

Artigo

Avaliação da Segurança de Nanopartículas de Dióxido de Titânio e Óxido de Zinco em Formulações Antissolares

Silva, L. S.; Monteiro, M. S. S. B.*

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (6), 1963-1977. Data de publicação na Web: 22 de dezembro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

Safety Evaluation of the Nanoparticles of Titanium Dioxide and Zinc Oxide in Antissolar Formulations

Abstract: The aim of this study was to investigate the safety of sunscreen formulations containing inorganic filter, such as: zinc oxide (ZnO) and titanium oxide (TiO₂), in the forms of nanoparticles (NPs), and identify aspects of their toxicity. The methodology used was based on a literature review conducted by analysis of scientific articles, selected on different electronic data bases, published in the last ten years. The results suggest that the NPs of ZnO and TiO₂, when topically applied, may be considered exempt from risk, since it does not have a skin penetration potential, not being able to reach the systemic circulation, remaining in the stratum corneum (SC). Furthermore, there is a possibility of NPs achieves deeper layers of the epidermis. The feasibility and cellular function studies showed that the TiO₂ NPs have a cytotoxic potential in the lung, kidney and liver cells, and this effect was dependent on the exposure time, size, chemical characteristics, surface coating and the crystallinity of NPs. Thus, it also becomes necessary to conduct further studies on the interaction of the NPs with the cells and structural molecules in those regions of the epidermis.

Keywords: Nanoparticles; Zinc oxide; Titanium dioxide; Sunscreen.

Resumo

O objetivo desse trabalho consistiu em investigar a segurança de formulações antissolares contendo filtros solares inorgânicos, como: o óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂), na forma de nanopartículas (NPs), e identificar os aspectos associados à sua toxicidade. A metodologia utilizada baseou-se em uma revisão bibliográfica realizada pela análise de artigos científicos, selecionados em diferentes bases de dados eletrônicas, publicados nos últimos dez anos. Os resultados sugerem que NPs de ZnO e TiO₂, quando aplicadas topicamente, podem ser consideradas isentas de risco, uma vez que, não apresentam potencial de penetração na pele, não sendo capaz de atingir a circulação sistêmica, permanecendo no estrato córneo (EC). Porém, existe a possibilidade das NPs atingirem camadas mais profundas da epiderme. Os estudos de viabilidade e funções celulares avaliados mostraram que as NPs de TiO₂ apresentam potencial citotóxico sobre células pulmonares, renais e hepatócitos, e esse efeito foi dependente do tempo de exposição, do tamanho, das características químicas, do revestimento superficial e da cristalinidade das NPs. Sendo assim, torna-se necessário também a realização de maiores estudos sobre a interação das NPs com as células e moléculas estruturais presentes nessas regiões da epiderme.

Palavras-chave: Nanopartículas; Dióxido de Titânio; Óxido de Zinco; Filtro-solar.

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Avenida Carlos Chagas, 373, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia Universitária, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ marianasato@pharma.ufrj.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20160133](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160133)

Avaliação da Segurança de Nanopartículas de Dióxido de Titânio e Óxido de Zinco em Formulações Antissolares

Livia S. Silva, Mariana S. Monteiro*

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Avenida Carlos Chagas, 373, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia Universitária, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* marianasato@pharma.ufrj.br

Recebido em 6 de abril de 2016. Aceito para publicação em 19 de dezembro de 2016

1. Introdução

2. Metodologia

3. Resultados e Discussão

3.1. Características Físico-químicas

3.2. Estudos de Penetração de Nanopartículas de TiO₂ e ZnO

3.3. Efeitos das Nanopartículas de TiO₂ e ZnO na viabilidade e função celular

3.4. Estudo da citotoxicidade das Nanopartículas de TiO₂ e ZnO

3.5. Efeito das Nanopartículas de TiO₂ e ZnO na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)

3.6. Efeito das Nanopartículas no meio ambiente

4. Conclusão

1. Introdução

O uso de filtros solares é um dos métodos de proteção contra a radiação ultravioleta (UV) mais preconizado no mundo, e com grande adesão da população.¹ Os filtros solares físicos ou inorgânicos são substâncias pulverulentas opacas e inertes, de origem mineral, que apresentam alto índice de refração. Eles agem refletindo e dispersando os raios UV, quando aplicados sobre a pele, formando uma barreira física às radiações, pela formação de um filme. A quantidade de radiação a ser refletida irá depender do tamanho da partícula, sendo que

dependendo desta característica, a proteção pode ocorrer não apenas por meio da reflexão, mas como também da absorção. A capacidade de absorção, por sua vez, deve-se ao fato desses filtros serem semicondutores, cujos elétrons são excitados pela luz UV.^{2,3}

As formulações antissolares, contendo filtros solares físicos, contêm partículas de óxidos metálicos, como por exemplo: dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO). Essas partículas possuem baixo potencial alergênico, baixo potencial de sensibilização, baixo potencial de irritação da pele e alta eficácia na proteção contra a radiação UV. Os óxidos metálicos apresentam maior estabilidade, pois, não são passíveis de

decomposição química quando expostos a radiação UV, por isso, apresentam menor toxicidade que os filtros solares químicos. Desta forma, são considerados mais seguros, sendo a primeira escolha para pacientes alérgicos e crianças.^{4,5}

Contudo, as formulações antissolares contendo filtros solares físicos apresentam sensorial gorduroso e desagradável, devido à alta carga lipídica adicionada à formulação, para que esta seja resistente à água.⁶ Além disso, há a formação de um filme esbranquiçado e opaco sobre a pele, que é consequência do grande tamanho das partículas utilizadas (> 200 nm) e do seu alto índice de refração, que acabam refletindo a radiação UV e a luz visível.⁷ Tais características são desvantajosas, pois comprometem a aceitação do produto pelo público, diminuindo o uso de filtro solar e aumentando os riscos da exposição à radiação UV.

Diante deste cenário, pesquisadores e especialistas vêm desenvolvendo formulações cada vez mais eficazes, com maior aplicabilidade, sensorial adequado, com menor toxicidade e mais seguras. A utilização da nanotecnologia é uma das alternativas que vem sendo utilizada para obter essas características desejáveis, sendo que a sua aplicação já está consolidada em muitas formulações antissolares disponíveis no mercado.

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar, que estuda o desenvolvimento e aplicação de materiais na escala nanométrica, cujas dimensões variam entre 1 e 100 nanômetros (nm), e por isso apresentam novas propriedades químicas, físicas e biológicas.⁸ Essa é uma tecnologia promissora, e já difundida em diversos setores do mercado. Na indústria farmacêutica é possível encontrar a nanotecnologia aplicada em diferentes produtos, como por exemplo: anti-inflamatórios, antimicrobianos, antifúngico, ativos antienvhecimento, antioxidantes e filtros solares.⁹ Porém, foi à indústria cosmética que mais referenciou produtos contendo nanotecnologia.¹⁰

Os nanocosméticos podem ser definidos como produtos cosméticos que veiculam ativos nanoestruturados, ou seja, veiculam ativos incorporados em nanosistemas, ou seja, a substância ativa é encapsulada em um sistema nanométrico, ao invés de ser adicionada livremente no veículo. Com isso, apresenta propriedades distintas em relação aos cosméticos convencionais, proporcionando melhoria nas formulações, como por exemplo: distribuição uniforme do produto sobre a pele, melhora do aspecto sensorial, proteção de ativos quanto à degradação química ou enzimática, o controle da liberação, o aumento do tempo de retenção dos ativos ou fármacos na camada córnea e maior capacidade de penetração dos ativos. Portanto, permitem que os produtos adquiram características desejáveis ao consumidor.^{11,12}

A transformação de partículas de TiO₂ e ZnO, para a escala nanométrica, vem sendo amplamente empregada na produção de filtros solares inorgânicos. Já que a redução do tamanho das partículas, dentro do intervalo de 15 e 50 nm, diminui a opacidade da formulação, gerando melhora não apenas na aparência final do produto e sensorial mais agradável, como também aumentando a eficácia em absorver a radiação.⁷ Ademais, a utilização da nanotecnologia no desenvolvimento dessas NPs possibilita a retenção por mais tempo, nas camadas mais externas da pele, aumentando seu tempo de ação e tornando o produto mais aceito ao consumidor.³ No entanto, à medida que diminui o tamanho de partículas, aumenta a capacidade de penetrarem na pele e em outras barreiras biológicas, o que não seria uma vantagem quando se trata de filtros solares, pois uma das características desejáveis é a sua retenção na pele. Por esses motivos, é imprescindível o controle do tamanho durante a produção dos nanosistemas.

O aumento da frequência de exposição dos indivíduos aos nanomateriais é uma preocupação pública, que está induzindo o avanço dos estudos sobre nanotoxicidade. Existe uma grande relevância desses estudos

direcionados as NPs de TiO₂ e ZnO, uma vez que, o tamanho da partícula é reduzido à escala nanométrica, sua área de superfície aumenta, tornando as NPs mais bioreativas do que o mesmo material em tamanho convencional. Logo, faz-se necessário que a segurança dessas partículas seja elucidada, tanto para os profissionais de saúde quanto para o consumidor. Por esse motivo, o objetivo desse trabalho consistiu em avaliar a segurança das NPs de ZnO e TiO₂, utilizadas como ativos fotoprotetores, em formulações antissolares, identificando os aspectos associados à sua toxicidade.

2. Metodologia

Este trabalho realizou uma revisão da literatura, de forma não tendenciosa, por meio da análise de artigos científicos selecionados nas seguintes bases de dados eletrônicas: PubMed, Medline, Scielo-Scientific Eletronic Library, OneFile (GALE), Wiley Online Library, Bireme, Lilacs, SciVerse ScienceDirect (Elsevier), SpringerLink, Oxford Journals (Oxford University Press), SAGE Journals, Karger, ProQuest, Google Acadêmico e o portal da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), além de teses e livros didáticos com conteúdo relevante. Os trabalhos referenciados foram estudos publicados nos últimos dez anos, de 2006 até 2015, sendo incluídos estudos em português e inglês, contendo como palavras chave: óxido de zinco, dióxido de titânio, nanotecnologia, nanopartículas, nanosistemas, segurança, radiação solar, filtro solar, filtros inorgânicos, nanotoxicologia. Para avaliar a segurança e identificar os aspectos relacionados à toxicidade das NPs de ZnO e TiO₂, quando incorporadas como ativos fotoprotetores em formulações antissolares, foi realizada uma análise de estudos *in vitro* e *in vivo* sobre penetração dessas NPs na pele e os seus potenciais efeitos tóxicos no organismo. Durante avaliação desses estudos, os estudos

de absorção dessas NPs quando administradas por outras vias, que não a tópica, não foram considerados.

3. Resultados e Discussão

O mercado global vem passando por períodos de grandes transformações científicas e tecnológicas, principalmente após a ampla utilização da nanotecnologia em diferentes produtos. Estima-se que o mercado dos nanosistemas, especialmente das nanopartículas, venha a arrecadar aproximadamente 1 trilhão de dólares nos próximos 20 anos.¹³ Assim, é extremamente relevante avaliar a segurança dos nanosistemas aplicadas topicamente, inclusive quando se trata do uso de filtros solares. Ao avaliar a toxicidade de protetores solares formulados com nanosistemas, as seguintes questões devem ser consideradas:

1. As características físico-químicas dos nanosistemas.
2. As características da formulação.
3. A concentração dos nanosistemas na formulação.
4. Avaliar se o nanosistema permanece na pele.
5. Se os nanosistema conseguem atingir a circulação sistêmica.
6. Se o nanosistema é intrinsecamente tóxico.
7. Se o nanosistema atinge as células viáveis.
8. Se a formulação contendo o nanosistema aumenta a penetração dos ativos.
9. Qual o tempo de exposição aos nanosistemas.

Isso posto, os principais aspectos que influenciam a nanotoxicidade das NPs de TiO₂ e ZnO serão abordados de forma mais detalhada.

3.1. Características Físico-químicas

As principais características físico-químicas dos nanosistemas que devem ser avaliadas são: tamanho, forma, estado de agregação, estrutura cristalina, composição, revestimento de superfície, reatividade da superfície, estabilidade, solubilidade e via de exposição/administração. Pois que, esses parâmetros afetam a capacidade de penetração das NPS na pele.^{14,15} Os nanosistemas adquirem características específicas, devido ao reduzido tamanho, e passam a ter maior área de superfície por unidade de massa, aumentando a sua reatividade superficial, e influenciando a toxicidade.¹²

O TiO_2 é um material polimórfico e possui três formas cristalinas distintas: anatase, rutilo e bruquita, todavia, apenas as duas primeiras são utilizadas em formulações antissolares, devido as suas ações fotocatalíticas. Geralmente, as formulações contêm a forma rutilo ou anatase ou uma mistura dessas. A forma rutilo é mais estável que a forma anatase na temperatura e pressão ambiente, além disso, a forma anatase apresenta maior propriedade fotocatalítica.

Algumas características físico-químicas são influenciadas pelo tamanho das partículas de TiO_2 e ZnO . Dado que, o tamanho das NPs altera suas propriedades de superfície, afetando sua reatividade química, a sua capacidade citotóxica e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).^{16,17} As NPs de TiO_2 e ZnO podem ser encontradas em três estados diferentes: partículas primárias (5–20 nm), agregados (30–150 nm) e aglomerados (1–100 microns). As partículas primárias são as menores estruturas que podem existir dentro da formulação antissolar, e os aglomerados é o resultado de uma ligação fraca entre agregados.

O processo de aglomeração pode ocorrer durante a produção desses filtros solares ou

também sobre a pele, após aplicação do protetor solar, no caso das NPs de TiO_2 . O veículo utilizado na formulação também afeta os processos de agregação e aglomeração das partículas, sendo capaz de aumentar o tamanho dessas, modificando a carga superficial¹. Alguns pesquisadores acreditam que qualquer risco associado às NPs pode ser minimizado, caso elas formem estruturas acima da escala nanométrica, como os agregados¹⁷. Além disso, relataram que as partículas de TiO_2 e de ZnO são mais eficientes quando possuem tamanho entre 60 e 120 nm e 20-30 nm, respectivamente.^{18,19}

As NPs podem ser revestidas com materiais inertes como dióxido de silício (SiO_2) e óxido de alumínio (Al_2O_3), visando facilitar a dispersão dessas nas formulações. Ademais, devido às capacidades fotocatalíticas das NPs de ZnO e TiO_2 , em acelerar a formação de ERO, é comum adicionar antioxidantes às formulações, como por exemplo: vitaminas A, E e C ou revestir as NPs com polímeros, óxidos de sílica inerte e hidróxido de alumínio ($\text{Al}[\text{OH}]_3$). Desta maneira, ocorre uma redução do potencial dessas partículas em produzir EROs e diminui a labilidade em sofrer reações fotoquímicas, quando expostas a radiação UV.^{3,17}

3.2. Estudos de Penetração de Nanopartículas de TiO_2 e ZnO

Os estudos de penetração são capazes de avaliar a permeação ou penetração das NPs nas diferentes camadas da pele. Os estudos descritos na literatura foram realizados em condições experimentais variadas, como por exemplo: diferentes tipos de NPs (TiO_2 , ZnO ou combinação de ambas), com tamanhos variados, estudos *in vitro* (com variação do tipo de pele) ou *in vivo*, como mostra a Tabela 1, a Tabela 2 e a Tabela 3.

Tabela 1. Estudos de penetração de NPs de ZnO

Autor	Partícula	Diâmetro (nm)	Tipo de estudo	Tipo de pele	Resultado
Cross colaboradores (2007) ¹⁹	ZnO	15-40 nm	<i>In vitro</i>	Pele humana.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
Zvyagin e colaboradores (2008) ²⁰	ZnO	20-30 nm	<i>In vivo e in vitro</i>	Pele humana.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
Kuo e colaboradores (2009) ²¹	ZnO	10 nm	<i>In vitro</i>	Pele de rato.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
Gulson e colaboradores (2010) ²²	ZnO	19 nm	<i>In vivo + radiação UVA e UVB</i>	Pele humana	Detectou traços de Zn em amostras de sangue e urina.
Detoni e colaboradores (2014) ²³	ZnO de formulação antissolar comercial (Nanosun™)	30 nm	<i>In vitro</i>	Pele de porco	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
Ryu e colaboradores (2014) ²⁴	ZnO	20 nm	<i>In vivo</i>	Pele de rato	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
			<i>In vivo</i>	Pele de rato	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.

Tabela 2. Estudos de penetração de NPs de TiO₂

Autor	Partícula	Diâmetro (nm)	Tipo de estudo	Tipo de pele	Resultado
Lekki e colaboradores (2007) ²⁵	TiO ₂ (rutilo)	20 nm	<i>In vitro</i>	Pele humana e pele de porco.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele
Mavon e colaboradores (2007) ²⁶	TiO ₂	20 nm	<i>In vivo e in vitro</i>	Pele humana.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele
Kiss e colaboradores (2008) ²⁷	TiO ₂ de formulação antissolar comercial	Não declarado	<i>In vitro</i>	Pele humana.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele
Wu e colaboradores (2009) ²⁸	TiO ₂ (anatase e rutilo)	4-90 nm	<i>In vitro</i>	Pele de porco.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele
			<i>In vivo</i>	Pele de porco.	Ocorreu penetração pelo EC, atingindo camadas viáveis da pele.
			<i>In vivo + 60 dias de exposição</i>	Pele de rato, sem pelos.	Penetração através da pele, atingindo órgãos.
Sadrieh e colaboradores (2010) ²⁹	TiO ₂	Variável	<i>In vivo</i>	Pele de porco.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
Senzui e colaboradores (2010) ³⁰	TiO ₂	35 nm	<i>In vitro</i>	Pele de porco.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.

Tabela 3. Estudos de penetração das NPs de TiO₂ e ZnO

Autor	Partícula	Diâmetro (nm)	Tipo de estudo	Tipo de pele	Resultado
Gamer e colaboradores (2006) ³¹	ZnO e aglomerados de TiO ₂	80-200 nm	<i>In vitro</i>	Pele de porco.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
Gontier e colaboradores (2008) ³²	TiO ₂ (rutilo; mistura de rutilo e anatase/ ZnO	20-100 nm /20-30 nm	<i>In vitro e in vivo</i>	Pele de porco e pele humana, respectivamente.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
Filipe e colaboradores (2009) ³³	TiO ₂ e ZnO	20 nm	<i>In vitro</i>	Pele humana.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.
Monteiro-Riviere e colaboradores (2011) ³⁴	TiO ₂ e ZnO	Não declarado	<i>In vitro e in vivo</i>	Pele de porco.	Não ocorreu penetração para camadas viáveis da pele.

O número de artigos que concluem positivamente sobre a penetração de NPs de ZnO e TiO₂ na pele é pequeno, quando comparado a quantidade de estudos que dizem o contrário. Dessa forma, a maioria dos estudos de penetração, *in vitro* e *in vivo*, não mostraram a penetração e nem a permeação de NPs de TiO₂, ou seja, as NPs permaneceram nas camadas mais externas do EC, não atingindo as células viáveis da pele.

Entretanto, alguns estudos observaram a penetração das NPs de TiO₂ e ZnO, em ratos, e observou-se que as NPs conseguiram atravessar a pele e atingir diversos órgãos, como fígado e pulmões. Nesses estudos a penetração das NPs foi tamanho-dependente e tempo-dependente, já que partículas menores apresentaram maior capacidade de penetração e o aumento do período de exposição favoreceu a sua penetração. Além disso, eles chamam atenção para as características dos tipos de pele utilizadas, por exemplo: a pele suína possui morfologia

e estrutura semelhantes com a da pele humana, contudo, a pele do rato possui uma espessura menor que a metade da pele humana, apresentando menor função barreira, facilitando a penetração das NPs.²⁸ Esses aspectos foram levados em consideração na avaliação dos resultados do teste de penetração realizados.

Outro fator que deve ser considerado para avaliar a penetração das NPs é a integridade da pele, uma vez que, as doenças de pele, como por exemplo: dermatite e eczema atópico, podem facilitar o processo de penetração, pois promovem alterações na função barreira da pele³⁵. Assim, uma pele danificada pode permitir ou aumentar a absorção de NPs, por isso é essencial realizar uma avaliação qualitativa desse órgão.

Diversos estudos simularam as condições reais de uso dos protetores solares, considerando a exposição na pele sadia (intacta) e comprometida (danificada experimentalmente pela técnica de *tape stripping*, onde camadas mais externas do EC

foram removidas, ou danificadas pela exposição à radiação UVB ou pela remoção de pelos), utilizando as NPs de TiO₂ e ZnO, revestidas e não revestidas. A maior parte dos estudos não observou a presença de NPs de TiO₂ e de ZnO nas camadas profundas da pele intacta ou a quantidade dessas não foi suficiente para detecção, porém, foi possível encontrar essas NPs na superfície epitelial e em regiões mais externas do EC.^{1,33,34}

No estudo *in vivo* de MONTEIRO-RIVIERE e colaboradores (2011), foram observados diferenças na penetração das NPs de TiO₂ e ZnO, sendo que o ZnO apresentou menor potencial de penetração que o TiO₂, ou seja, as NPs de TiO₂ conseguiram atingir camadas mais internas do EC. Alguns estudos detectaram que após remoção dos pelos, da pele, as NPs revestidas (35 nm) foram capazes de penetrar profundamente na epiderme. Os autores acreditam que essa penetração ocorreu pelos folículos capilares, cujos pelos foram removidos facilitando a entrada e que ocorreu a deposição das NPs na abertura dos folículos pilosebáceos.³⁴

Assim, existem evidências que os folículos capilares podem aumentar a penetração e a absorção das NPs aplicadas topicamente, atuando como um reservatório de compostos químicos. Uma vez que, a NP tenha penetrado na pele, ela pode difundir-se continuamente para os espaços que os circundam, atingindo capilares e a circulação sistêmica. Todavia, essa via de penetração não é relevante, já que esses anexos constituem apenas 0,001% da superfície epitelial. Avaliando a estrutura da pele e os aspectos dimensionais, esses pesquisadores sugeriram que as NPs com tamanhos menores que o caminho intercelular, formado por lipídeos da pele, pode penetrar para as camadas mais internas da pele.^{1,36}

As características da formulação, onde as NPs são veiculadas, também é um aspecto muito relevante. Já que alguns estudos observaram que a utilização de promotores de permeação, como o ácido oleico, etanol e a mistura desses dois compostos, quando adicionados a solução de NPs de ZnO, com tamanho de 10 nm, aumentaram a sua

penetração. Os autores observaram que essas NPs atingiram o EC, pela via intercelular, ou seja, pelo caminho entre os corneócitos, que são as regiões lipídicas multilamelares.²¹

Apesar de esses estudos revelarem, em sua maioria, que estes filtros inorgânicos nanoparticulados não são capazes de penetrar a pele e atingir a circulação sistêmica, existem outras características das NPs que devem ser avaliadas.

3.3. Efeitos das Nanopartículas de TiO₂ e ZnO na viabilidade e função celular

É necessário avaliar a capacidade das NPs de interagir com células do corpo, estudando seus efeitos sobre a viabilidade e função celular, para garantirmos a segurança desses sistemas. A análise da viabilidade celular significa saber se a NP é capaz de causar morte celular ou de um sistema celular, e avalia-se a atividade metabólica celular, a ocorrência de hemólise, apoptose e necrose.³⁷ Para avaliar a função celular são realizados estudos funcionais, onde são realizadas análises dos efeitos das NPs em diferentes processos celulares, como: síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), expressão gênica, proliferação celular, exocitose e estresse oxidativo.¹⁴

Outro aspecto importante é a imunogenicidade, que estuda a capacidade da NP em evadir o sistema imunológico. Devido ao seu tamanho e, o consequente, aumento da área de superfície, as NPs tornam-se capazes de reagir com moléculas biológicas, como as proteínas. Dessa forma, são capazes de formar complexos com as proteínas e ao sofrerem metabolismo proteico, podem ser internalizados, em tecidos, mais facilmente do que partículas maiores. Os autores adicionam que o metabolismo proteico de NPs é diretamente proporcional à área de superfície do complexo NP - proteína. Tais modificações são responsáveis por capacitar as NPs a evadirem o sistema imunológico.¹²

3.4. Estudo da citotoxicidade das Nanopartículas de TiO₂ e ZnO

Barillet e colaboradores (2010) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar as respostas de células eucarióticas à exposição de determinadas NPS, incluindo NPs de TiO₂. Eles utilizaram células epiteliais alveolares pulmonares, hepatócitos, e células renais, e colocaram em contato com as NPS de TiO₂, cujos tamanhos variaram entre 12, 25 e 140 nm. Ao avaliar a citotoxicidade das partículas, os autores não observaram mortalidade celular, após um período de 24 horas de exposição, porém, um resultado oposto foi encontrado quando as células foram expostas por mais de 48 horas.³⁸ Cho e colaboradores (2010) avaliaram a capacidade de diferentes NPs em apresentar citotoxicidade pulmonar aguda, pela indução de respostas inflamatórias. O uso de NPs de ZnO em altas concentrações, induziu a inflamação severa, após 4 semanas, em eosinófilos, em células obtidas a partir do fluido broncoalveolar e nos pulmões de ratos. As NPs de TiO₂ não induziram processo inflamatório agudo significativo.³⁹

À vista disso, os pesquisadores observaram uma diferença no potencial citotóxico com relação ao tamanho das NPs de TiO₂, onde NPs maiores (140 nm) apresentaram menor citotoxicidade que as menores (12 e 25 nm), mostrando que a capacidade citotóxica das NPs dependem do seu tamanho. Também é importante considerar a cristalinidade das NPs, uma vez que, a forma cristalina rutilo do TiO₂ induziu um menor número de mortes celulares, que a forma anatase, mostrando que a forma rutilo apresenta menor reatividade.³⁸ Contudo, alguns estudos sugerem que mesmo as NPs de TiO₂ na forma rutilo podem induzir apoptose, pois ocorreu um aumento nos níveis de moléculas sinalizadoras de apoptose, como a caspase-3, e as NP de TiO₂ na forma anatase podem provocar necrose.^{28,40}

3.5. Efeito das Nanopartículas de TiO₂ e ZnO na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO)

O risco do uso de NPs de ZnO e TiO₂, em formulações antissolares, também está associado a capacidade de formar radicais livres. Estes compostos, quando expostos a radiação UV, absorvem parte dessa radiação, emitindo elétrons capazes de gerar ERO, e podem formar radicais hidróxi e superóxido na superfície da partícula.⁷ Essas moléculas são capazes de reagir com moléculas biológicas como, proteínas, DNA e lipídeos, causando danos às mesmas.

Os estudos sobre os danos causados pelos radicais livres provenientes das NPs de TiO₂ e ZnO, mostraram: reações de quebra das fitas do DNA pelos radicais hidróxi gerados, a partir da irradiação das NPs de TiO₂, com raios UVA, e que as NPs de TiO₂ induziram a formação de ERO nas células, após exposição por 24 horas, comprovando a capacidade em gerar estresse oxidativo celular.¹² Outros pesquisadores relataram que as EROs formadas possuem potencial genotóxico, danificando moléculas de DNA presentes no citoplasma, pela quebra de fitas únicas de DNA, mas não de fitas duplas, e verificaram que o uso tópico de NPs de TiO₂, por um longo período, pode induzir toxicidade epitelial, devido a formação de radicais livres, estresse oxidativo e diminuição da quantidade de colágeno.^{28,38}

O estudo realizados por Hidaka e colaboradores (2006), com DNA plasmidial, mostrou que a conformação super enovelada foi alterada, ficando mais relaxada e linear, quando exposto a luz UV, na presença de partículas de TiO₂ e ZnO, devido a produção de radicais hidróxi. Os pesquisadores explicam o mecanismo de reação, onde esses radicais atacam a ribose, deoxiadenosina, guanosina e nucleotídeos de citidina, durante 30 minutos de exposição, culminando com a degeneração de constituintes do DNA⁴¹. Por outro lado, um experimento realizado por

Dufour e colaboradores (2006) com células de ovário de hamster chinês, mostrou que partículas de ZnO não são fotogenotóxicas.⁴²

Alguns pesquisadores acreditam que é necessário conduzir estudos com filtros físicos convencionais, para avaliar a capacidade de partículas com tamanho convencional de gerar radicais livres, pois, acredita-se que por apresentarem uma menor superfície de exposição à radiação UV, as formulações não nanoestruturadas apresentariam menor potencial para produzir EROs.¹²

Os estudos *in vitro* mostraram uma maior toxicidade associada à forma cristalina anatase, quando comparada à forma rutilo, tanto em relação à viabilidade celular quanto a resposta inflamatória.^{28,43,44} Esta toxicidade é consequência do alto potencial oxidativo da forma anatase, que culmina na produção de uma grande quantidade de radicais livres. Aliás, Manaia e colaboradores (2013) observaram que as NPs de TiO₂, na forma cristalina rutilo, apresentaram citotoxicidade 100 vezes menor, que a forma anatase, considerando os tamanhos similares⁷. Já, Yang, Chen e Pan (2007) relataram que as NPs de ZnO apresentam maior capacidade de emissão de elétrons que NPs de TiO₂, e que as NPs de TiO₂ na forma cristalina anatase tem maior potencial em emitir elétrons do que a forma rutilo.⁴⁵

3.6. Efeito das NPs no meio ambiente

Apesar do uso da nanotecnologia já estar difundido, seus efeitos toxicológicos ainda encontram-se pouco elucidados, podendo desenvolver efeitos indesejáveis quando liberadas no meio ambiente. A diminuta dimensão das NPs facilita a difusão e transporte das mesmas na atmosfera, água e solo, ocasionando uma interação mais rápida com os ecossistemas e dificultando a sua remoção. A principal ameaça de contaminação do meio ambiente está relacionada com os efluentes industriais, mas eles também podem chegar ao ambiente por

meio da rede de esgoto doméstica, na forma de água misturada com produtos comuns, como formulações antissolares. Diversas pesquisas mostraram que as NPs de TiO₂ e ZnO podem afetar a biodiversidade marinha, como por exemplo: podem prejudicar vermes marinhos, crustáceos, algas, peixes e mexilhões e outras espécies do mar.¹⁷

Além disso, o TiO₂ pode reagir com a luz solar e oxigênio, resultando em numerosos compostos, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Embora esse composto seja um conhecido antisséptico, níveis elevados do mesmo podem inibir o crescimento do fitoplâncton, que são pequenas plantas que formam a base de muitas cadeias alimentares dos oceanos. Os resíduos de TiO₂ também podem influenciar a vida dos corais marinhos, reduzindo seu tempo de vida.⁴⁵

Dessa forma, diante desse panorama o uso das NPs de TiO₂ e ZnO deve ser monitorado e padrões de concentrações toxicológicas aceitáveis devem ser estabelecidos. A avaliação dos possíveis efeitos adversos, principalmente em relação ao meio ambiente, necessita ser determinado para aumentar a segurança das NPs.

4. Conclusão

Os estudos de penetração avaliados, utilizando métodos *in vivo* e *in vitro*, mostraram, em sua maioria, que as NPs de TiO₂ e ZnO não são capazes de penetrar na pele, atingindo camadas viáveis. Assim, verificou-se que as NPs permanecem nas camadas mais externas do EC, apresentando maior capacidade de penetração em pele comprometida ou com a remoção dos pelos epiteliais, contudo, mesmo nessas situações as NPs não conseguiram atingir a derme. Outro fato importante é que o número de artigos que sugerem um resultado oposto é muito pequeno.

Os estudos de viabilidade e funções celulares avaliados mostraram que as NPs de TiO₂ apresentam potencial citotóxico sobre células pulmonares, hepatócitos e renais, e

esse efeito foi dependente do tempo de exposição, do tamanho das NPS, das características químicas, do revestimento da superfície e da sua cristalinidade. A toxicidade das NPS está relacionada com a sua capacidade de produzir radicais livres, quando é exposta a radiação UV, que pode agir nas células do organismo e moléculas biológicas. O potencial tóxico varia de acordo com a forma cristalina da NP, principalmente para as NPS de TiO₂, sendo que a forma anatase apresentou maior atividade oxidativa e fotocatalítica e, conseqüentemente, maior toxicidade que a forma rutilo.

Porém, esses relatos sobre a toxicidade das NPS em filtros solares são relevantes quando elas conseguem penetrar a epiderme e atingir camadas viáveis da pele. Contudo, segundo os resultados dos estudos de penetração avaliados, isso não ocorre. Sendo assim, é possível concluir que NPs de TiO₂ e ZnO utilizadas como ativos fotoprotetores, em formulações antissolares, podem ser consideradas seguras. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre a segurança dessas NPs, pois a literatura não possui um número significativo de experimentos realizados em condições reais de uso de um filtro solar, dificultando a conclusão precisa sobre os riscos das NPs.

Desta forma, faz-se necessário considerar alguns aspectos em relação aos estudos de segurança das NPs:

✓ Os experimentos *in vitro* devem utilizar pele humana, como modelo de primeira escolha;

✓ Para ter maior precisão na predição na penetração *in vitro* são necessárias mais pesquisas, com o objetivo de correlacionar testes *in vitro* e *in vivo* e validar os experimentos *in vitro*;

✓ Desenvolver guias técnicos com modelos de experimentos e execução padronizados, de forma universal.

✓ Os estudos já realizados carecem de informações como: condições experimentais utilizadas, as características das NPs e o

preparo da pele. Esses parâmetros devem ser sempre descritos.

Deve-se considerar a possibilidade de absorção oral e respiratória das NPs contidas nos protetores solares, quando são utilizadas formulações do tipo protetor labial e na forma de aerossol, respectivamente.

Referências Bibliográficas

¹ Filon, F.; Mauro, M.; Adami, G.; Bovenzi, M.; Crosera, M. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory Toxicology Pharmacology* **2015**, *72*, 310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

² Baillo, V. P.; Lima, A. L. Nanotecnologia aplicada a fotoproteção. *Revista Brasileira de Farmácia* **2012**, *93*, 271. [[Link](#)]

³ Balogh, T. S.; Pedriali, C. A.; Baby, A. R.; Velasco, M. V. R.; Kaneko, T. M. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **2011**, *86*, 732. [[Link](#)]

⁴ Forestier, S. Rationale for sunscreen development. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2008**, *58*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁵ Labouta, H. I.; Schneider, M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: nanotechnology, Biology, and Medicine* **2013**, *9*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶ Flor, J.; Davolos, M. R.; Correa, M. A. Protetores solares. *Química Nova* **2007**, *30*, 153. [[CrossRef](#)]

⁷ Manaia, E. B.; Kaminsky, R. C. K.; Corrêa, M. A.; Chiavacci, L. A. Inorganic UV filters. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *49*, 2. [[CrossRef](#)]

⁸ Boisseau, P.; Loubaton, B. Nanomedicine, Nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **2011**, *12*, 620. [[CrossRef](#)]

⁹ Prow, T. M.; Grice J. E.; Lin L. L.; Faye R.; Butler M.; Becker W.; Wurm E. M.; Yoong C.; Robertson T. A.; Soyer H. P.; Roberts M. S. Nanoparticles and microparticles for skin

- drug delivery. *Advanced Drug Delivery Review* **2011**, *63*, 470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰ Brasil. *Diagnóstico Institucional de Nanotecnologia. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA*. Brasília 25 de março de 2014. [[link](#)]
- ¹¹ Fronza, T.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Teixeira, H.; *Nanocosméticos: em Direção ao Estabelecimento de Marcos Regulatórios*. 1ª. Ed., Porto Alegre: UFRGS, 2007.
- ¹² Newman, M.D.; Stotland, M.; Ellis, J. I. The safety of nanosized particles in titanium dioxide and zinc oxide - based sunscreens. *American Academy of Dermatology* **2009**, *61*, 685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Nohynek, G. J.; Lademann, J.; Ribaud, C.; Roberts, M. S. Grey Goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and Sunscreen Safety. *Critical Reviews in Toxicology* **2007**, *37*, 251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Love, S. A. Assessing Nanoparticles Toxicity. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2012**, *5*, 181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial - *Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação* - Relatório de Acompanhamento Setorial - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. [[Link](#)]
- ¹⁶ Ricci, C.; Carbonaro, C. M.; Stagi, L.; Salis, M.; Casu, A.; Enzo, S.; Delogu, F. Anatase-to-Rutile Phase Transition in TiO₂ Nanoparticles Irradiated by Visible Light. *The Journal Physical Chemistry* **2013**, *117*, 7850. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Australia. *Literature review on the safety of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens*. Australian Government Department of Therapeutic Goods Administration (TGA). Scientific review report, 2 August 2013. [[Link](#)]
- ¹⁸ Popov, A. P.; Lademann, J.; Priezzhev, A.; Myllylä, R. A. Effect of size of TiO₂ nanoparticles embedded into stratum corneum on ultraviolet-A and ultraviolet-B sun-blocking properties of the skin. *Journal of Biomedical Optics* **2005**, *10*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Cross, S. E. Innes, B.; Roberts, M. S.; Tsuzuki, T.; Robertson, T. A.; McCormick, P. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacology and Physiology* **2007**, *20*, 148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Zvyagin, A. V.; Zhao, X.; Gierden, A.; Sanchez, W.; Ross, J. A.; Roberts, M. S. Imaging of zinc oxide nanoparticle penetration in human skin in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Optics* **2008**, *13*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Kuo, A. T.; Wu C. L.; Hsu C. T.; Lo W.; Chiang S. J.; Lin S. J.; Dong C. Y.; Chen C. C. Chemical enhancer induced changes in the mechanisms of transdermal delivery of zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Gulson, S. B. Small Amounts of Zinc from Zinc Oxide Particles in Sunscreens Applied Outdoors Are Absorbed through Human. *Toxicological Sciences* **2010**, *118*, 1, 140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ Detoni, C. B.; Coradini, K.; Back, P.; Oliveira, C. M.; Andrade, D. F.; Beck, R. C.; Pohlmann, A. R.; Guterres S. S. Penetration, photo-reactivity and photoprotective properties of nanosized ZnO. *Photochemical & Photobiological Science* **2014**, *13*, 1253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Ryu, H. J.; Seo, M. Y.; Jung, S. K.; Maeng, E. H.; Lee, S. Y.; Jang, D. H.; Lee, T. J.; Jo, K. Y.; Kim, Y. R.; Cho, K. B.; Kim, M. K.; Lee, B. J.; Son, S. W. Zinc oxide nanoparticles: a 90-day repeated dose dermal toxicity study in rats. *International Journal of Nanomedicine* **2014**, *9*, 137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Lekki, J.; Stachura, Z.; Dabros, W.; Stachura, J.; Menzel, F.; Reinert, T.; Butz, T.; Pallon, J.; Gontier, E.; Ynsa, M. D.; Moretto, P.; Kertesz, Z.; Szikszai, Z.; Kiss, A. Z. On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Sections B: Beams Interactions with Materials and Atoms* **2007**, *260*, 174. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Mavon, A.; Miquel, C.; Lejeune, O.; Payre, B.; Moretto, P. In vitro percutaneous absorption and in vivo Stratum Corneum Distribution of an Organic and Inorganic Sunscreen. *Skin Pharmacology and Physiology* **2007**, *20*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ²⁷ Kiss, B.; Biro, T.; Czifra, G.; Toth, B. I.; Kertesz, Zs.; Szikszai, Z.; Kiss, A.Z.; Juhasz, I.; Zouboulis, C. C.; Hunyadi, J. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Experimental Dermatology* **2008**, *17*, 659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ Wu, J.; Liu, W.; Xue, C.; Zhou, S.; Lan, F.; Bi, L.; Xu, H.; Yang, X.; Zeng, F. D. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology Letters* **2009**, *191*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Sadrieh, N. Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicological Science* **2010**, *115*, 156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Senzui, M.; Tamura, T.; Miura, K.; Ikarashi, Y.; Watanabe, Y.; Fujii, M. Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin. *The Journal of Toxicological Sciences* **2010**, *35*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Gamer, A. O.; Leibold, E.; van Ravenzwaay, B. The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicology In Vitro* **2006**, *20*, 301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Gontier, E.; Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion microscopy study. *Nanotoxicology* **2008**, *2*, 218. [[CrossRef](#)]
- ³³ Filipe, P.; Silva, J. N.; Silva, R.; Cirne de Castro, J. L.; Marques Gomes, M.; Alves, L. C.; Santos, R.; Pinheiro, T. Startum Corneum is an effective Barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle Percutaneous Absorption. *Skin Pharmacology and Physiology* **2009**, *22*, 266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Monteiro-Riviere, N. A. *et al.* Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study. *Toxicological Sciences* **2011**, *123*, 264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Kubo, A.; Nagao, K.; Amagai M. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *The Journal of Clinical Investigation* **2012**, *122*, 440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Vogt, A.; Rancan, F.; Ahlberg, S.; Nazemi, B.; Choe, C. S.; Darvin, M. E.; Hadam, S.; Blume-Peytavi, U.; Loza, K.; Diendorf, J.; Epple, M.; Graf, C.; Ruhl, E.; Meinke, M. C.; Lademann, J. Interaction of dermatologically relevant nanoparticles with skin cells and skin. *Beilstein Journal Nanotechnology* **2014**, *5*, 2363. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Marquis, B. J.; Love, S. A.; Braun, K. L.; Haynes, C. L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. *Analyst* **2009**, *134*, 425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Barillet, S.; Simon-Deckers, A.; Herlin-Boime, N.; Mayne-L'Hermite, M.; Reynaud, C.; Cassio, D.; Gouget, B.; Carrière, M. Toxicological consequences of TiO₂ nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: in vitro study. *Journal Nanoparticle Research* **2010**, *12*, 61. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Cho, W. S.; Duffin, R.; Poland, C. A.; Howie, S. E. M.; MacNee, W.; Bradley, M.; Megson, I. L.; Donaldson, K. Metal Oxide Nanoparticles Induce Unique Inflammatory Footprints in the Lung: Important Implications of Nanoparticle Testing. *Environmental Health Perspectives* **2010**, *118*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Hussian, S.; Thomassen, L. C. J.; Ferecatu, I.; Borot, M. C.; Andreau, K.; Martens, J. A.; Fleury, J.; Baeza-Squiban, A.; Marano, F.; Boland, S. Carbono black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology* **2010**, *7*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Hidaka, S.; Kobayashi H.; Koike T.; Sato T.; Serpone, N. DNA damage photoinduced by cosmetic pigments and sunscreen agents under solar exposure and artificial UV illumination. *Journal of Oleo Science* **2006**, *55*, 249. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Dufour, E. K.; Kumaravel, T.; Nohynek, G. J.; Kirkland, D.; Toutain, H. Clastogenicity, photo-clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: Genotoxic effect of zinc oxide in the dark, in pre irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster

ovary cells. *Mutation Research* **2006**, *607*, 215. [[CrossRef](#)]

⁴³ Braydich-Stolle L. K. Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity. *Journal Nanoparticle Research* **2009**, *11*, 1361. [[CrossRef](#)]

⁴⁴ Pan, Z.; Lee, W.; Slutsky, L.; Clark, R. A. F.; Pernodet, N.; Rafailovich, M. H. Adverse

effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cell. *Small* **2009**, *5*, 511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁴⁵ Yang, Y. H.; Chen, H.; Pan, G. Particle concentration effect in adsorption / desorption of Zn(II) on anatase type nano TiO₂. *Journal of Environmental Sciences* **2007**, *19*, 1442. [[CrossRef](#)]