmo na forma de produção e estocagem das nanopartículas, pois em microscopia de contraste de fase foi possível observar formação de agregados de nanopartículas. Isso se torna mais claro quando se observa as imagens de tratamentos nas concentrações de 10 e 20 µg/mL (figura 2D-E, figura 3 D-E, figura 4 D-E, figura 5 D-E). Nanopartículas não seriam visíveis no aumento escolhido (10x) na microscopia de contraste de fase, o que sustenta a hipótese de aglomeração das nanopartículas. Já foi mostrado que a solubilidade da nanopartículas de ZnO aumenta com o decréscimo do tamanho das mesmas (RAGHUPATHI; KOODALI; MANNA, 2011), e talvez o tamanho testado não seja pequeno o suficiente para se atingir uma solução homogênea nas

concentrações testadas ou o próprio método de solubilização utilizado, por meio de almofariz, não seja o mais adequado. Além disso, é possível notar que dopagem com Eu não promoveu alteração na solubilidade das nanopartículas.

A análise de morfologia celular na microscopia de contraste de fase não mostrou nenhuma alteração da morfologia celular com as nanopartículas de TiO₂, TiO₂-Eu, ZnO e ZnO-Eu. Como as imagens da microscopia sugerem que as nanopartículas estavam em agregados, a presença de nanopartículas realmente dissolvidas no meio poderia estar inferior à calculada, fazendo com que não seja possível concluir se nas concentrações mais altas (10 e 20 µg/mL) a falta de alteração se deve ao fato de não toxicidade das nanopartículas ou porque elas não estavam na concentração ideal. Sugere também que a dopagem com Európio não influenciou na morfologia celular nos tratamentos com nanopartículas de ZnO e TiO₂.

Nanopartículas de ZnO não foram capazes de induzir a produção de EROs intracelular em células HaCat nas concentrações de 20, 40 e 80 µg/mL após 24 horas de incubação (LEE *et al.*, 2012). O teste de MTT não mostrou alteração na viabilidade celular com significância, como mostram as figuras 6, 7, 8 e 9. Isso sugere, que as nanopartículas testadas não possuam perfil tóxico para as células HaCat. Não foi realizado teste para quantificação de EROs, mas mesmo que tenha ocorrida sua produção na concentração de 20 µg/mL esta não foi suficiente para alterar morfologia e viabilidade celular.

Há ainda uma controvérsia sobre a capacidade das nanopartículas de TiO₂ e ZnO de penetrarem na pele e se são nocivas à saúde (SCHILLING *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2009; FILON *et al.*, 2015), mas estudos já mostraram que nanopartículas de ZnO são capazes de induzir apoptose em células HaCat por meio da produção de EROs (LEE *et al.*, 2012). Novos testes podem ser realizados para estabelecer um limite máximo de concentração dessas nanopartículas que podem ser utilizados a fim de não alterar a viabilidade celular.

Não houve produção da citocina IL-8 nas células HaCat em nenhuma das concentrações testadas, o que sugere que as nanopartículas testadas não possuem perfil pró inflamatório. Isso mostra que tais nanopartículas presentes em formulações de fotoprotetores são eficientes em prevenir a inflamação da pele após exposição à radiação UV e ainda incapazes de induzir a produção de citocina IL-8 por si só.

O tamanho das nanopartículas usadas não foi informado pela parte fornecedora, o que dificulta uma análise mais conclusiva e correlativa com outros artigos semelhantes afim de descobrir qual foi a causa da agregação. Isso também influencia nos demais parâmetros analisados, uma vez que nanopartículas tendem a comportar e interagir de forma diferente em seus variados tamanhos.

6 CONCLUSÃO

As nanopartículas de TiO_2 , $\text{TiO}_2\text{-Eu}$, ZnO e ZnO-Eu não alteraram a morfologia e viabilidade das células HaCat nas concentrações testadas. Além disso, as nanopartículas não estimularam a produção de IL-8, sugerindo que essas nanopartículas apresentam um efeito citotóxico mediante inflamação e que a dopagem com európio não interfere nas propriedades dessas nanopartículas em relação aos parâmetros avaliados.

Com base nesses dados, novos testes podem ser realizados a fim de observar a capacidade dessas nanopartículas em proteger contra a inflamação promovida pela exposição à radiação ultravioleta e abre-se novas perspectivas do uso dessas nanopartículas dopadas com európio a fim de que possam ser utilizadas no monitoramento da capacidade de absorção e distribuição das nanopartículas nas camadas da pele.

REFERÊNCIAS

AMARBAYASGALAN, T. *et al.* Interleukin-8 Content in the Stratum Corneum as an Indicator of the Severity of Inflammation in the Lesions of Atopic Dermatitis. **International Archives Of Allergy And Immunology**, v. 160, n. 1, p.63-74, 2013.

ASSIS, L. M. de *et al.* Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 15, n. 2, p.99-109, 2012.

AZIZI, F.; MOLANI, F.. Effects of N Doping on Structure and Improvement Photocatalytic Properties of Anatase TiO₂ Nanoparticles. **Journal Of Nanostructures**, v. 6, n. 1, p.58-63, 2016.

BAE, J. Y.; PARK, S. N.. Evaluation of anti-microbial activities of ZnO, citric acid and a mixture of both against *Propionibacterium acnes*. **International Journal Of Cosmetic Science**, v. 38, n. 6, p.550-557, 2016.

BORGHEI, Y.; HOSSEINI, M.; GANJALI, M. R.. Synthesis of Fluorescent Cysteine-gold Nano-clusters (Cys-Au-NCs) and their Application as Nano-biosensors for the Determination of Cysteine. **Current Nanoscience**, v. 13, n. 6, p.610-615, 2017.

BRUNNER, T. J. *et al.* In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 14, p.4374-4381, 2006.

CHAKRABARTI, K.*et al.* Magnetic and dielectric properties of Eu-doped BiFeO₃ nanoparticles by acetic acid-assisted sol-gel method. **Journal Of Applied Physics**, v. 110, n. 10, p.1039051-1039059, 2011.

CROSER, E.*et al.* Titanium Dioxide Nanoparticle Penetration into the Skin and Effects on HaCat Cells. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 12, n. 8, p.9282-9297, 2015.

DRANSFIELD, G.p.. Inorganic Sunscreens. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 91, n. 1, p.271-273, 2000.

ESFE, M. H.*et al.* Estimation of Heat Transfer Coefficient and Thermal Performance Factor of TiO₂-water Nanofluid Using Different Thermal Conductivity Models. **Current Nanoscience**, v. 13, n. 6, p.548-562, 2017.

FILON, F. L. *et al.* Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 72, n. 2, p.310-322, 2015.

HEFFERN, M. C.; MATOSZIUK, L. M.; MEADE, T. J.. Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p.4496-4539, 2013.

HOFFMANN, M. R. *et al.* Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 1, p.69-96, 1995.

HONG, J.; PEI, D.; GUO, X.. Quantum dot-Eu³⁺ conjugate as a luminescence turn-on sensor for ultrasensitive detection of nucleoside triphosphates. **Talanta**, v. 99, p.939-943, 2012.

- LANG, J. *et al.* Rapid synthesis and luminescence of the Eu^{3+} , Er^{3+} codoped ZnO quantum-dot chain via chemical precipitation method. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 22, p.9574-9577, 2011.
- LEE, K.P.; TROCHIMOWICZ, H.J.; REINHARDT, C.F.. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO_2) by inhalation for two years. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 79, n. 2, p.179-192, 1985.
- LEE, S. H. *et al.* Toxic response of zinc oxide nanoparticles in human epidermal keratinocyte HaCat cells. **Toxicology And Environmental Health Sciences**, v. 4, n. 1, p.14-18, 2012.
- LEONI, G. *et al.* Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 125, n. 3, p.1215-1227, 2015.
- MEDIKONDURI, U. *et al.* Acyclovir Entrapped N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles for Oral Bioavailability Enhancement. **Current Nanoscience**, v. 12, n. 3, p.378-385, 2016.
- MA, H. *et al.* Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode *Caenorhabditis elegans*: The importance of illumination mode and primary particle size. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 6, p.1473-1480, 2011.
- PAL, N. K.; KRYSCHI, C.. Improved photocatalytic activity of gold decorated differently doped TiO_2 nanoparticles: A comparative study. **Chemosphere**, v. 144, p.1655-1664, 2016.
- PEREIRA, E. B. *et al.* **Atlas brasileiro de energia solar**. 2. ed. São José dos Campos: Inpe, 2017.
- POPOV, A. P. *et al.* Effect of size of TiO_2 nanoparticles embedded into stratum corneum on ultraviolet-A and ultraviolet-B sun-blocking properties of the skin. **Journal Of Biomedical Optics**, v. 10, n. 6, p.0640371-0640379, 2005.
- RAGHUPATHI, K. R.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C.. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 7, p.4020-4028, 2011.
- RAJ, D.; BRASH, D. E.; GROSSMAN, D.. Keratinocyte Apoptosis in Epidermal Development and Disease. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 2, p.243-257, 2006.
- SACHS, S. *et al.* Interaction of Eu(III) with mammalian cells: Cytotoxicity, uptake, and speciation as a function of Eu(III) concentration and nutrient composition. **Toxicology In Vitro**, v. 29, n. 7, p.1555-1568, 2015.
- SAFAEI, P.; MARJANI, A.; SALIMI, M.. Mixed Matrix Membranes Prepared from High Impact Polystyrene with Dispersed TiO_2 Nanoparticles for Gas Separation. **Journal Of Nanostructures**, v. 6, n. 1, p.74-79, 2016.
- SAHOO, S. K.; LABHASETWA, V.. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discov Today**, v. 8, n. 24, p.1112-1120, 2003.
- SCHILLING, K. *et al.* Human safety review of “nano” titanium dioxide and zinc oxide. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 9, n. 4, p.495-509, 2010.

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

SEO, M. *et al.* HaCat Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. **Biomolecules And Therapeutics**, v. 20, n. 2, p.171-176, 2012.

SHIMA, F. *et al.* Manipulating the antigen-specific immune response by the hydrophobicity of amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 37, p.9709-9716, 2013.

SILVA, R. A. *et al.* Queratinócitos e seus desafios: uma revisão da literatura sobre mecanismos intracelulares. **Saúde em Revista**, Piracicaba, v. 13, n. 35, p.3-14, 2013.

SINGH, S. *et al.* Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 222, n. 2, p.141-151, 2007.

SODRÉ, C. T.; AZULAY, D. R.; AZULAY, R. D.. A Pele: Estrutura, Fisiologia e Embriologia. Em: AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.. **Dermatologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 1. p. 1-14, 2004.

SOOD, S. *et al.* Highly effective Fe-doped TiO₂ nanoparticles photocatalysts for visible-light driven photocatalytic degradation of toxic organic compounds. **Journal Of Colloid And Interface Science**, v. 450, p.213-223, 2015.

TYAGI, N. *et al.* Development and Characterization of a Novel in vitro Progression Model for UVB-Induced Skin Carcinogenesis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p.1-11, 2015.

VINARDELL, M. P. *et al.* In Vitro Comparative Skin Irritation Induced by Nano and Non-Nano Zinc Oxide. **MDPI: Nanomaterials**, 2017.

VISSCHER, M. O.. Update on the Use of Topical Agents in Neonates. **Newborn And Infant Nursing Reviews**, v. 9, n. 1, p.31-47, 2009.

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

WU, S. *et al.* IL-8 production and AP-1 transactivation induced by UVA in human keratinocytes: Roles of d- α -tocopherol. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 8, p.2288-2296, 2008.