

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO E MUTAGÊNICO DO NANOVETOR VITAMINA C EM CELULAS MERISTEMATICAS DE RAIZ DE *Allium cepa*

Mariana Petit Teófilo de Araujo^{1,5}

Gabriela Rodrigues de Sousa^{2,5}

Guilherme Alves Ferreira^{4,5}

Hellen Karine Paes Porto⁶

Mônica de Oliveira Santos^{5,7}

Verônica Passos Cordeiro de Oliveira^{2,5}

Aroldo Vieira de Moraes Filho^{3,5,7}

RESUMO: A vitamina C, ácido ascórbico, é importante por exercer múltiplas funções metabólicas de oxidação-redução. Apesar da importância, o ácido ascórbico é instável, por isso, na cosmetologia, utiliza-se a técnica de encapsulamento de substâncias ativas através da nanotecnologia. Nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que altera as propriedades de um material para a escala nanométrica pela combinação de diversos fatores para que objetos com dimensões pequenas tenham efeitos quânticos que se manifestem de maneira mais evidente; observa-se que quanto menor for o tamanho da amostra, maior será os efeitos na superfície, pelo aumento da proporção entre a sua área e seu volume. Os princípios da nanotecnologia foram introduzidos na cosmética há alguns anos e o nanoencapsulamento de ingredientes ativos é promissor por potencializar o cosmético comum, por: aumentar a estabilidade físico-química do produto durante seu prazo de validade no mercado; promover a melhoria da aplicação tátil-sensorial; apresenta liberação controlada; direcionamento para locais específicos; promoção da penetração cutânea; eficácia comprovada no curto prazo. Contudo, no presente estudo houveram reações inesperadas dessa vitamina através da avaliação do potencial anti mutagênico e mutagênico do Nanovetor Vitamina C em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. Conclui-se que apesar de ser antioxidante ela foi genotóxica na maior concentração testada (20%/L).

Palavra-chave: Nanopartícula de Vitamina C. Aberrações Cromossômicas. Genotoxicidade.

ABSTRACT: Vitamin C, ascorbic acid, is important because it exerts multiple metabolic oxidation-reduction functions. Despite the importance, ascorbic acid is unstable, so in cosmetology, the technique of encapsulation of active substances through nanotechnology is used. Nanotechnology is a multidisciplinary science that changes the properties of a material to the nanoscale by combining several factors so that objects with small dimensions that quantum effects manifest more clearly; It is observed that the smaller the sample size, the greater the effects on the surface, the increase in the proportion between its area and its volume. The principles of nanotechnology were introduced in cosmetics a few years ago and the nanoencapsulation of active ingredients is promising for

¹ Graduada em Nutrição pela UNIP – Goiânia e Acadêmica do Curso de Biomedicina.

² Pesquisadora Colaboradora. Acadêmica do curso de Biomedicina.

³ Professor Dr. e Orientador.

⁴ Professor Mestre.

⁵ Faculdade Alfredo Nasser.

⁶ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás.

⁷ Pós-Doutorandos em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Goiás.

E-mail: marianapetit@gmail.com

potentiating the common cosmetic by: increasing the physicochemical stability of the product during its shelf-life; Improvement of tactile-sensory application; Controlled release; Targeting specific locations; Promoting penetration of the skin; Effectiveness in the short term. However, in the present study there were unexpected reactions of this vitamin through the evaluation of the antimutagenic and mutagenic potential of Nanovetor Vitamin C in *Allium cepa* meristematic root cells. It was concluded that although it was an antioxidant, it was genotoxic at the highest concentration tested (20% / L).

Keywords: Nanoparticle of Vitamin C. Chromosomal Aberrations. Genotoxicity

1. INTRODUÇÃO

A vitamina C, ácido ascórbico, é o fator antiescorbútico, originalmente isolado do tecido da suprarrenal. Ela tem muitas funções metabólicas como: cofator enzimático, fator protetor e reagente com transição de íons metálicos. Cada função envolve propriedade de redução-oxidação da vitamina. Tal reação servirá como um sistema redox bioquímico envolvido em muitas reações de transporte de elétrons incluindo aquelas envolvidas na: síntese de colágeno, degradação de 4-hidroxifenilpiruvato, síntese de norepinefrina e dessaturação de ácidos graxos. Para tais reações a vitamina pode extinguir espécies reativas ao oxigênio, potencialmente tóxicas, tais como o superóxido ou o radical hidroxil e regenerar o tocoferol do radical tocoferoxil. O ascorbato funciona como um co-substrato para, pelo menos, oito enzimas: três envolvidas nas hidroxilações lisina/prolina, duas necessárias para a biossíntese de carnitina, duas funcionais na biossíntese de hormônio e uma envolvida no metabolismo do aminoácido tirosina (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2002).

Além disso, a vitamina C, é essencial para: oxidação de fenilalanina e tirosina, a conversão de folacina em ácido tetraidrofólico, conversão de triptofano em 5-hidroxitriptofano e o neurotransmissor serotonina e formação de norepinefrina a partir de dopamina, além disso reduz o ferro sérico em ferroso no trato gastrointestinal (TGI) para facilitar a absorção (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2002).

Muitos ativos naturais pesquisados ultimamente são compostos instáveis, sofrem reações que levam à diminuição ou perda de eficácia e até mesmo a degradação do produto. Por isso, essas novas propostas tecnológicas estão em desenvolvimento, para melhorar o desempenho dos produtos cosméticos e sua aceitação pelo consumidor. Uma alternativa para aumentar a estabilidade e, ainda,

permitir a liberação controlada é o encapsulamento das substâncias ativas através de técnicas que envolvem a nanotecnologia (DAUDT et al., 2013).

Nano é um termo técnico usado em qualquer medida, significando um bilionésimo dessa unidade, nanotecnologia significa a habilidade de manipular átomo com pretensão de criar estruturas maiores fundamentalmente e para fins comerciais. É uma ciência multidisciplinar que inclui conhecimentos da biologia, física, química, engenharia, matemática, computação e de outros ramos da ciência (DURÁN et al., 2006; MARQUES, 2008).

Para alterar as propriedades de um material para a escala nanométrica se deve levar em consideração a combinação de fatores: 1 – de objetos com essas dimensões que os efeitos quânticos se manifestam de maneira mais evidente; 2 – Observa-se que quanto menor for o tamanho da amostra, maior será os efeitos na superfície, pelo aumento da proporção entre sua área e seu volume. A teoria quântica, um ramo da física que explica o comportamento dos átomos e dos elétrons na matéria. Os elétrons comportam-se, como ondas, a manifestação mais evidente é quando o material tem dimensões nanométricas (MELO;PIMENTA, 2004).

Os princípios da nanotecnologia foram introduzidos na área cosmética há alguns anos. No período entre 1994 e 2005, a L'Oreal (França) foi classificada como a quinta empresa no mundo com base no número de patentes relacionadas à nanotecnologia depositadas (FARAJI e WIPF, 2009). Outras grandes empresas já utilizam a técnica de nanoencapsulamento em seus produtos, como, por exemplo, Lancôme e Givenchy (DURÁN et al., 2006). No Brasil, por exemplo, a empresa O Boticário apresenta uma linha de tratamento antienvelhecimento composta por diferentes produtos utilizando a nanotecnologia.

O nanoencapsulamento de ingredientes ativos é promissor por potencializar o cosmético comum, pois propicia: 1 – aumento da estabilidade físico-química do produto durante seu prazo de validade no mercado; 2 – melhoria da aplicação tátil-sensorial; 3 – liberação controlada; 4 – direcionamento para locais específicos; 5 – promoção da penetração cutânea; 6 - eficácia comprovada no curto prazo (CANAVEZ, 2001; GARVIL et al., 2011; GONÇALVES e MEJIA, 2016; GOMES, 2013). Adicionalmente, o uso de nanossistemas por si só permite obter efeitos benéficos ao nível da pele: 1 – manutenção da integridade da barreira cutânea; 2 – aumento da eficácia e tolerância dos filtros solares à superfície; 3 – obtenção de produtos mais atrativos do ponto de vista estético (GONÇALVES e MEJIA, 2016; GOMES, 2013).

Há discussões em torno da capacidade desses nanomateriais penetrarem na pele e serem direcionados para via sistêmica podendo causar possíveis doenças ou interações com sistema fisiológico humano, mas ainda não se comprova (CANAVEZ, 2011; DUTRA, 2015). Pesquisas confirmaram que a penetração cutânea passiva e a permeação de produtos altamente lipofílicos, como o protetor solar octilmetoxicinamato (OMC) e o corante fluorescente Nile Red (NR), encapsulados em nanopartículas biodegradáveis de poli(ε)caprolactona, comparativamente aos mesmos produtos não encapsulados. Os autores observaram que o encapsulamento nanoparticulado produziu um aumento de 3,4 vezes no nível de OMC dentro do estrato córneo, apesar do uso de nanopartículas não ter aumentado a permeação da pele, aumentou sua disponibilidade no estrato córneo. As nanopartículas contendo NR, na fluorescência alcançou profundidades maiores (acima de 60 μm) dentro da pele, comparativamente quando dissolvido em propilenoglicol, e que a alteração de distribuição foi devida, ao menos em parte, a atividade termodinâmica alterada que resultou em um aumento de seu coeficiente de partição no estrato córneo (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; BARIL, 2012). Nesse contexto, por apresentarem resultados positivos, a utilização de nanopartículas tem aumentado no mercado de trabalho e na área de cosmetologia.

Portanto, é necessário acompanhar a segurança dessas nanopartículas em relação a saúde humana. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a genotoxicidade do nanovetor vitamina C em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Bulbos de cebola orgânica foram adquiridos no comércio local com fonte confiável. Retirou-se as escamas externas secas sem danificar a área radicular e o parênquima central da coroa de brotamento também foi retirado, por incisão circular, afim de aumentar a absorção e a uniformidade do brotamento e crescimento das raízes. Após lavar os bulbos em água corrente por cerca de 20 minutos, foram expostos às amostras, em béqueres de vidro cobertos com papel, evitando a entrada de luz, de forma que apenas o parênquima central da coroa de brotamento ficasse em contato com as amostras. Para cada amostra analisada, utilizou-se cinco bulbos de cebolas as quais foram expostas às amostras por 24 horas. O controle negativo foi realizado da mesma maneira utilizando água destilada (RANK e NIELSEN, 1993; KRUGER, 2009; CUCHIARA, 2012).

O controle positivo foi Paracetamol® na concentração 800 mg/L. Para o teste de mutagênese, as concentrações-testes do Nanovetor Vitamina C padronizadas foram de 5%, 10% e

20% mL/L, uma vez que a concentração máxima indicada para cosméticos é de 20% (SALLES, 2017).

Para a avaliação da antimutagenese fez-se o cotratamento com o controle positivo, Paracetamol®, na concentração de 800 mg/L e as concentrações-testes da Nanovetor Vitamina C padronizadas para a realização experimentos (5%, 10% e 20%).

Após o crescimento, as raízes imersas nas amostras foram medidas e em seguida fixadas em solução de Carnoy (ácido acético e álcool etílico, na concentração de 3:1) por 12 horas. Após fixação, as raízes foram lavadas em água destilada por cinco minutos e realizada a coloração em lâminas. Para tanto, as raízes foram coradas em coranteorceína acética, na diluição deorceína 2% e ácido acético a 45%. As pontas das raízes foram cortadas e aquecidas por 20 segundos, em contato com o corante. Em seguida, as raízes foram colocadas em lâminas, cobertas por lamínulas. Posteriormente, a raiz foi esmagada por pressão suave. A observação das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com objetiva de 100x, procedendo a contagem de 5.000 células, observando os índices mitóticos e as alterações cromossômicas e mitóticas (RANK e NIELSEN, 1993; RIBEIRO et al., 2012; DIAS, 2014).

O cálculo do índice mitótico (IM) e do índice de aberrações cromossômicas e mitóticas (IACM) ocorreu de acordo com as equações abaixo:

$$IM = n^{\circ} \text{ de células em mitose} \times 100 \div n^{\circ} \text{ total de células observadas}$$

$$IACM = n^{\circ} \text{ de células alteradas} \times 100 \div n^{\circ} \text{ total de células observadas}$$

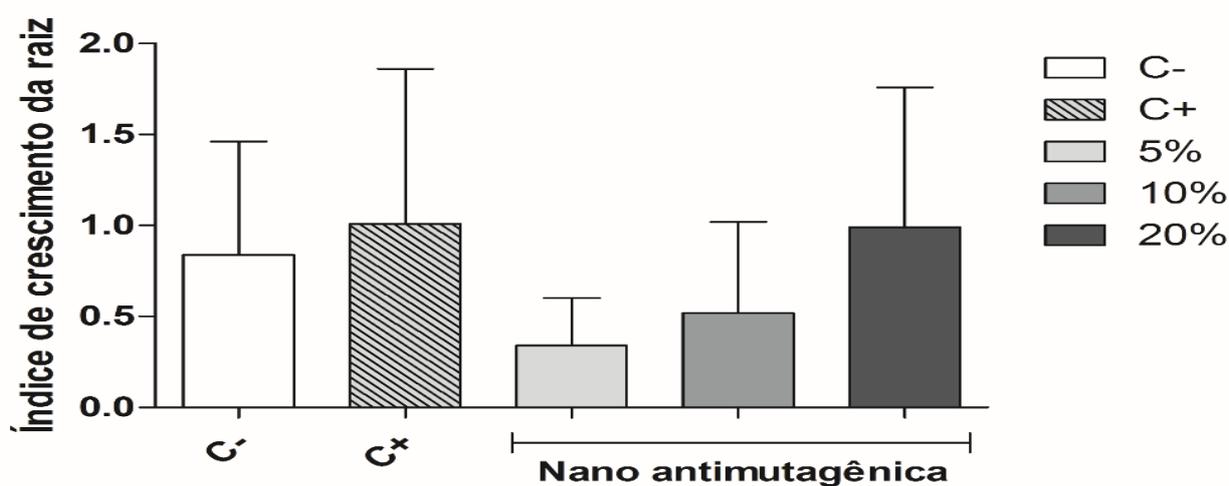
Para análise estatística, foi utilizado o teste ANOVA, com nível de significância $\alpha = 0,05$, utilizando o pacote estatístico GrafPad Prism 5.0.

3. RESULTADOS

A caracterização da genotoxicidade e citotoxicidade do Nanovetor de Vitamina C foi realizada por análise do crescimento radicular de *Allium cepa*, com a finalidade de avaliar a inibição do crescimento da raiz, o índice mitótico (IM) e o índice de anormalidades cromossômicas e mitóticas (IACM).

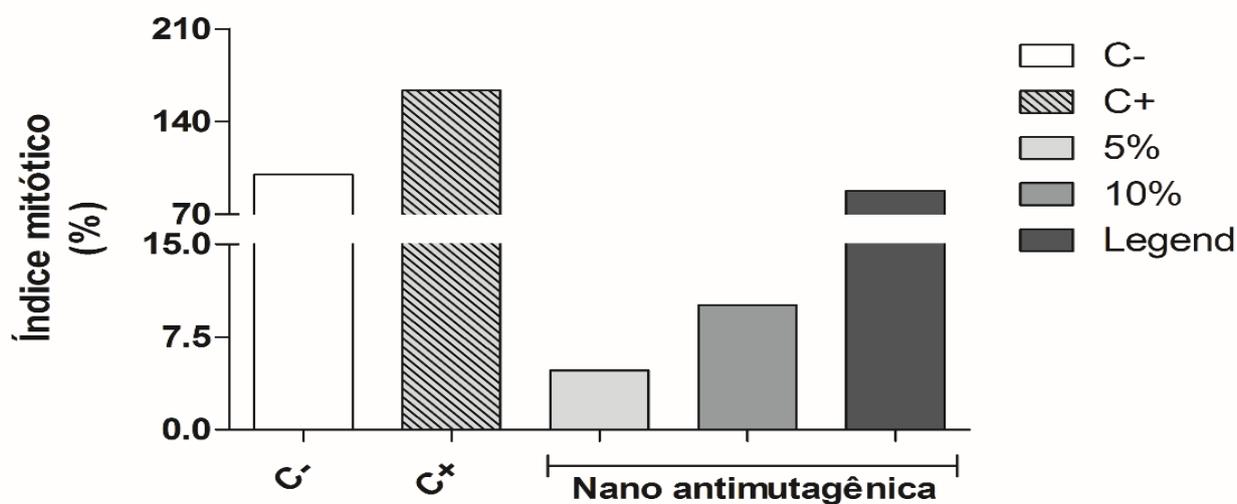
Para a antimutagênese, o resultado da análise de variância, pelo teste ANOVA, do crescimento radicular está descrito na Figura 1. Observou-se que houve diminuição estatisticamente significativa do crescimento radicular da *A. cepa* nas concentrações de 5 e 10% em relação do controle positivo.

FIGURA 1: Avaliação Antimutagênica do Índice de Crescimento das Raízes de *Allium cepa* cotratadas com nanovetor de Vitamina C e Paracetamol®.



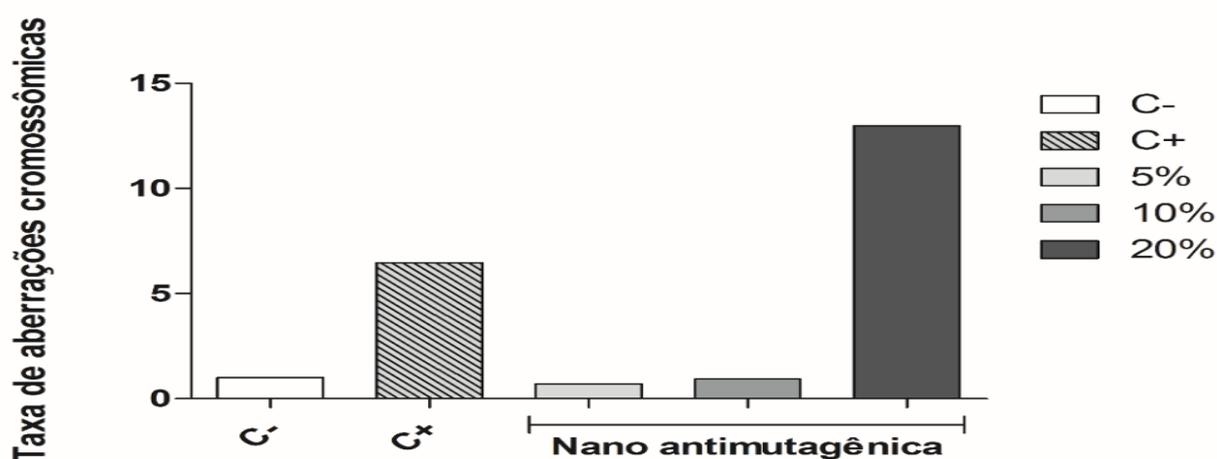
Em relação ao IM, quando comparados o controle negativo e os tratamentos, nas três concentrações o medicamento reduziu significativamente o IM, conforme pode ser observado na Figura 2.

FIGURA 2: Avaliação Antimutagênica do Índice Mitótico em células de *Allium cepa* cotratadas com nanovetor de Vitamina C e Paracetamol®.



A Vitamina C reduziu significativamente o IACM, nas duas menores concentrações (5 e 10%) quando comparado com o controle positivo, demonstrando ação antimutagênica nessas concentrações. Porém, na maior concentração testada (20%), o nanovetor de vitamina C potencializou a quantidade de aberrações cromossômicas ocasionadas pelo controle positivo (Figura 3).

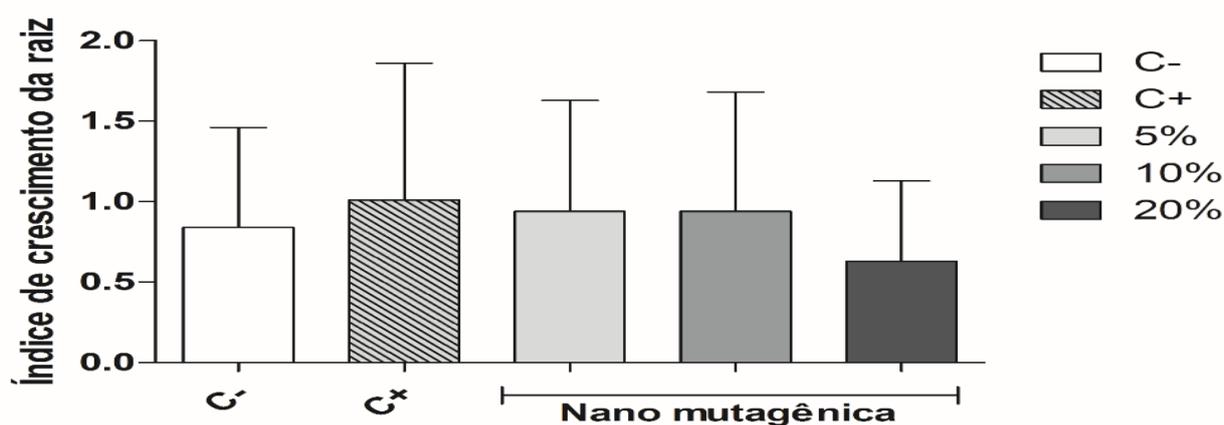
FIGURA 3: Avaliação Antimutagênica da Taxa de Aberrações Cromossômicas em células de *Allium cepa* cotratadas com nanovetor de Vitamina C e Paracetamol®.



Em relação a mutagênese, o resultado da análise de variância, pelo teste ANOVA, do crescimento radicular está descrito na Figura 4. Não foram observadas diferenças significativas no

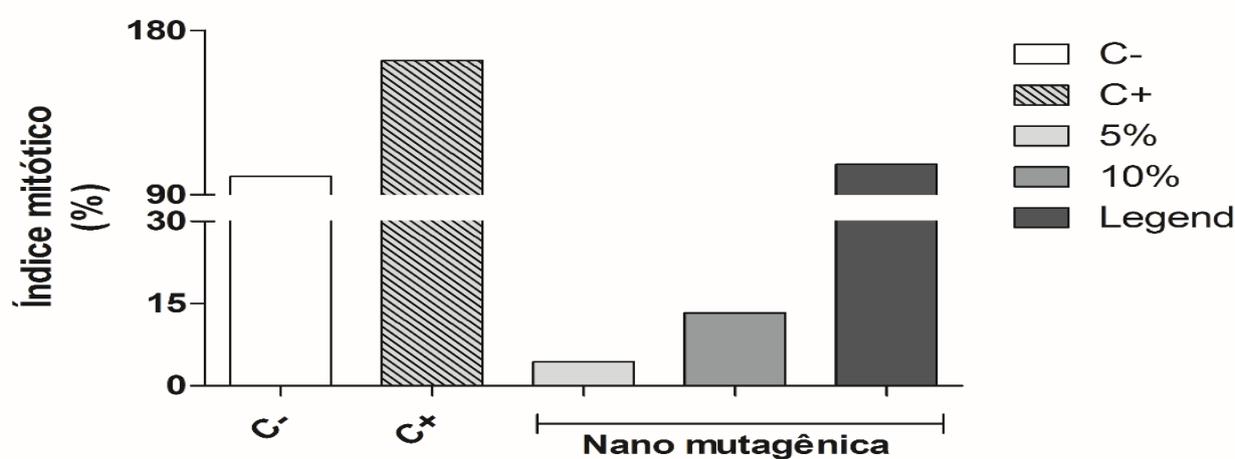
crescimento radicular da *A. cepa* quando comparados os tratamentos e o controle negativo, portanto o nanovetor da Vitamina C não interferiu no crescimento das raízes de cebola.

FIGURA 4: Avaliação Mutagênica do Índice de Crescimento das Raízes de *Allium cepa* tratadas com nanovetor de vitamina C.



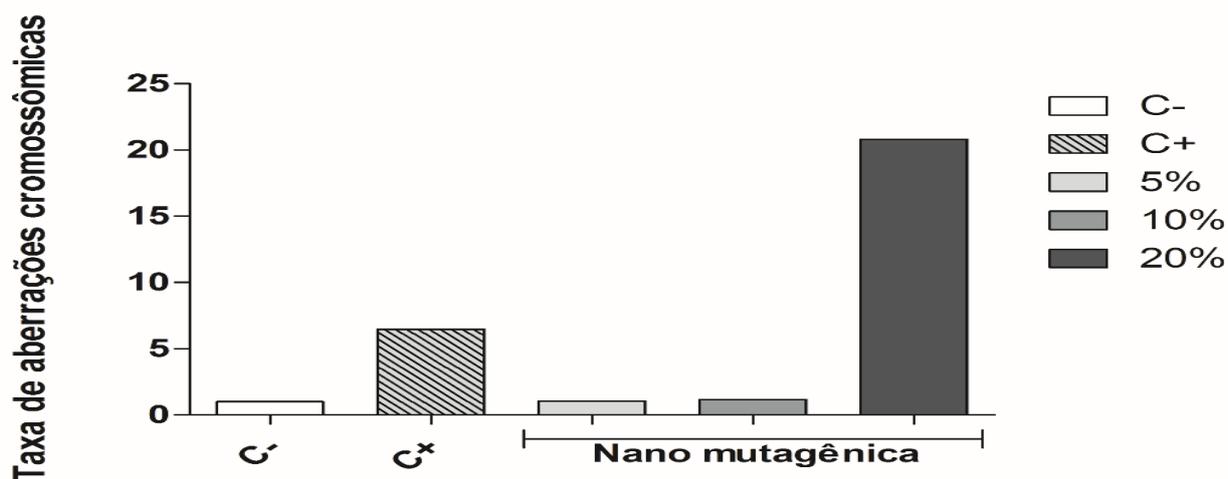
Em relação ao IM, quando comparados com o controle negativo e os tratamentos, nas duas menores concentrações (5 e 10%), a substância-teste reduziu significativamente o IM, conforme pode ser observado na Figura 5.

FIGURA 5: Avaliação Mutagênica do Índice Mitótico em células de *Allium cepa* tratadas com nanovetor de vitamina C.



O nanovetor de Vitamina C aumentou significativamente o IACM quando comparado com o controle negativo apenas na maior concentração testada (20%) (Figura 6), apresentando potencial mutagênico apenas nessa concentração.

FIGURA 6: Avaliação Mutagênica da Taxa de Aberrações Cromossômicas em células de *Allium cepa* tratadas com nanovetor de vitamina C.



4. DISCUSSÃO

A vitamina C é um potente antioxidante que, mesmo em pequenas quantidades é indispensável na proteção das moléculas de proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA e RNA). Além disso, segundo Frei (1999) e Yousef et al. (2007) protege das lesões oxidativas, danos por radicais livres, e reações oxidativas causadas pelo funcionamento regular do metabolismo, ocasionados pela exposição às toxinas e poluentes, corroborando com os dados das antimutagênese encontrados nessa pesquisa com o nanovetor dessa vitamina nas concentrações de 5 e 10%.

Entretanto, estudos mostram que a vitamina C na presença de íons metálicos pode ter ação genotóxica, em algumas células havendo geração de radicais livres (LEE et al., 2001; ASPLUND et al., 2002), corroborando com os dados encontrados nessa pesquisa na concentração de 20%.

As concentrações de vitamina C nos níveis plasmáticos humano são de 20 a 200 μM , dependendo da dieta e do tempo de amostragem em relação à ingestão (LIU et al., 1982). Pesquisas já revelaram perda na viabilidade celular após tratamento de 72 hs em células HL-60 e também em

ensaios de LDH (*Lactate dehydrogenase*), pois em ambos houve aumento das células apoptóticas, de acordo com maiores concentrações e tempo de exposição ao tratamento (ARRANZ et al., 2008). No entanto, estudos anteriores demonstraram que a toxicidade da vitamina C é seletiva para algumas células tumorais (BRAM et al., 1980).

A explicação da seletividade da vitamina C na indução de apoptose das células é que há um aumento na produção da ROS (*Reactive Oxygen Species*) na presença de vitamina C *in vitro*. Essa genotoxicidade direta da vitamina C *in vitro* é melhorada, pois as partículas sobrenadantes da vitamina C permanecerão no meio de cultura, reduzindo os íons de metais de transição e gerando peróxido de hidrogênio e radicais livres (HALLIWELL, 1996; CLEMENT et al., 2001; GUAQUIL et al., 2001; BUONOCORE et al., 2010; LEVINE et al., 2011), corroborando com os dados encontrados nesse trabalho.

No entanto, devido a constante exposição a poluentes, a estabilidade do genoma humano está instável, com isso é importante manter a ingestão de antioxidantes naturais, pois servem para proteger o genoma humano de mutações, desde que, sejam utilizados nas concentrações corretas, como demonstrado pelos dados encontrados no teste de antimutagenese.

AGRADECIMENTOS

À empresa Aguce por disponibilizar o nanovetor de vitamina C para os testes.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KAILA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004.

ARRANZ, N.; HAZA, A.I.; GARCIA, A.; DELGADO, M.E.; RAFTER, J.; MORALES, P. Inhibition by vitamin C of apoptosis induced by N-nitrosamines in HepG2 and HL-60 cells. **Article in Journal of Applied Toxicology** 28(6):788-96, 2008 with 17 Reads. DOI: 10.1002/jat.1340, 2008.

ASPLUND, K.; JANSSON, P.J.; LINDQVIST, C.; NORDSTROM, T. Measurement of ascorbic acid (Vitamin C) induced hydroxyl radical generation in household drinking water. **Free Rad. Res.** 36: 1271-1276, 2002.

BARIL, M. B; FRANCO, G. F; VIANA, R. S; ZANIN, S. M. W. **Nanotecnologia Aplicada aos Cosméticos**. Visão Acadêmica, Curitiba, v.13, n.1 - ISSN 1518-5192, 2012.

BRAM, S.; FROUSSARD, P.; GUICHARD, M. **Ascorbic acid preferential toxicity for malignant melanoma cells.** *Nature* 284: 629–631, 1980.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M.L. **Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species.** Department of Pediatrics, Obstetrics and Reproductive Medicine, University of Siena, Policlinico Santa Maria alle Scotte, V. le Bracci 36, 53100 Siena, Italy. 2010.

CANAVEZ, M. J. M. O uso da nanotecnologia nas empresas: Um estudo de caso no setor cosmético. Universidade Federal de Paraná. Curitiba, 2011.

CLEMENT, M.V.; RAMALINGAM, J.; LONG, L.H.; HALLIWELL, B. 2001. The in vitro cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide. *Antioxid. Redox Signal.* 3: 157–163, 2001.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V.L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. *Tecnologia Ciência Agropecuária*, v. 6, n. 1, p. 33-38, 2012.

DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. *Cienc. Cult.* Vol.65, n.3, pp. 28-31. ISSN 0009-6725, 2013.

DIAS, M. G. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (LF) Willd. (*Asteraceae*) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. *Revista brasileira plantas medicinais*, v. 16, n. 2, p. 202-208, 2014.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. 1 ed. São Paulo: Artlier, 2006.

DUTRA, F. N. **O tratamento jurídico dos riscos produzidos por cosméticos baseados em materiais nanoestruturados.** Disponível em: <http://lqes.iqm.unicamp.br/images/vivencia_lqes_monografias_dutra_tratamento_juridico.pdf>. Acesso em: 20 fevereiro 2015.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorgan. Med. Chem.** v. 17, p. 2950-2962. Instituto de Tecnologia e Estudos de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos. Brasil, 2009.

FREI, B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 222: 196–204, 1999.

GARVIL, M. P.; ARANTES, D. E.; GOUVEIA, C. A. **Nanotecnologia em cosméticos e dermocosméticos.** São Paulo, 2011.

GOMES, A. P. A. **Nanotecnologia aplicada ao tratamento de acne.** Lisboa, 2013.

- GONÇALVES, L. S.; MEJIA, D. P. M. **O Uso da Nanotecnologia na Formulação de Cosméticos. Faculdade Cambury.** Disponível em: <http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/18/116-O_uso_da_Nanotecnologia_na_FormulaYYo_de_CosmYticos.pdf .> Acesso em: 04/02/2016 às 15 hs 24 min.
- GUAQUIL, V.; VERA, J.; GOLDE, D. Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL- 60 cells. **J. Biol. Chem.** 276: 40955–40961, 2001.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Rad. Res.** 25: 57–74, 1996.
- KRUGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com Allium cepa.** Novo Hamburgo Dissertação de Mestrado em Qualidade Ambiental – Feevale, 2009.
- LEE, S.H.; OE, T.; BLAIR, I.A. **Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins.** **Science** 292: 2083 – 2086, 2001.
- LEVINE, M.; PADAYATTY, S.J.; ESPEY, M.G. Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. **Am Soc Nutr.** 2011; 2: 78-88.
- LIU, T.Z.; CHIN, N.; KISER, M.; BIGLER, W.N. Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbic acid oxidase. **Clin. Chem.** 28: 2225–2228. 1982.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause: **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia.** 10ª ed. São Paulo: Roca, cap. 04, págs. 97 e 98, 2002.
- MARQUES, L. **Proposta de um modelo de análise multidimensional para impactos de novas tecnologias: interações entre nanotecnologia, economia, sociedade e meio-ambiente.** Faculdades de Administração da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- MELO, C.; PIMENTA, M. **Parcerias Estratégicas: Nanociência e Nanotecnologia.** Vol. 09, nº 18, 2004.
- MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STROMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, vol. 57, nº875. 2012.
- RANK, J; NIELSEN, M. H. A modified Allium test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-53, 1993.
- RIBEIRO, C. A. O.; REIS FILHO, H. S.; GROTZNER, S. R. **Técnicas e Métodos para Utilização Prática de Microscopia.** São Paulo: GEN - Grupo Editorial Nacional, Editora Santos 1: 440, 2012.

SALLES, C. **Vitamina C**: a nova e mais eficiente versão do ativo que trata rugas e manchas. Disponível em: < <http://boaforma.abril.com.br/beleza/vitamina-c-a-nova-e-mais-eficiente-versao-do-ativo-que-trata-rugas-e-manchas/>>. Acesso em: 03//06/2017 às 18:03h.

YOUSEF, M.I.; AWAD, T.I.; ELHAG, F.A.; KHALED, F.A. **Study of the protective effect of ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant enzymes and biochemical parameters in rabbits.** Toxicology 235: 194–202, 2007.