

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Milena Maciel Santos

**Avaliação da ação quimiopreventiva de formulação nanoestruturada contendo
quercetina contra efeitos genotóxicos e mutagênicos**

Juiz de Fora

2022

Milena Maciel Santos

**Avaliação da ação quimioprotetiva de formulação nanoestruturada contendo
quercetina contra efeitos genotóxicos e mutagênicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos

Orientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Maciel Santos, Milena .

Avaliação da ação quimiopreventiva de formulação nanoestruturada contendo quercetina contra efeitos genotóxicos e mutagênicos / Milena Maciel Santos. -- 2022.

79 p. : il.

Orientador: Frederico Pittella

Coorientador: Guilherme Diniz Tavares

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. quimioprevenção. 2. quercetina. 3. carreadores lipídicos nanoestruturados. 4. radiação UVA. 5. Ensaio cometa. I. Pittella, Frederico, orient. II. Diniz Tavares, Guilherme , coorient. III. Título.

Milena Maciel Santos

Avaliação da ação quimiopreventiva de formulação nanoestruturada contendo quercetina contra efeitos genotóxicos e mutagênico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 06 de maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Pittella Silva - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola

Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Michele Munk Pereira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 11/04/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Pittella Silva, Professor(a)**, em 09/05/2022, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Diniz Tavares, Professor(a)**, em 09/05/2022, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 09/05/2022, às 13:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila Gava Mazzola, Usuário Externo**, em 10/05/2022, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0740350** e o código CRC **D5CCD687**.

AGRADECIMENTO

Queria agradecer inicialmente à Deus e Nossa Senhora por serem meu refúgio
Agradeço aos meus pais, Sueli e Hélio, por sempre me apoiarem e sempre ajudarem. Vocês são os melhores, sem vocês eu jamais conseguiria. Amo vocês!

Agradeço ao meu noivo Gabriel por todo incentivo, companheirismo e amor. Seu apoio foi essencial!

Agradeço especialmente ao meu orientador Fred. Obrigada por ter aceitado me orientar, por todos os ensinamentos compartilhados e desafios. Foi uma honra ter sido orientada por você. Vou levar todos os conselhos para a vida

Agradeço imensamente ao meu coorientador Guilherme. Obrigada por sempre estar disposto a me ensinar. Obrigada pela parceria de sempre, você é admirável!

Agradeço a Bia por sempre me ajudar. Obrigada por me consolar com os resultados não esperados. Você é uma grande pesquisadora.

Obrigada as amigas mais lindas: Allana, Kezia, Mirsiane, Natália e Livia. Vocês tornaram os dias no laboratório bem mais leves. Agradeço também a amizade da Nádia e da Jéssica, sempre é bom estar com vocês. E também de todos os amigos do LDnano.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas pela disponibilidade do microscópio de fluorescência, especialmente ao técnico Rogério.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade desta conquista e por ter possibilitado a execução desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora por terem aceito o convite e pela disponibilidade em avaliar e contribuir com esta dissertação.

À CAPES e UFJF pelos recursos fornecidos para execução desse projeto.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a execução desse trabalho.

Muito obrigada!

*"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei
para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria
ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes"*
(Martin Luther King)

RESUMO

O mecanismo de defesa antioxidante da pele conta a radiação UV não é suficiente para eliminação dos radicais livres produzidos. Assim, é inquestionável a importância do uso de substâncias antioxidantes. Dentre os agentes quimiopreventivos, é possível destacar substâncias naturais, como a quercetina. No entanto, a baixa solubilidade em água, meia-vida reduzida, instabilidade química e baixa permeabilidade através da pele dificulta sua aplicação tópica. Assim, a nanoencapsulação desse ativo é uma alternativa promissora. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados visando a encapsulação de quercetina (CLN-QCT) com intuito de quimioprevenção contra os efeitos danosos da radiação UVA. Os CLN foram desenvolvidos por irradiação ultrassônica utilizando-se uma mistura de lipídeos de origem vegetal e copolímeros em bloco. Os CLN apresentaram características físico-químicas semelhantes às descritas na literatura, com DHm de $230,7 \text{ nm} \pm 30,6$, PZ de $-36,5 \pm 2,1 \text{ mV}$, IP de $0,247 \pm 0,07$ e EE de $91,29 \pm 2,09\%$. Durante três meses, a formulação apresentou estabilidade preliminar satisfatória em todas as condições de armazenamento. No ensaio com a linhagem de fibroblastos, foi observado que a nanoestruturação pode contribuir para uma maior tolerabilidade das células em relação a QCT livre. Por outro lado, para os queratinócitos, não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade celular para a QCT e os CLN-QCT. Ademais, para ambas linhagens celulares, a formulação contendo $50 \text{ } \mu\text{g/mL}$ de QCT não apresentou diferença significativa na viabilidade das células quando em comparação ao controle negativo. No ensaio cometa, foi possível observar que os CLN contendo QCT ($50 \text{ } \mu\text{g/mL}$) foram eficazes em impedir danos ao DNA das células de fibroblastos, os quais foram ocasionados pela radiação UVA. Esse efeito foi mais pronunciado quando em comparação à QCT livre e aos grupos controle. Diante disso, é possível sugerir que o nanocarreador desenvolvido possa ser promissor para a prevenção de efeitos danosos ao DNA decorrentes da radiação UVA.

Palavras-chave: Radiação UVA, quimioprevenção, quercetina, carreadores lipídicos nanoestruturados, ensaio cometa

ABSTRACT

The skin's antioxidant defense mechanism against UV radiation is not sufficient to eliminate the free radicals produced. This, the importance of using antioxidant substances is unquestionable. Among the chemopreventive agents, it is possible to highlight natural substances, such as quercetin. However, the low water solubility, reduced half-life, chemical instability and low permeability through the skin makes its topical application difficult. This, the nanoencapsulation of this active is a promising alternative. This, the present work aimed to develop nanostructured lipid carriers for the encapsulation of quercetin (CLN-QCT) with the aim of chemoprevention against the harmful effects of UVA radiation. NLCs were developed by ultrasonic irradiation using a mixture of plant-derived lipids and block copolymers. The NLCs showed physicochemical characteristics similar to those described in the literature, with DHm of $230.7 \text{ nm} \pm 30.6$, PZ of -36.5 ± 2.1 mV, IP of 0.247 ± 0.07 and EE of $91.29 \pm 2.09\%$. During three months, the formulation showed satisfactory preliminary stability under all storage conditions. In the assay with the fibroblast lineage, it was observed that nanostructuring may contribute to a greater tolerability of cells in relation to free QCT. On the other hand, for keratinocytes, there was no significant difference between the cell viability values for QCT and CLN-QCT. Furthermore, for both cell lines, the formulation containing $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ of QCT showed no significant difference in cell viability when compared to the negative control. In the comet assay, it was possible to observe that NLCs containing QCT ($50 \text{ }\mu\text{g/mL}$) were effective in preventing damage to the DNA of fibroblast cells, which was caused by UVA radiation. This effect was more pronounced when compared to free QCT and control groups. In view of this, it is possible to suggest that the developed nanocarrier may be promising for the prevention of DNA-damaging effects resulting from UVA radiation.

Keywords: UV radiation, chemoprevention, quercetin, nanostructured lipid carriers, comet assay

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Espectro eletromagnético solar	18
Figura 2 - Geração de Espécies Reativas de Oxigênio	20
Figura 3 - Esquema simplificado das alterações bioquímicas e vias de sinalização envolvidas na pele após a exposição à radiação UV	23
Figura 4 - Alterações genéticas causadas por um agente genotóxico (Genotoxicidade e Mutagenicidade).....	27
Figura 5 – Esquema simplificado com as etapas do ensaio Cometa	29
Figura 6 - Exemplo de ensaio cometa.....	30
Figura 7 - Classificação visual sugerida por COLLINS, MA; DUTHIE (1995)	31
Figura 8 - Estrutura Química da Quercetina.....	34
Figura 9 – Tipos de nanoestruturas.....	37
Figura 10 - Visão esquemática da nanopartícula lipídica sólida e carreadores lipídicos nanoestruturados	39
Figura 11: Mecanismo de permeação dos CLN.....	40
Figura 12 - Preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturado.....	44
Figura 13 - Distribuição de tamanho por intensidade dos carreadores (n=3)....	50
Figura 14- Distribuição do Potencial Zeta dos carreadores (n=3).....	51
Figura 15- Curva de calibração da QCT.....	53
Figura 16- Avaliação do CLN-QCT, QCT, CLN-B, DMSO 0,5% sobre a viabilidade celular de linhagem de fibroblasto L929 após 24h de tratamento	58
Figura 17- Avaliação do CLN-QCT, QCT, CLN-B, DMSO 0,5% sobre a viabilidade celular de linhagem de queratinócitos HaCat após 24h de tratamento	59
Figura 18 – Fotos obtidas a partir do ensaio cometa. Com exceção do controle negativo, os demais grupos foram expostos a radiação e receberam pré-tratamento. A: controle negativo. B: Controle positivo. C: grupo CLN-QCT. D: Grupo QCT. E: CLN-B. F: DMSO 0,1%.....	60
Figura 19 - Ensaio cometa realizado com as células L929.....	62

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos CLN em relação ao DHm e IP ...	49
Tabela 2 - Caracterização físico-química dos CLN em relação ao PZ.....	51
Tabela 3: Composição da <i>Passiflora incarnata</i>	52
Tabela 4 - Avaliação preliminar da estabilidade dos CLN-B armazenados à temperatura ambiente e à 4°C.....	54
Tabela 5 - Avaliação preliminar da estabilidade dos CLN-QCT armazenados à temperatura ambiente e à 4°C.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Fator de transcrição AP-1
CC	Citosina-citosina
COX-2	Ciclooxigenase-2
Cu^{2+}	Íon cobre
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
CLN-QCT	Carreador Lipídico Nanoestruturado com quercetina
CT	Citosina-timina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DHm	Diâmetro hidrodinâmico médio
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Edético
EE	Eficiência de Encapsulação
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
Fe^{2+}	Íon ferro
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
I κ B	Proteína inibitória kappa-B
ID	Índice de dano
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo

IL	Interleucina
IP	Índice de polidispersividade
JNK	Quinase c-jun n-terminal
$LO \cdot$	Radical alcoxila
LOO	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MAP	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MMP-1	Colagenase-1 ou colagenase intersticial
MMP-3	Estromelisina-1
MMP-9	Gelatinase-B
MPO	Enzima mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-kB	Fator nuclear kappa-B
NLS	Nanopartícula Lipídica Sólida
$O_2^- \cdot$	Ânion superóxido
O_2	Oxigênio molecular
1O_2	Oxigênio singlete
$\cdot OH$	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PZ	Potencial Zeta
p 38	Proteína quinase 38
QCT	Quercetina

RNA _m	RNA mensageiro
RUV	Radiação Ultravioleta
SOD	Superóxido dismutase
SSB	<i>Single strand breaks</i>
TT	Timina-timina
TNF- α	Fator de necrose tumoral
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UVA	Radiação Ultravioleta A
UVB	Radiação Ultravioleta B
UVC	Radiação Ultravioleta C
°C	Graus Celsius
G	Força Centrífuga Relativa
mV	Milivolts
nm	Nanometros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ESPECTRO SOLAR.....	18
2.1.1 Danos ocasionados pela Radiação Solar	19
2.1.1.1 <i>Impactos biológicos das ERO</i>	19
2.1.1.2 <i>Danos ao DNA</i>	23
2.2 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS	26
2.2.1 Ensaio Cometa	28
2.3 QUIMIOPREVENÇÃO.....	31
2.4 QUERCETINA	33
2.5 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN).....	36
3. OBJETIVO	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 REAGENTES E MATERIAIS	43
4.2 DESENVOLVIMENTO E CARATERIZAÇÃO DOS CLN.....	43
4.2.1 Desenvolvimento dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturado ...	43
4.2.2 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm) e do índice de polidispersividade (IP) dos CLN	44
4.2.3 Determinação do Potencial Zeta (PZ)	45
4.2.4 Determinação da eficiência de encapsulação	45
4.2.5 Estabilidade preliminar dos CLN	46
4.2.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT	46
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DA FORMULAÇÃO	47
4.3.1 Ensaio Cometa	47
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 DESENVOLVIMENTO E CARATERIZAÇÃO DOS CLN.....	48
5.1.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), e do índice de polidispersividade (IP) dos CLN	48
5.1.2 Determinação do Potencial Zeta (PZ)	50
5.1.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação	53
5.1.4 Estabilidade preliminar dos CLN	54
5.1.5 Ensaio de viabilidade celular por MTT	57
5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DA FORMULAÇÃO	59
5.2.1 Teste Cometa	59
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta (RUV) proveniente da luz solar compreende a radiação UVA, abrangendo os comprimentos de 320-400nm; UVB, de 290-320nm; e UVC de 100-290nm (SUN *et al.*, 2020; GOUVÊA *et al.*, 2014). A radiação UVA corresponde a 95% da RUV que atinge a superfície terrestre, sendo a grande responsável pelo fotoenvelhecimento, especialmente pela sua capacidade de penetração na pele. Os danos envolvidos pela radiação UVA estão relacionados a danos indiretos a molécula de DNA, devido a geração de radicais livres através de espécies reativas de oxigênio (ERO) e também devido a alteração da atividade de células apresentadores de antígenos da epiderme (GUERRA; CRANE, 2020).

A radiação UVB é a principal responsável pelo desenvolvimento de câncer de pele. A exposição à essa radiação causa aberrações em várias vias bioquímicas e moleculares (PRASAD *et al.*, 2020). Isso se deve à geração de danos diretos ao DNA com a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina e fotoprodutos de pirimidina. Já a radiação UVC é completamente absorvida pela camada de ozônio, e, portanto, sua incidência é baixa (GUERRA; CRANE, 2020). Dessa forma, a radiação solar é considerada um potencial agente genotóxico, podendo levar a danos ao DNA através de múltiplos mecanismos. Nesse ponto, é importante destacar a formação de ERO que geram danos ao DNA (SUN *et al.*, 2020; SUOZZI; TURBAN; GIRARDI, 2020)

A fotoproteção é a estratégia mais usual para prevenção dos efeitos deletérios da RUV. No entanto, os cosméticos fotoprotetores podem não ser completamente efetivos contra os danos ao DNA, especialmente em relação às ERO. Dessa forma, substâncias com atividade antioxidante representam importante complemento (LIM; ARELLANO-MENDOZA; STENGEL, 2017). Neste cenário, destacam-se os insumos farmacêuticos ativos (IFAs) derivados de produtos naturais (SAEWAN; JIMTAISONG, 2015; STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014; SILVA *et al.*, 2020; KUMAR; JOSE, 2020; KARAPETSAS *et al.*, 2020). Alguns IFAs possuem ação antioxidante, além de atuarem em vias proliferativas e apoptóticas (UMEZAWA *et al.*, 2019; LISKOVA *et al.*, 2020)

Dentre as substâncias de origem natural, a quercetina desponta como um IFA com relevante ação quimiopreventiva (KASHYAP *et al.*, 2019). No entanto, a baixa solubilidade em água, meia-vida reduzida, instabilidade química e baixa

biodisponibilidade dificultam sua utilização. Além disso, a permeabilidade da quercetina através da pele é reduzida, o que dificulta sua aplicação tópica (PALLIYAGE *et al.*, 2019). Acredita-se que o uso da nanotecnologia pode ser um grande aliado, especialmente através do uso de nanocarreadores com boa penetração tópica, como os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Os CLN proporcionam melhores níveis de permeação cutânea e controle da liberação da substância ativa, além de apresentarem maior estabilidade quando em comparação a outros carreadores nanoestruturados (TEKADE *et al.*, 2017; GHANBARZADEH *et al.*, 2015; GARCÊS *et al.*, 2018).

Pelo exposto e considerando a inexistência de estudos semelhantes na literatura, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados visando a encapsulação de quercetina com intuito de utilização na quimioprevenção, especificamente contra os efeitos danosos da radiação UVA.

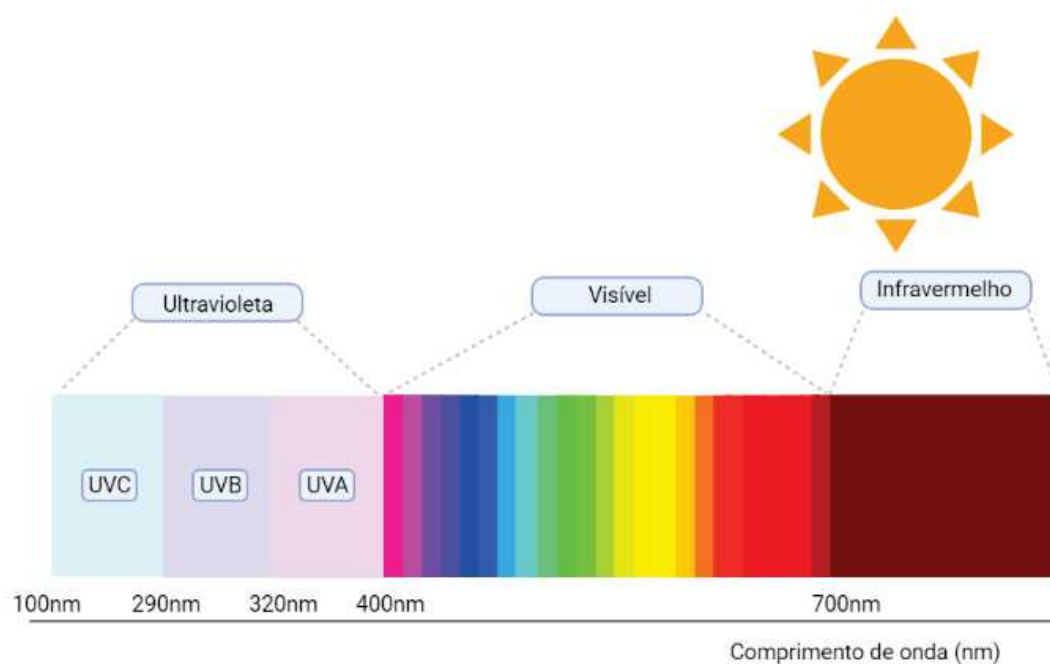
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPECTRO SOLAR

A luz solar é formada por uma ampla gama de radiações eletromagnéticas, incluindo a luz infravermelha, a luz visível e a luz ultravioleta (Figura 1). O espectro eletromagnético solar é formado por comprimentos de onda de 100 a 400nm. Os comprimentos mais longos atingem a superfície da Terra, sendo compreendidos pela radiação UVA na faixa de 320-400nm. Essa radiação representa cerca de 95% da radiação que atinge a superfície terrestre (SONDENHEIMER; KRUTMANN, 2019; HEDAYAT *et al.*, 2020)

Já a radiação UVB representa os outros 5%, através dos comprimentos de onda de 290 a 320nm, os quais apresentam maior energia. Sua distribuição é variável devido a absorção pela camada de ozônio. Por outro lado, a radiação UVC abrange os espectros menores que 290 nm, sendo absorvida pela camada de ozônio e, com isso, não atinge a superfície terrestre (MOSHAMMER; SIMIÇ; HALUZA, 2016; HEDAYAT *et al.*, 2020).

Figura 1- Espectro eletromagnético solar



Fonte: Adaptado de GOETZKE, 2019.

2.1.1 Danos ocasionados pela Radiação Solar

O comprimento de onda da radiação e a energia contida num fóton de radiação são inversamente proporcionais. Dessa forma, quanto menor o comprimento de onda, maior será a energia da radiação solar e menor a penetração na pele. Nesse sentido, a radiação UVA, devido ao seu poder de penetração, atua sobre os vasos da derme, provocando vasodilatação e eritema gradual. Além disso, esse espectro também está associado a pigmentação imediata e tardia, envelhecimento precoce e carcinogênese (HEDAYAT *et al.*, 2020). Já a radiação UVB, apesar de possuir menor penetração nas camadas da pele, pode causar lesões às células epiteliais, levando a produção de substâncias vasodilatadores, como as prostaglandinas. Além disso, essa radiação pode causar eritema, pigmentação tardia e espessamento da epiderme. A radiação UVB também atua no metabolismo epidérmico da vitamina D (HAWK, 2020).

A incidência da radiação ultravioleta aumentou nas últimas décadas, especialmente devido a depleção da camada de ozônio causada por poluentes atmosféricos, como clorofluorcarbonetos, clorocarbonetos e organobrometos. A biomassa ou a queima de combustível com a geração de espécies reativas de nitrogênio também causam desgaste da camada de ozônio (RICHA; SINHA; HADER, 2014; SCHUCH *et al.*, 2013).

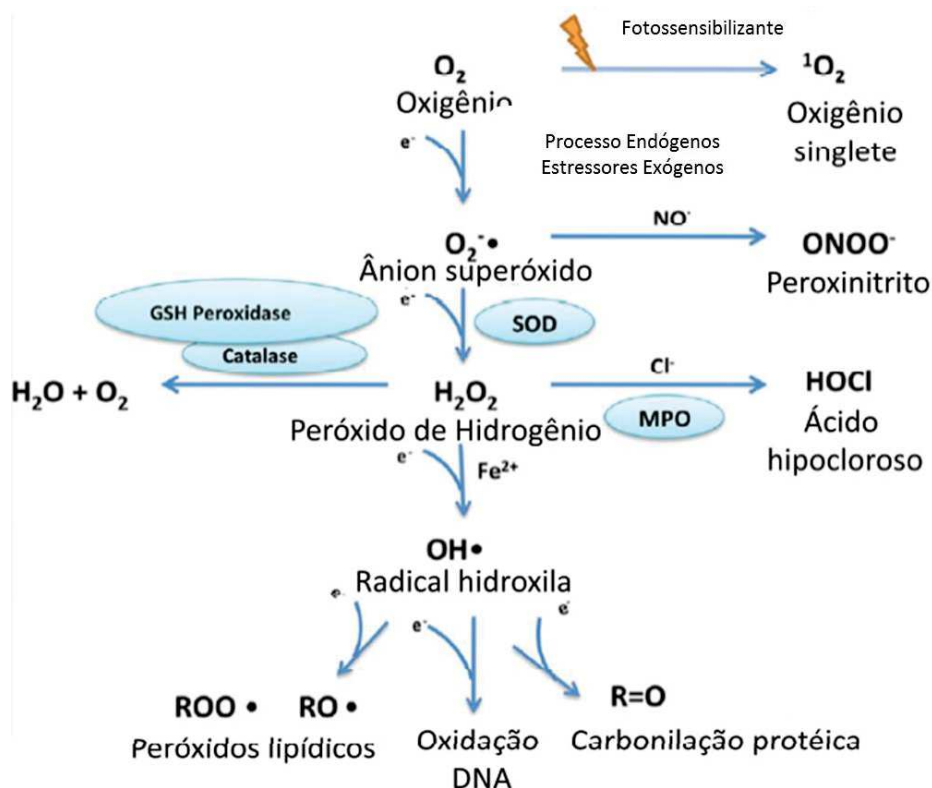
2.1.1.1 Impactos biológicos das ERO

A RUV é um dos grandes agentes indutores da produção de ERO, especialmente a radiação UVA. Essas espécies reativas são caracterizadas por possuírem grande potencial destrutivo. Um resumo das reações em cadeia que levam a geração de ERO é apresentado na Figura 2. Inicialmente, o oxigênio molecular (O_2) recebe um elétron ou há a transferência de energia, ocasionando um aumento de sua reatividade. Com isso, O_2 é convertido respectivamente em ânion superóxido ($O_2^- \cdot$) ou em singlete de oxigênio (1O_2). Devido a sua grande instabilidade, o ânion superóxido pode dar origem a alguns produtos tóxicos ou muito reativos como o peroxinitrito. Além disso, ele pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espontaneamente ou através da enzima superóxido dismutase (SOD) (PETRUCK *et al.*, 2018; JAKUBCZYK *et al.*, 2020).

O H_2O_2 pode ser eliminado com a ação da glutathiona peroxidase presente no citosol, na mitocôndria ou no meio extracelular. Nessa reação ocorre a conversão do H_2O_2 em água. Além disso, os hidroperóxidos lipídicos provenientes das membranas são transformados em álcoois estáveis. Outra via de neutralização do H_2O_2 é através de sua conversão em ácido hipocloroso (HClO) por meio da enzima mieloperoxidase (MPO) presente nos lisossomos dos neutrófilos (CADET; WAGNER, 2013).

Apesar de sua maior estabilidade ao ser comparado ao ânion superóxido, o H_2O_2 em presença de íon ferro (Fe^{2+}) ou cobre (Cu^{2+}) pode ser convertido em radical hidroxila ($\cdot OH$), pela reação de Fenton, ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + \text{íon hidroxil}$) (PISOSCHI; POP, 2015). O radical hidroxila formado apresenta elevada instabilidade, podendo reagir com várias biomoléculas capazes de ceder elétrons, como DNA, proteínas, enzimas e aminoácidos. Ao reagir com fosfolípidos de membrana, há a formação de radicais alcóxila ($LO\cdot$), radicais peróxila (LOO) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH), que são precursores da peroxidação lipídica (PISOSCHI; POP, 2015; CHEN; HU; WANG, 2012)

Figura 2 - Geração de Espécies Reativas de Oxigênio



Fonte: Adaptado de CHEN; HU; WANG, 2012

Nesse contexto, a exposição à RUV pode levar à superprodução de ERO, os quais podem ocasionar a geração de reações em cadeia de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é o processo em que as ERO reagem com os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares, gerando a desorganização da membrana celular e a liberação de fosfolípidios de membrana (SCHUCH *et al.*, 2013). Com isso, a RUV causa um aumento das atividades da fosfolipase A2 e também da ciclooxigenase-2 (COX-2) e consequentemente há maior produção de prostaglandinas, especialmente a prostaglandina E2, responsável pela indução de inflamação na pele (SHIN *et al.*, 2019; OCA *et al.*, 2017).

A exposição à RUV também estimula a produção e liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) em queratinócitos para a corrente sanguínea. A ativação da TNF- α ocorre através da participação da interleucina (IL) -1 juntamente de ERO. A ativação dessas citocinas, estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12. Essas citocinas formadas impulsionam a produção de ERO, elevando o estresse oxidativo. Caso esse sistema não seja interrompido, pode ocasionar a fotocarcinogênese. As citocinas formadas podem também atuar através da estimulação dos níveis do fator nuclear - kappa B (NF-kB) ou por meio da estimulação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase) (SHIN *et al.*, 2019; PACHOLCZYK; CZERNICKI; FERENC, 2016)

Dessa forma, a RUV ativa também o NF-kB, presente na regulação de diferentes genes e atuante na produção de substâncias pró-inflamatórias. Normalmente, o complexo NF-kB está inativo ligado à proteína inibitória kappa B (I κ B). A exposição a RUV, faz com que haja a liberação de mediadores inflamatórios IL-1 e TNF- α , que promovem a degradação do complexo NF-kB/I κ B. Após liberado, o NF-kB chega ao núcleo e ativa os genes envolvidos na produção de substâncias pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α), além da ativação e produção de metaloproteinases (NAKAJIMA; KITAMURA, 2013)

As citocinas formadas podem também atuar através da estimulação dos níveis do fator nuclear - kappa B (NF-kB) ou por meio da estimulação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinase). As MAP quinases são serina/treonina quinases que atuam na regulação de diversas vias celulares, como a proliferação, diferenciação, adaptação ao estresse e apoptose. Três MAP quinases podem ser destacadas: a quinase c-jun n-terminal (JNK), quinase p 38 e a proteína quinase regulada através de sinais extracelulares (ERK) (HOTAMISLIGIL; DAVIS, 2018).

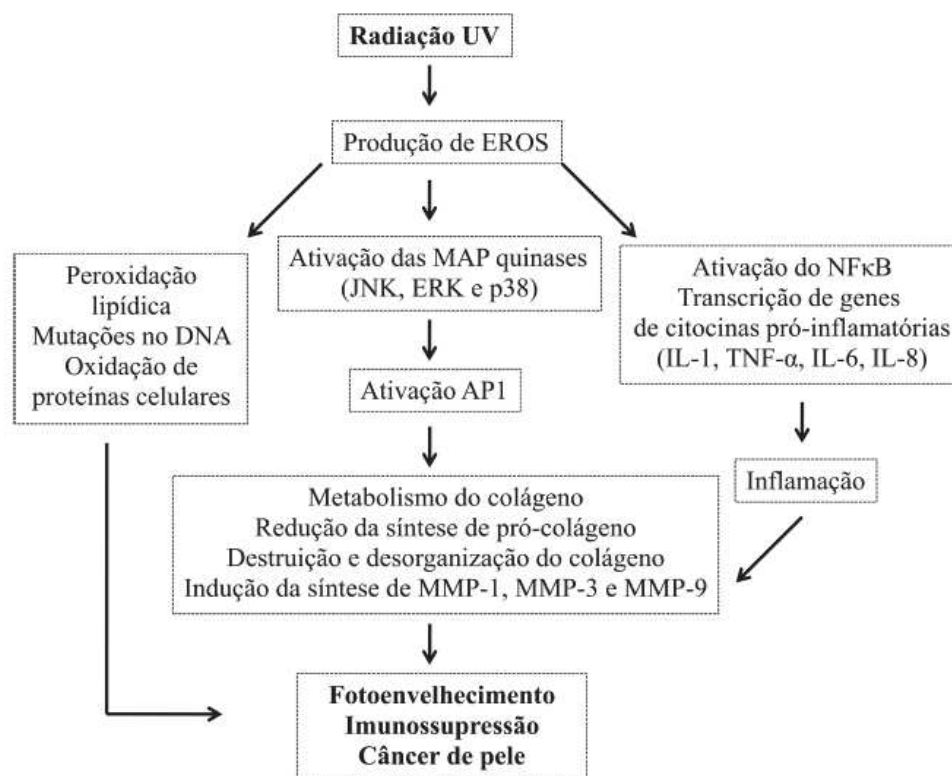
As MAP quinases exercem fundamental importância no processo de ativação e controle da expressão gênica, atuando como mediadores na transdução do sinal da superfície celular ao núcleo. A ERK atua na promoção de tumores, especialmente estimulados pelo estado oxidativo, estimulando a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Já a JNK e p38 são ativadas através de citocinas inflamatórias, exposição a RUV, choque térmico e outros agentes danosos ao DNA. A sua fosforilação tem importante papel na diferenciação celular e resposta inflamatória (BORISOVA *et al.*, 2018; HOTAMISLIGIL; DAVIS, 2018).

A ativação das MAP quinases leva ao aumento da expressão do fator de transcrição c-Jun na pele humana e também do fator de transcrição c-Fos que formam o complexo AP-1. Esse fator de transcrição é altamente ativo e induz a expressão de diversos genes, principalmente vários membros da família das metaloproteinases. AP-1 estimula a expressão de metaloproteinases em queratinócitos e fibroblastos (KWON *et al.*, 2019).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são endopeptidases que degradam estruturas proteicas como colágeno, elastina e outras proteínas da matriz extracelular. A RUV estimula os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), de proteína e a atividade enzimática de pelo menos três MMPs: a MMP-1 (colagenase 1 ou colagenase intersticial) que degrada a estrutura das fibras de colágeno tipo I e III, a MMP-3 (estromelina-1) que rompe a organização do colágeno tipo IV, e MMP-9 (gelatinase-B) que finaliza a degradação de fragmentos de colágeno gerador pela MMP-1. A atuação conjunta dessas MMPs causa a degradação das proteínas estruturais presentes no tecido conectivo dérmico, sendo considerada um marcador importante ao fotoenvelhecimento induzido por RUV (SHIN *et al.*, 2019; KIM 2016; KWON *et al.*, 2019).

Além disso, a interação da radiação ionizante e ERO induzida pela radiação UVA pode ocasionar dano oxidativo e cruzamento intra e inter cadeia de DNA. A exposição à radiação RUV pode levar a quebra da fita dupla de DNA (SSB - *single strand breaks*), sendo considerada uma das lesões mais prejudiciais ao material genético que pode ocasionar a perda de fragmento cromossômico, ocasionando a instabilidade do genoma. (ROY, 2017). O esquema a seguir (Figura 3) mostra os efeitos descritos após a exposição a RUV.

Figura 3 - Esquema simplificado das alterações bioquímicas e vias de sinalização envolvidas na pele após a exposição à radiação UV



Fonte: SOUZA; FONSECA, 2015

2.1.1.2 Danos ao DNA

A estabilidade e integridade da informação genética é de extrema importância para a manutenção da vida. Com isso, a compressão da molécula de DNA é fundamental. O DNA é formado a partir de nucleotídeos capazes de ligarem entre si. Cada nucleotídeo é constituído por uma molécula de desoxirribose, um grupamento fosfato e uma das quatro possíveis bases nitrogenadas, sendo elas: adenina, citosina, timina e guanina. A união dos nucleotídeos é feita através de ligação fosfodiéster, possibilitando a formação de uma fita simples de DNA. Além disso, os nucleotídeos também possuem a capacidade de complementariedade através de pontes de hidrogênio. Com isso, ocorre a união de fitas complementares. Dessa forma, as forças envolvidas nas pontes de hidrogênio e nas ligações fosfodiéster, permitem a molécula de DNA de dupla fita a característica tridimensional de dupla-hélice. A depender da fase do ciclo celular em que a célula se apresenta, a molécula de DNA pode estar altamente compactada, sendo denominada de

cromossomos, ou no menor nível de compactação, sendo denominada de cromatina (GHANNAM; WANG; ARIFF, 2020)

No entanto, alguns agentes genotóxicos podem causar alteração em sua estrutura, levando a danos ao material genético e, conseqüentemente, impedindo o desenvolvimento de suas funções (NOHMI, 2018). Dentre os diversos agentes que podem levar à danos no DNA, é possível destacar a radiação solar, que afeta a estabilidade genômica de organismos vivos bem como pode ocasionar a alteração da estrutura de proteínas e outras moléculas biológicas (FUENTES-LEÓN *et al.*, 2020)

A radiação solar pode provocar danos ao DNA, em diversas formas de vida. A radiação UVC é considerada a mais prejudicial a indução de danos ao DNA, tendo máxima absorção pelos ácidos nucleicos, especialmente a 260nm. No entanto, essa radiação é absorvida pela camada de ozônio. Por outro lado, as radiações UVA e UVB, as quais atingem a superfície terrestre, também são consideradas indutoras de danos ao DNA (ROY, 2017).

Existem relatos do aumento das taxas de incidência de carcinoma basocelular, escamoso e melanoma, sendo a RUV o principal fator causal (FELLER *et al.*, 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2018 houve uma taxa de incidência global de 2 a 3 milhões de cânceres de pele de queratinócitos e 132000 cânceres de pele melanoma (EGAMBARAM; PILLAI, 2019)

Nas células expostas a RUV, o DNA atua como um cromóforo, absorvendo os fótons, os quais podem causar lesões em sua estrutura. A exposição à radiação UVB modifica as bases purinas do DNA. O fotoproduto de purina reage com um resíduo de adenina, com posterior fotocicloadição com adenina ou timina, gerando pirimidinas citotóxicas e letais, incluindo dímeros de ciclobutano pirimidina, pirimidina, fotoprodutos de pirimidona e seus isômeros. A formação de ciclobutano pirimidina depende da sequência adjacente, da especificidade da sequência e do comprimento irradiado (RICHA; SINHA; HADER, 2014). Nessa situação, ocorre a ligação errônea entre duas pirimidinas na mesma fita de DNA. Ao invés de ocorrer o pareamento normal adenina-timina ou guanina- citosina, ocorre a ligação entre citosina e timina (CADET *et al.*, 2012).

A radiação UVB é considerada menos potente em relação à oxidação de bases e a quebras de fita de DNA. Já a radiação UVA consegue penetrar nas camadas mais profundas da pele, atingindo a camada basal em que melanócitos e células-tronco estão presentes. Enquanto a radiação UVA age principalmente através de ERO, a radiação UVB danifica diretamente o DNA (CHEN; HU; WANG, 2012; MULLENDERS, 2018).

A energia proveniente da RUV é absorvida pelos cromóforos celulares, dentre eles o DNA, purinas, proteínas, lipídeos, melanina e aminoácidos aromáticos. Essa absorção leva à geração de cromóforos energizados que reagem com o oxigênio molecular, gerando ERO. As ERO podem ser divididas em dois grupos: radicais livres e aqueles que não são radicais livres. De forma geral, um radical livre pode ser definido como uma espécie com um ou mais elétrons não emparelhados. Os radicais livres são representados pelos radicais hidroxila, peroxila e alcoxila e ânion superóxido. As ERO que não são radicais livres são moléculas reativas de oxigênio capazes de iniciar reações oxidativas e gerar espécies de radicais livres (oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, peróxido nitrito, ácido hipocloroso) (CHEN; HU; WANG, 2012; JAGER; COCKRELL; PLESSIS, 2017).

Por outro lado, a pele possui alguns mecanismos endógenos de proteção contra ERO. Esses sistemas podem ser antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase e catalase, ou não enzimáticos, tais como, vitamina C, vitamina E, ubiquinonas, ácido úrico e compostos sulfidrílicos (glutathiona, homocisteína), e ainda os quelantes de metais, podendo ser citados os transportadores de ferro (transferrina, hemoglobina, mioglobina, ferrina e ferredoxinas) e o transportador de cobre (ceruplasmina). Em situações de tensão de oxigênio normal, esses sistemas são eficazes para manter a homeostasia. No entanto, quando há grande geração de ERO como o caso de exposição a RUV, especialmente a radiação UVA, esses mecanismos apresentam limitações, o que torna a pele vulnerável aos ataques das ERO (JAGER; COCKRELL; PLESSIS, 2017). A avaliação desses danos pode ser realizada em laboratório a partir de testes genotóxicos e mutagênicos. Nesse sentido, uma vez que os protetores solares isoladamente podem não ser suficientes na prevenção de danos causados pela RUV, o uso de substâncias com ação quimiopreventiva ganha destaque, incluindo os antioxidantes (PISOSCHI; POP, 2015).

A exposição a RUV acelera o envelhecimento celular além do risco associado ao desenvolvimento de câncer de pele (BIRCH-MACHIN; BOWMAN, 2016). A ação conjunta da radiação UVA e UVB está associada ao desenvolvimento de melanoma cutâneo maligno bem como a danos oxidativos causados pelas ERO ao DNA (PACHOLCZYK; CZERNICKI; FERENC, 2016; JAGER; COCKRELL; PLESSIS, 2017). Assim, o conhecimento da técnica para a avaliação de danos ao material genético se faz necessário (QUINET *et al.*, 2017).

2.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS

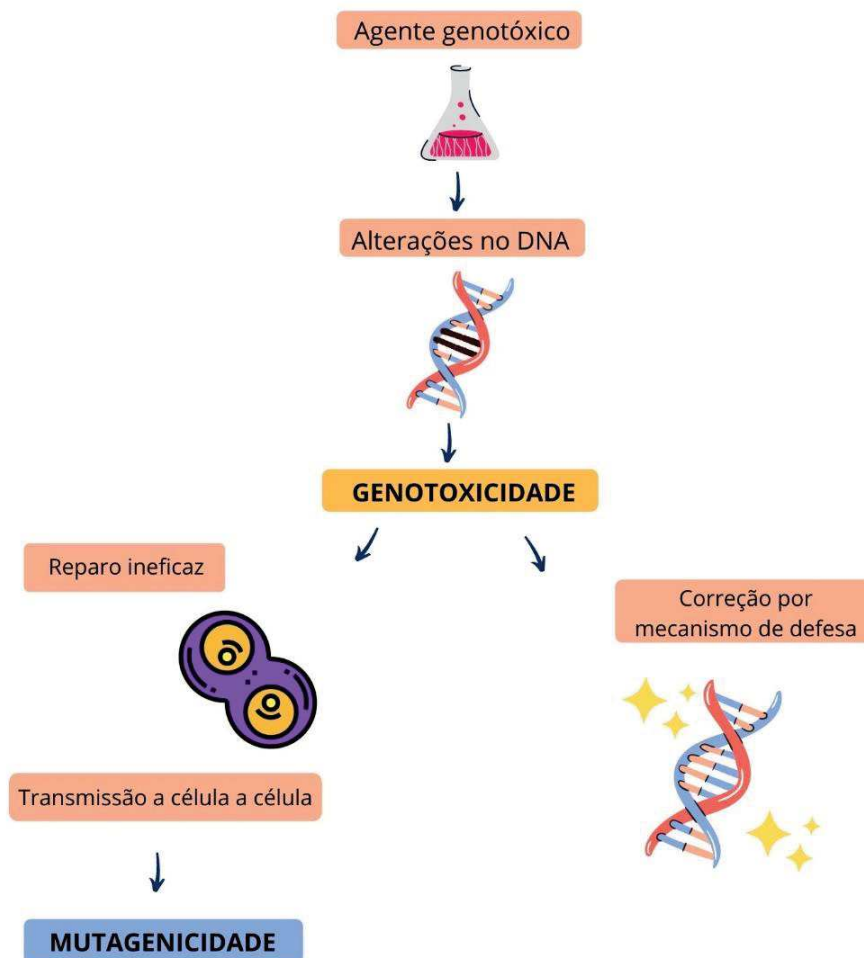
A avaliação do potencial genotóxico e mutagênico é de suma importância para identificar possíveis efeitos danosos causado por drogas terapêuticas, cosméticos, agroquímicos, compostos industriais, aditivos alimentares, toxinas naturais e também de produtos nanoparticulados (LEE *et al.*, 2016).

A genotoxicidade abrange (Figura 4), além da mutagenicidade, a capacidade que um agente possui em produzir efeitos tóxicos no material genético ou no aparato celular que regula o genoma, incluindo o fuso mitótico e topoisomerasas, levando a mudanças na informação e/ou estrutura ou segregação do DNA (MEDLEY *et al.*, 2012). Ao interferir no DNA, um agente genotóxico pode levar a formação de adutos, alteração oxidativa e até rompimento da molécula de DNA (MAHAYE *et al.*, 2017). Os efeitos genotóxicos de uma substância podem ser transitórios e reversíveis, apresentando ou não efeitos adversos (PIBERGER *et al.*, 2018).

A mutagenicidade é definida pela capacidade que um agente possui em induzir modificações permanentes (células somáticas) ou hereditárias (células germinativas) na estrutura gênica da célula que dificilmente serão revertidas (MOORE *et al.*, 2019) como o câncer (QUINET *et al.*, 2017). Embora algumas mutações possam ocorrer espontaneamente, em sua grande maioria é causada por uma agente físico, químico ou biológico, em que podemos destacar a RUV (ROY, 2017; PHILLIPS *et al.*, 2009). Por isso, os agentes quimiopreventivos exercem importante função na prevenção de tais acometimentos (TURKEZ; ARSLAN; OZDEMIR, 2017).

A avaliação da genotoxicidade pode ser realizada através de alguns testes. Dentre eles, podem ser citados os testes de síntese não programada de DNA, de troca de cromátides-irmãs, de quebras de fitas de DNA, de formação de aduto de DNA e de recombinação mitótica (ZHOU; XI, 2018). Eventos mensurados por esses testes não são por eles próprios necessariamente transmitidos célula a célula. Em contrapartida, os eventos provocados pela mutagenicidade correspondem a alterações genéticas que perpetuarão à próxima geração celular (CORTÉS; MARCOS, 2018)

Figura 4 - Alterações genéticas causadas por um agente genotóxico (Genotoxicidade e Mutagenicidade)



Fonte: Autora (2022).

As mutações podem ser classificadas em dois níveis, a mutação gênica (mutação de ponto) e a mutação cromossômica. Esta última é caracterizada por alterações que podem acometer cromossomos inteiros ou grupos de cromossomos. A mutação cromossômica pode ser dividida em estrutural, caracterizada por mudanças na forma ou tamanho do cromossomo, e numérica em que há alterações no número de cromossomos da célula (RUSSO *et al.*, 2015).

Já a mutação gênica é apresentada por alterações que acometem um único ou pouco pares de bases do DNA. Nessa situação, pode ocorrer a substituição de pares de bases, ocasionando a leitura de um aminoácido diferente levando a alteração da proteína a ser produzida. Também pode ocorrer a adição ou deleção de um nucleotídeo, levando

ao deslocamento da leitura dos aminoácidos ocorrendo a produção de outra proteína, uma vez que o RNAm é lido em grupos de três pares de bases, influenciando na sequência de polipeptídios (HUANG *et al.*, 2015).

A compreensão de processos relacionados a reparo e integridade do DNA vem crescendo exponencialmente (RIBEIRO *et al.*, 2017). Os testes de genotoxicidade, podem ser *in vivo* ou *in vitro* e avaliam a função celular, interferência, replicação ou reparo do DNA ao ser exposto a determinado agente químico (SPONCHIADO *et al.*, 2016). Com isso, auxiliam na compreensão de mecanismos de ação dos agentes testados e contribuem para extrapolação de possíveis efeitos na saúde dos seres humanos (EKI, 2018). A exemplo de ensaios genotóxicos, é possível citar o ensaio cometa.

2.2.1 Ensaio Cometa

Diversos ensaios são utilizados para avaliar a genotoxicidade de uma amostra. Dentre eles, o ensaio cometa é um método com significativa sensibilidade para a detecção de danos a fita de DNA (MOLLER, 2018). Esse ensaio apresenta grande empregabilidade na área de toxicologia, biomonitoramento humano e ecogenotoxicologia como ferramenta de auxílio para compreensão de fenômenos de dano e reparo da molécula de DNA (ARALDI *et al.*, 2015; GLEI; SCHNEIDER; SCHLORMANN, 2016).

Dentre as vantagens dessa técnica é possível destacar a análise a nível individual das células, necessidade de um pequeno número de células por amostras, alta sensibilidade para detecção de danos ao DNA e possibilidade de utilização em células eucariotas *in vivo* ou *in vitro*. Assim, destaca-se sua empregabilidade em estudos de quimioprevenção (LANGIE; AZQUETA; COLLINS, 2015).

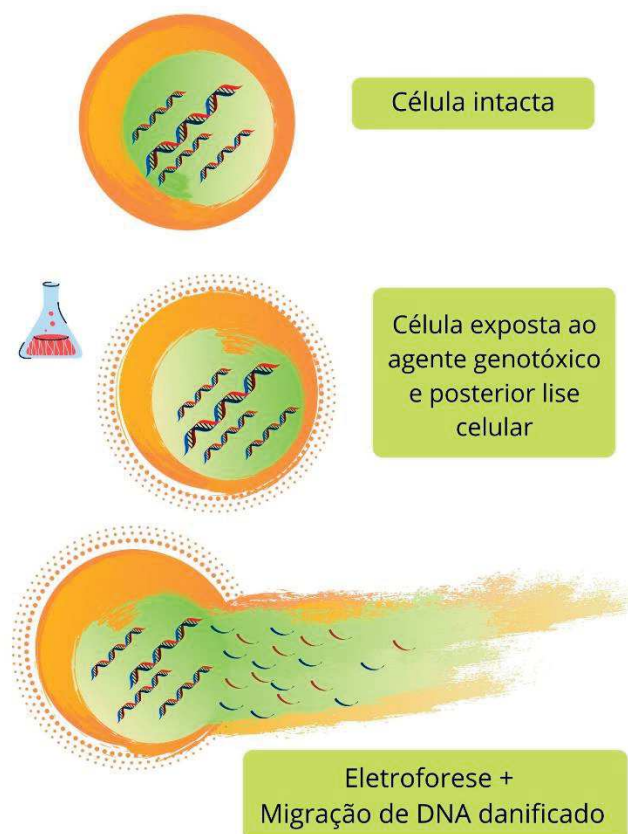
A metodologia do ensaio cometa foi descrita primeiramente por Ostling e Johanson (1984), em que foi realizado quebras ao DNA através de radiação ionizante. Em seguida, foi observado o comportamento do material genético em células individuais que sofreram a ação de um campo elétrico. Dessa forma, esses pesquisadores relataram a possibilidade e a sensibilidade de detecção de danos ao DNA. Posteriormente, essa metodologia sofreu modificações por Singh *et al.* (1988), em que descreveu sua técnica em condições alcalinas. Já o termo cometa foi usado pela primeira vez em 1990 por Olive *et al.* em que mostrou a forma que o DNA possui nos géis de agarose.

Dessa forma, o ensaio cometa, feito em condições alcalinas, é caracterizado pela passagem de corrente elétrica por células inicialmente lisadas e inclusas em gel de agarose

de baixo ponto de fusão sobre uma lâmina de microscopia. O pH alcalino auxilia na remoção das membranas celulares, proteínas histonas, citoplasma e nucleoplasma, e também no rompimento dos nucleossomos. Esse controle do pH, facilita a desnaturação do DNA. Assim, após a lise celular, ocorre a eletroforese alcalina. Em seguida, a etapa de neutralização da estrutura do DNA, sendo então corado com um corante fluorescente (Figura 5) (MØLLER *et al.*, 2020).

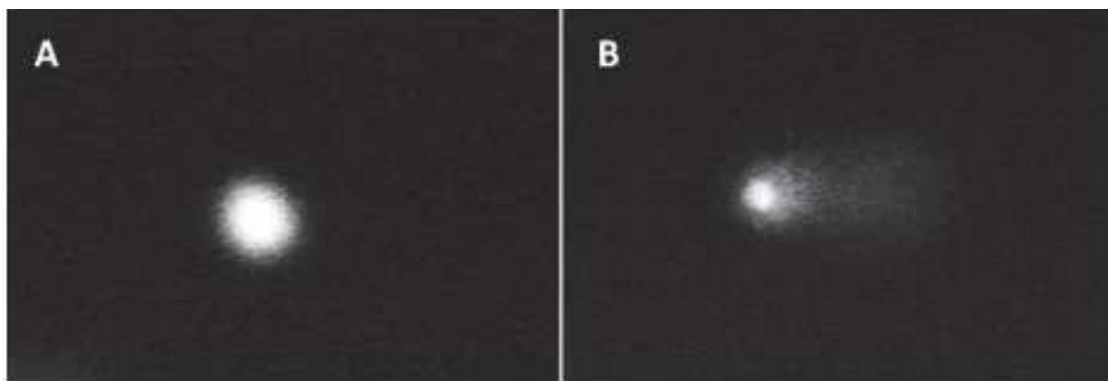
A carga parcial negativa do DNA, faz com que se ele estiver rompido migre para fora do núcleo na presença da carga elétrica. A imagem formada pela movimentação do DNA se assemelha a um cometa. A extensão da cauda apresentada reflete a grandeza do dano ao DNA, aumentando à medida que a cauda aumenta. Por outro lado, o material gênico que não estiver danificado, permanece sem movimentação devido ao seu tamanho, inviabilizando sua migração para fora do núcleo (Figura 6) (BAJPAYEE; KUMAR; DHAWAN, 2019).

Figura 5 – Esquema simplificado com as etapas do ensaio Cometa



Fonte: Autora (2022).

Figura 6 - Exemplo de ensaio cometa



Fonte: PU; WANG; KLAUNIG, 2015.

Esta técnica vem recebendo grande empregabilidade devido a sua capacidade de detecção de lesões pré-mutagênicas (LU; LIU; YANG, 2017). Outra vantagem apresentada, inclusive sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, é que necessita apenas de um certo número de células sem que elas estejam em divisão (SOUZA *et al.*, 2019).

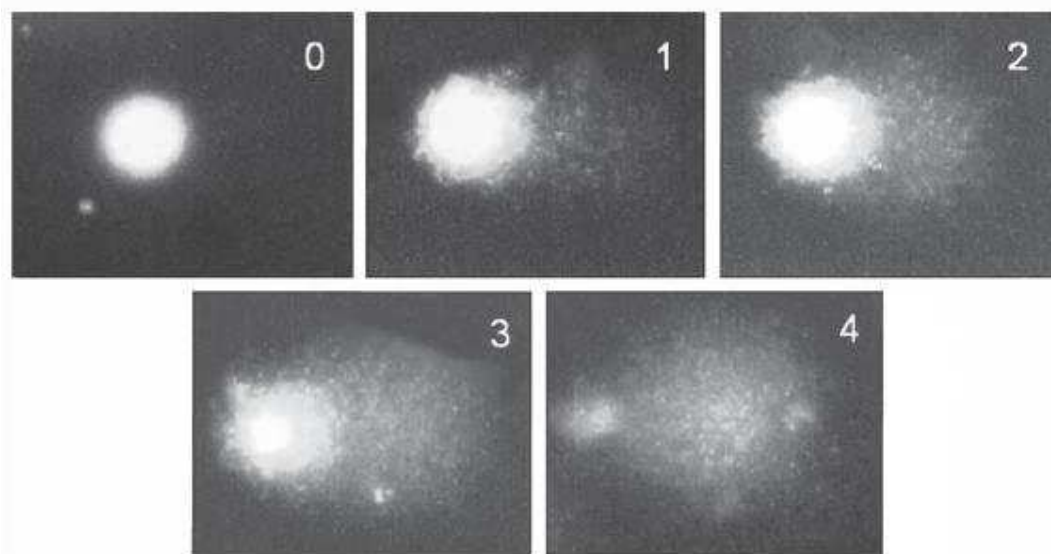
Os danos ao DNA detectados pelo ensaio cometa podem ser quebras simples ou duplas, danos álcali-lábeis, *crosslinks* e reticulação de DNA-DNA / DNA-proteína e locais de reparo de excisão incompletos (PU; WANG; KLAUNIG, 2015). Essa técnica é empregada para observação de lesões genômicas, que uma vez processadas podem dar origem às mutações, caracterizando as chamadas lesões pré-mutagênicas, no entanto, em geral, as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção (AZQUETA *et al.*, 2019).

A análise dos resultados obtidos no teste cometa pode ser realizada através de *softwares* ou manualmente. Para a mensuração automática, existem programas que medem o dano do DNA a partir da fluorescência. A partir disso, são fornecidos dados como o comprimento da cauda e a intensidade da fluorescência entre cabeça e cauda do cometa. No entanto, a maioria dos *softwares* existentes são pagos, e quando disponíveis gratuitamente apresentam diversas limitações (BRAAFLADT; REIPA; ATHA, 2016).

Diante desse contexto a quantificação manual se torna uma opção. Tal metodologia foi desenvolvida e padronizada por Collins e colaboradores (1995). Os cometas são classificados de acordo com o comprimento da sua cauda e recebe um score

que varia de zero a quatro (Figura 7) em que conforme a classificação avança, ocorre o aumento da cauda e desaparecimento da cabeça do cometa. Os cometas de classe 0 correspondem ao DNA não danificado, com núcleo celular e sem cauda. Os cometas de classe 1, 2 e 3 correspondem a cometas com danos mínimos, médios e intensos, respectivamente. Já a classe 4 é reservada aos cometas com danos máximos (VILLALBA-CAMPOS *et al.*, 2016).

Figura 7 - Classificação visual sugerida por COLLINS, MA; DUTHIE (1995)



Fonte: COLLINS, MA; DUTHIE (1995).

Independente do método escolhido para análise, uma coloração adequada é de suma importância. Vários fluorocromos são tradicionalmente utilizados para corar DNA. Para o teste cometa, o brometo de etídio é mais comumente utilizado. Esse corante é um intercalante que apresenta ligação eficiente a fita dupla de DNA. A quantidade de corante ligado é proporcional a quantidade de DNA presente na amostra. Além disso, é válido destacar que concentrações baixas de corante devem ser usadas uma vez que altas concentrações causariam saturação do sistema. Concentrações em torno de 2-20 μ g/mL são suficientes (KUMARAVEL *et al.*, 2009).

2.3 QUIMIOPREVENÇÃO

Diante dos danos que podem ocorrer ao material genético, especialmente quando exposto a RUV, novas estratégias de proteção tornam-se necessárias. A quimioproteção ganha destaque, podendo ser relacionada à quimioprevenção. O termo quimioprevenção

foi criado em 1970 e está associada ao uso de agentes químicos naturais ou sintéticos específicos para reverter, suprimir ou impedir o desenvolvimento da carcinogênese (SUVARNA *et al.*, 2020; WALCZAK; MARINIAK; RAJTAR, 2017).

A carcinogênese é dividida em três fases: a iniciação, promoção e progressão (UZARSKA *et al.*, 2013). Na fase inicial, diversos fatores exógenos ou endógenos podem induzir a um dano irreversível ao DNA. Porém, é necessário promotores tumorais para que ocorra uma alteração maligna. Na próxima etapa, ocorre inúmeras alterações genéticas e epigenéticas na célula. Nesse momento, a célula sofre expansão clonal, tornando-se pré maligna. Em seguida, ocorre a conversão, em que a célula pré-maligna expressa o fenótipo de célula maligna, sendo necessária, modificações genéticas, ocasionando erros na síntese do DNA e/ ou inativação de genes supressores de tumor. Já a progressão tumoral é a fase em que a célula possui características mais agressivas, contando com inúmeras mutações (CHHABRA *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2012)

Nesse sentido, a quimioprevenção pode atuar nessas diferentes fases da carcinogênese (CHHABRA *et al.*, 2017). A quimioprevenção possui três abordagens. A quimioprevenção primária pode ser definida como a não exposição a agentes cancerígenos, atuando no impedimento da fase de iniciação da carcinogênese. A quimioprevenção secundária está relacionada à identificação de lesão pré-malignas e uso de agentes que possam impedir a progressão para o câncer. Já a quimioprevenção terciária abrange medidas associadas para impedir a recorrência da doença ou a manifestação de novos tumores através da administração de agentes quimiopreventivos ou remoção de lesões pré-cancerosas (MEYSKENS *et al.*, 2016).

Os agentes utilizados na quimioprevenção podem atuar por diferentes vias. Existem os chamados agentes bloqueadores, que agem impedindo a interação entre o agente cancerígeno químico ou de radicais livres endógenos ao DNA, consequentemente evitando o desenvolvimento de mutações. Eles agem através dos seguintes mecanismos: eliminação de radicais livres, atividade antioxidante, indução de enzimas metabolizadoras de drogas de fase II, inibição das enzimas metabolizadoras de medicamentos da fase I, indução de reparo de DNA, bloqueio da captação de carcinógenos. Por outro lado, os chamados agentes supressores atuam inibindo a transdução de sinal impedindo a promoção do tumor. Outros mecanismos de quimioprevenção, incluem a indução de apoptose e inibição da angiogênese. Dentre os seus mecanismos, é possível ressaltar: alteração na expressão gênica, inibição da proliferação celular e expansão clonal, indução de diferenciação terminal e senescência, indução de apoptose em lesões pré-neoplásicas

e modulação da transdução de sinal (LANDIS-PIWOWARE; IYER, 2014; STEWARD; BROWN, 2013).

Os agentes quimiopreventivos utilizados incluem hormônios, medicamentos, agentes relacionados à dieta e vacinas. Os agentes hormonais são antiestrogênicos e antiandrogênicos. Na classe de medicamentos estão a aspirina e outros antiinflamatórios, as estatinas e a metformina. Além disso, o primeiro agente quimiopreventivo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) foi o tamoxifeno, revelando efetividade na redução do câncer de mama (CHHABRA *et al.*, 2017). Os agentes relacionados à dieta estão associados ao uso de carotenóides, vitamina A e retinóides, ácido fólico, vitamina C, D e E, cálcio, selênio e os flavonoides. Em relação às vacinas, é possível destacar a vacina contra o vírus da hepatite B e a vacina contra o vírus do papiloma humano (BENETOU; LAGIOU; LAGIOU, 2015)

A quimioprevenção tem se mostrado uma estratégia com grande potencial para prevenção do desenvolvimento de câncer de pele em decorrência da exposição à RUV. Nos últimos anos, os antioxidantes tem ganhado notório destaque como agentes quimiopreventivos. Eles atuam na redução de geração de ERO e do estresse oxidativo ocasionado pela RUV, prevenindo a ocorrência de eventos como fotoenvelhecimento e câncer (PISOSCHI; POP, 2015).

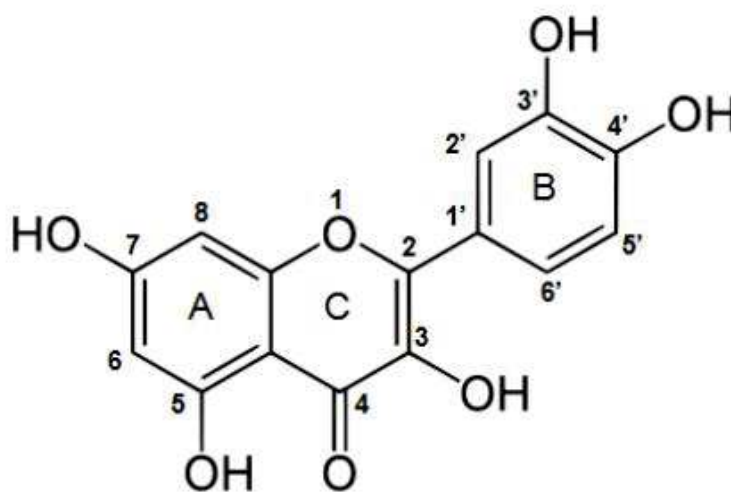
Os agentes quimiopreventivos devem apresentar baixa toxicidade, reduzido potencial para indução de eventos adversos, além de possibilitarem facilidade na administração e adequada relação custo-benefício (UMEZAWA *et al.*, 2019). Diante disso, as substâncias de origem natural merecem destaque (RIZEQ *et al.*, 2020). Essas substâncias, por meio de suas propriedades antioxidantes, desempenham um papel fundamental na quimioprevenção ao câncer de pele por exposição a RUV, suprimindo o dano ao DNA induzido pelo estresse oxidativo. Dessa forma, atuam na proteção das células contra alterações moleculares que podem desencadear a carcinogênese. Além disso, auxiliam na modulação de vias proliferativas e apoptóticas (LISKOVA *et al.*, 2020).

2.4 QUERCETINA

Dentre as substâncias de origem vegetal com potencial quimiopreventivo, a quercetina (QCT) (Figura 8) vem sendo amplamente investigada. Esse flavonóide polifenólico é proveniente de fontes alimentares como frutos, raízes e é encontrada em

folhas de vegetais. Dentre os flavonoides, a quercetina é classificada como flavonol, considerada análoga da flavona com um grupo 3-hidroxílico. Esse flavonóide de baixa solubilidade aquosa é composto por cinco grupos hidroxila na estrutura C6-C3-C6 e possui um grupo 3-OH no anel da pirona (KASHYAP *et al.*, 2019; IZZO; NAPONELLI; BETTUZZI, 2020).

Figura 8 - Estrutura Química da Quercetina



Fonte: ANDREA, 2015

A QCT possui propriedades antioxidante, antihipertensiva, antiarrítmica, antialérgica, antineoplásica, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e analgésica (XU *et al.*, 2019; FERENCZYOVA; KALOCAYOVA; BARTEKOVA, 2020; BARTEKOVA *et al.*, 2016; ESCRIBANO-FERRER *et al.*, 2019; RAUF *et al.*, 2018; GURAN *et al.*, 2019; VAIDYA *et al.*, 2016; HOU *et al.*, 2019; CARULLO *et al.*, 2017). Além disso, esse flavonoide tem grande potencial de redução de vários tumores através da inibição do ciclo celular, de vias de sinalização, regulação de fatores de crescimento e indução de apoptose (SRIVASTAVA *et al.*, 2016; SUNDARAM *et al.*, 2019).

A QCT protege as células eliminando os radicais livres e aumenta os níveis de antioxidantes endógenos. Além disso, proporciona o fortalecimento da membrana celular e mitocondrial contra danos induzidos pelas ERO. Com isso, atua inibindo o estresse oxidativo, regulando o equilíbrio entre os efeitos oxidantes e antioxidantes (XU *et al.*, 2019). A capacidade antioxidante da QCT se deve a presença do grupo catecol no anel B e o grupo OH na posição 3 do anel B. Além disso, aumenta os níveis de glutathiona

auxiliando na prevenção da formação de radicais livres. Ao diminuir as ERO, a QCT pode diminuir a inflamação (ANDREA, 2015).

Alguns componentes estruturais exercem grande importância na ação da QCT, como a presença do grupo catecol no anel que possibilita a formação de radicais fenoxil mais estáveis após a doação do átomo de hidrogênio. A presença da dupla ligação entre os C2-C3 em conjugação com o grupo 4-carbonil presente no anel C, que proporciona o deslocamento de um elétron do radical fenoxil no anel B para o anel C. Outro grupamento importante é a presença do grupo 3 OH em combinação com a dupla ligação entre os C2-C3, possibilitando maior estabilização por ressonância dos elétrons deslocados sobre a molécula (SIQUEIRA, 2013).

A QCT também exerce efeitos sobre as vias de transdução de sinal, podendo melhorar o estado antioxidante e reparar lesões, e atuar no sistema de defesa antioxidante mediado por enzimas. Nessa situação, exerce efeito inibitório contra a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase, que são enzimas associadas a processos oxidativos. Além disso, atua sobre o sistema de defesa antioxidante não dependente de enzimas (XU *et al.*, 2019).

Sua atividade antiinflamatória pode estar ligada ao efeito inibitório contra a formação de leucotrienos; expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, além do bloqueio da produção de óxido nítrico por macrófagos. Esse efeito pode ser resultado de sua ação sobre as vias de tirosina quinase e das MAP quinases. Além disso, investigações recentes sugerem que a QCT é capaz de inibir o fator de transcrição NF- κ B, envolvido na ativação de substâncias pró-inflamatórias (KASHYAP *et al.*, 2019)

A QCT atua induzindo a parada de G2- M no ciclo celular em células cancerígenas, ocasionando um acúmulo de células em G0. Por outro lado, também exerce influência na apoptose, aumentando a transcrição dos receptores e ligantes da morte da via extrínseca da apoptose (SUNDARAM *et al.*, 2019).

A QCT é um fitoquímico com potencial quimiopreventivo em diversos tipos de câncer, incluindo melanoma, mama, pulmão, nasofaringe, rim, colorretal, próstata, pancreático e câncer de ovário (STURZA *et al.*, 2018; SHAFABAKHSH; ASEMI, 2019; KASIRI *et al.*, 2020; XINGYT *et al.*, 2016; DAKER *et al.*, 2013; SANCHEZ-GONZALEZ *et al.*, 2017; DARBAND *et al.*, 2018; WARD *et al.*, 2018; PANG *et al.*, 2019)

Estudos realizados por Kim *et al.* (2019) revelaram o potencial anticâncer associado a QCT, em que houve uma redução significativa da viabilidade e proliferação de células de melanoma humano (A375SM). A QCT suprimiu a viabilidade celular

induzindo a apoptose. Além de possuir efeito na diminuição significativa do tumor em comparação com grupo controle. Esse estudo revela alguns mecanismos quimiopreventivos da QCT. Como relatado por Rafiq *et al.* (2015), em que as células de melanoma B16F10 foram previamente tratadas com quercetina e em seguida, expostas a radiação UVB e houve uma redução da viabilidade celular e aumento da apoptose. Além disso, efeitos pró-apotóticos da quercetina nas células cancerígenas foram observadas como elevação da formação de espécies reativas de oxigênio intracelular.

Dessa forma, a QCT tem sido amplamente explorada como agente quimiopreventivo frente à RUV (BAGDE *et al.*, 2019; SAPINO *et al.*, 2015). No entanto, a baixa solubilidade em água, meia-vida reduzida, instabilidade química e baixa biodisponibilidade dificultam sua utilização. Além disso, a permeabilidade da quercetina através da pele é reduzida o que dificulta sua aplicação tópica (PALLIYAGE *et al.*, 2019). Dessa forma, é necessário o uso de novas tecnologia para superar essas limitações, como o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (VINAYAK; MAURYA, 2019)

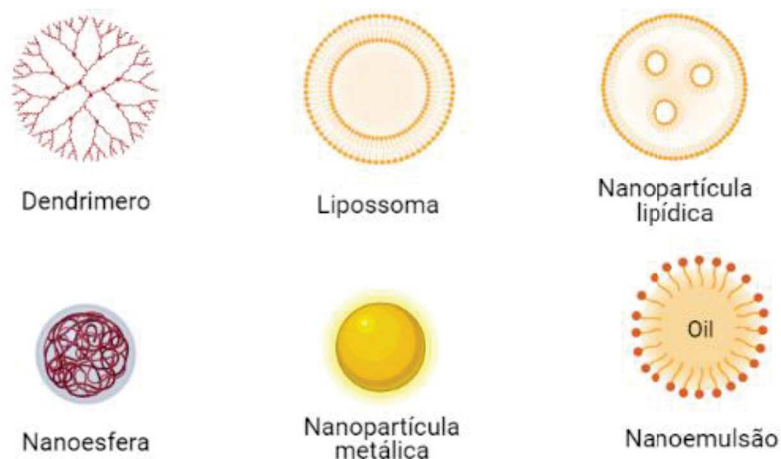
2.5 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLN)

A nanotecnologia consiste no estudo e aplicação de materiais na escala nanométrica. Essa tecnologia permite uma série de benefícios com propriedades únicas e desejáveis, promovendo impactos inovadores com sua aplicação aos cuidados com a saúde (FOULKES *et al.*, 2020). As nanoestruturas conseguem otimizar propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas indesejáveis dos IFA's, como por exemplo, o incremento da permeação de substâncias. Além disso, devido a maior efetividade das nanopartículas (NP), seu uso possibilita a redução da concentração do IFA, minimizando os efeitos colaterais (JOSE; NETTO, 2019). Além disso, certas NP possuem baixa citotoxicidade intrínseca, protegem contra a degradação de IFA's instáveis e proporcionam a liberação controlada do ativo encapsulado (PUGLIA; SANTONOCITO, 2019)

Existem diversos tipos de sistemas nanoestruturados como os lipossomas, micelas, ciclodextrina, nanopartículas inorgânicas, dendrimeros, nanopartículas poliméricas, além das nanopartículas lipídicas (Figura 9) (AZIZ *et al.*, 2019). As nanopartículas vêm sendo amplamente estudadas como estratégia quimiopreventiva contra os efeitos danosos da radiação e também contra o câncer de pele. Nesse contexto, os CLN recebem destaque. (SIDDIQUI *et al.*, 2014; ABO AASY *et al.*, 2019; BOAKYE

et al., 2016; NIRMALA; NARENDHIRAKANNAN, 2017; GARCÊS *et al.*, 2018; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

Figura 9 – Tipos de nanoestruturas



Fonte: Autora (2022).

As nanopartículas lipídicas tiveram seu primeiro grupo formado pelas nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). As NLS são compostas por um núcleo lipídico sólido, tais como triglicerídeos (triestearina), ácidos graxos (ácido esteárico), esteroides (colesterol) ou ceras (cetilpalmitato), dentre outros, os quais são estabilizados em meio aquoso por tensoativos (lecitina, polissorbato, Poloxamer[®]) (NAQVI; PANGHAL; FLORA, 2020). Seu núcleo lipofílico pode ser constituído por lipídios fisiologicamente tolerados, não causando irritabilidade e efeitos tóxicos (AFRA *et al.*, 2020). No entanto, esse sistema apresenta algumas limitações como a baixa capacidade de carregamento de drogas devido sua composição exclusiva de lipídios sólidos faz com que o rearranjo interno da matriz seja uma rede cristalina, ocasionando a expulsão do fármaco (ELMOWAFY; AL-SANEA, 2021). Além disso, há a maior possibilidade de gelificação imprevista, transições polimórficas e liberação do IFA durante o armazenamento (CHAUHAN *et al.*, 2020).

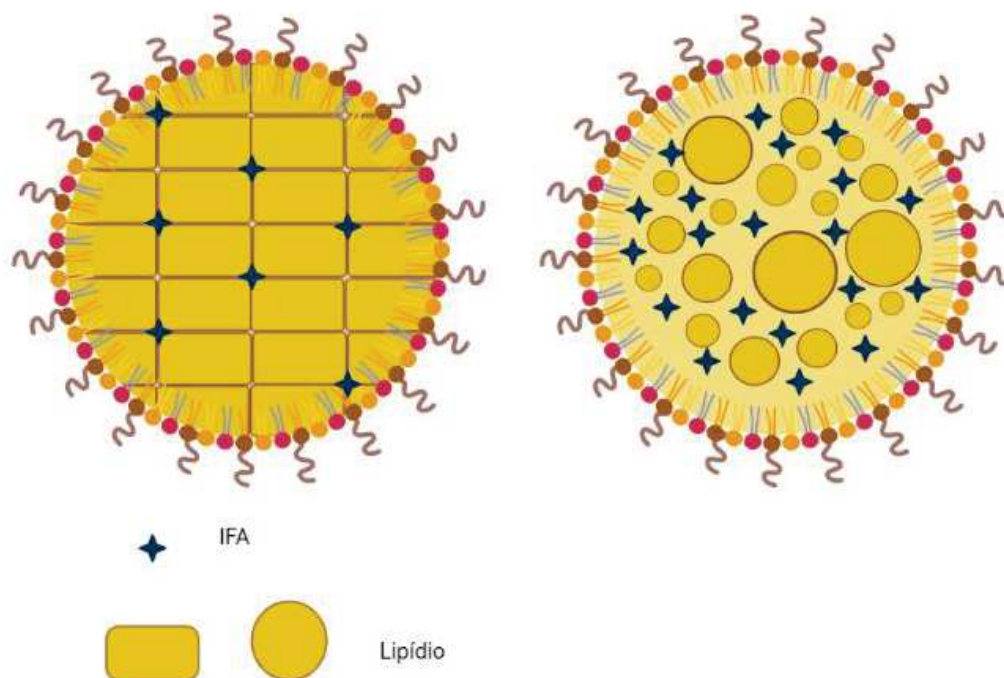
Diante das limitações das NLS, os CLN foram desenvolvidos como a segunda geração de nanopartículas lipídicas. Esses carreadores se diferenciam pela presença de lipídios líquidos em seu núcleo lipídico sólido (figura 10) (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014). Os lipídios líquidos mais comuns utilizados na produção dos CLN são

trioleína, miglyol, ácido oleico, óleo de gergelim, óleo de Copaíba, e óleo de amêndoa doce (YU *et al.*, 2021). Com isso, os CLN podem ser definidos como dispersões aquosas constituída de uma matriz lipídica formada por lipídios sólidos e lipídios líquidos. Esse sistema é estabilizado por surfactante e sua matriz é sólida a temperatura ambiente. Essas imperfeições no arranjo interno da matriz supera os desafios das NLS (ELMOWAFY; AL-SANEA, 2021).

Outro aspecto a ser ressaltado sobre os CLN é a constituição da matriz lipídica. O componente lipídio determina a capacidade de carga e estabilidade do IFA. Além disso, é de extrema importância a solubilidade do IFA nos lipídios utilizados, garantindo uma eficiência de encapsulação adequada. A escolha de lipídios naturais também é explorada como alternativa aos lipídios sintéticos. Os lipídios naturais são fisiologicamente aceitáveis, biodegradáveis, não tóxicos e proporcionam melhor viabilidade celular. Além disso, podem melhorar a entrega tópica do IFA, facilitando a permeação e a hidratação da pele (DOBREVA; STEFANOV; ANDONOVA, 2020)

Os CLN conseguem acomodar maior quantidade de fármaco em relação as NLS devido a sua matriz imperfeita em detrimento da matriz cristalina das NLS, contem menor teor de água e menor chances de extravasamento do IFA (ELMOWAFY; AL-SANEA, 2021). Além disso, os CLN possuem elevada estabilidade física em comparação a outros carreadores nanoestruturados e em geral não utiliza solventes orgânicos para seu preparo (CHAUHAN *et al.*, 2020).

Figura 10 - Visão esquemática da nanopartícula lipídica sólida e carreadores lipídicos nanoestruturados



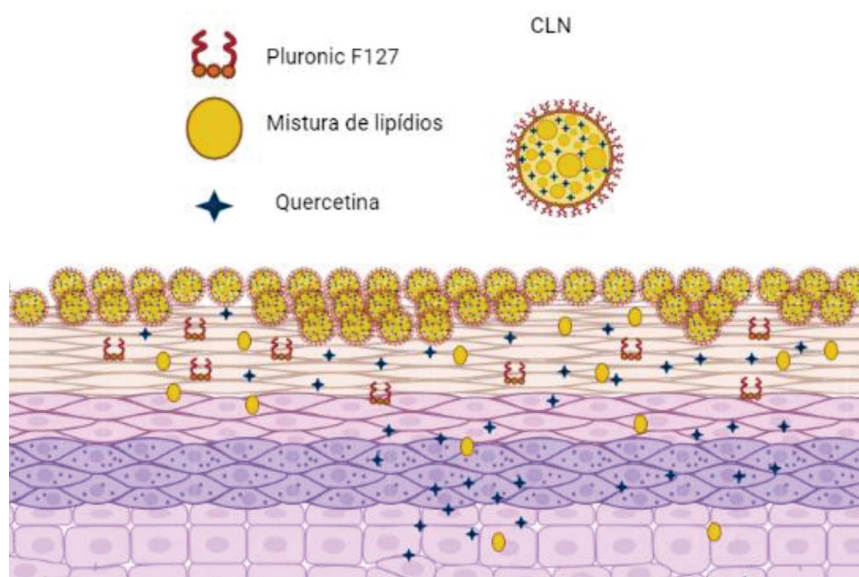
Fonte: Autora (2022).

Dependendo de suas características, os CLN permitem a penetração de moléculas até a epiderme, inviabilizando a absorção sistêmica, além de proporcionar a estabilidade química de compostos sensíveis à oxidação leve e hidrólise (BELOQUI *et al.*, 2016). Além disso, os CLN podem ser preparadas por diferentes métodos, como homogeneização de alta pressão, homogeneização a quente, técnicas de secagem por pulverização, ultrassom, emulsificação de solventes, técnica de dupla emulsão, homogeneização de alto cisalhamento, técnica de injeção de solvente, inversão de fase e método de microfluidização (CHAUHAN *et al.*, 2020). Os CLN são preparados facilmente e podem ser escalonáveis a nível industrial (BHISE *et al.*, 2017).

Entre as diferentes aplicações das CLN, o uso tópico pode ser considerado um dos mais promissores para fins terapêuticos e cosméticos. Um dos mecanismos para o aumento da penetração na pele por CLN é o seu pequeno tamanho de partícula que induz a adesão ao estrato córneo, favorecendo a permeação da substância ativa. Outro aspecto é que os CLN podem promover a hidratação da pele através da formação de um filme

oclusivo no estrato córneo, impossibilitando a perda de água por evaporação, ou promovem a hidratação através do reforço da barreira do filme lipídico da pele (GARCÊS *et al.*, 2018). Esse efeito oclusivo pode estar envolvido no incremento da permeação do IFA encapsulado (FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013). Além disso, os componentes utilizados na formulação dos CLN como lipídeos e surfactantes também podem atuar como intensificadores de permeação, incrementando a desorganização dos lipídeos do estrato córneo, possibilitando a permeação do IFA nas camadas da pele (figura 11) (FERREIRA *et al.*, 2021). Por fim, a via folicular também pode constituir uma microrota para a penetração cutânea dos CLN visando ao incremento da permeação do ativo encapsulado (GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2020).

Figura 11: Mecanismo de permeação dos CLN



Fonte: Autora (2022).

Diversos estudos empregaram nanopartículas lipídicas como carreadoras de substâncias quimiopreventivas (AMASYA *et al.*, 2019; BANERJEE *et al.*, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2018; GOTO *et al.*, 2017; CASSANO *et al.*, 2017; TUPAL *et al.*, 2016; ONG *et al.*, 2018; PALLIYAGE *et al.*, 2021; TESKAC; KRISTL, 2010). No estudo desenvolvido por Sun *et al.* (2014), CLN contendo quercetina foram desenvolvidos. O sistema nanoestruturado possibilitou uma liberação sustentada da quercetina. Além disso, aumentou significativamente a citotoxicidade e a indução a apoptose frente as células cancerígenas MCF-7 e MDA. Os CLN apresentaram boa estabilidade química e física. Em outro estudo NLS foram projetadas contendo curcumina e resveratrol. Preparadas

pela técnica de homogeneização de alto cisalhamento, as nanopartículas possibilitaram maior permeação dos polifenóis sobretudo do resveratrol. Além disso, houve a inibição da proliferação das células de melanoma (PALLIYAGE *et al.*, 2021)

Além disso, as nanopartículas lipídicas também foram aplicadas para encapsular substâncias capazes de prevenir os efeitos do envelhecimento induzido pela radiação UV (JEON *et al.*, 2013; GOINDI; GULERIA; AGGARWAL, 2015; CASTELLANI *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2017). Nesse sentido, SUVARNA *et al.* (2016) desenvolveram NLS contendo um hepta-peptídeo. A formulação desenvolvida apresentou significativa proteção às células expostas a RUV em explantes de pele. A pele tratada com a formulação apresentou uma redução de 20% de dano ao DNA em comparação ao placebo. Em outro estudo foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas com quitosana-TPP para o carregamento de quercetina. Esse sistema nanoestruturado possibilitou a permeação da quercetina pela epiderme, mostrou excelente estabilidade e baixa citotoxicidade em células HaCat. Além disso, o tratamento com as nanopartículas possibilitou a redução do edema em camundongos expostos a radiação UVB (NAN *et al.*, 2018). Visando a proteção contra os efeitos da radiação UVB, Marchiori *et al.* (2017) desenvolveu nanocápsulas contendo o polifenol silibinina. Após 24h de tratamento, a formulação possibilitou a redução do edema de orelha de camundongos induzido pela radiação UVB. Após 72h, a formulação ainda apresentava atividade. Nesse contexto, os CLN podem ser consideradas sistema com potencial para entrega de substância ativas na quimioprevenção. Porém ainda não foram desenvolvidos estudos para a nanoestruturação da QCT contra a radiação UVA visando a aplicação tópica.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina e avaliar sua ação quimiopreventiva *in vitro* contra danos genotóxicos e mutagênicos induzidos por radiação UVA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados contendo quercetina;
- Caracterizar as nanopartículas desenvolvidas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade, potencial Zeta e eficiência de encapsulação;
- Avaliar acitotoxicidade da quercetina livre e nanoestuturada em linhagens de queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (L929);
- Avaliar a estabilidade preliminar dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ou não quercetina em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e ao potencial Zeta
- Padronizar o ensaio cometa, e avaliar o potencial quimiopreventivo *in vitro* da quercetina livre e nanoestuturada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

Quercetina, Pluronic® F-127 e a agarose de ponto de fusão normal foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Manteiga *Passiflora incarnata* (Lote PFB018/03, Ebpm Comercial Ltda, Brasil). O miglyol 812 foi obtido da AQIA Química Inovativa adquirido através da Arcanjo Miguel Farmácia de Manipulação e Homeopatia. O Dulbecco's modified Eagle medium high glucose; Phosphate Buffered Saline foram obtidos da ThermoFisher. O Soro Bovino Fetal e a tripsina/ EDTA 2,5% foram adquiridos da LGC Biotecnologia. O Azul de Trypan e o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O EDTA e DMSO são da Êxodo Científica (Brasil). O brometo de etídio, cloreto de sódio, foram obtidos da Sinergia Científica (Brasil), Neon (Brasil). O hidróxido de sódio foi adquirido da Anidrol (Brasil) e o hidróxido amino metano da Inolab (Brasil).

4.2 DESENVOLVIMENTO E CARATERIZAÇÃO DOS CLN

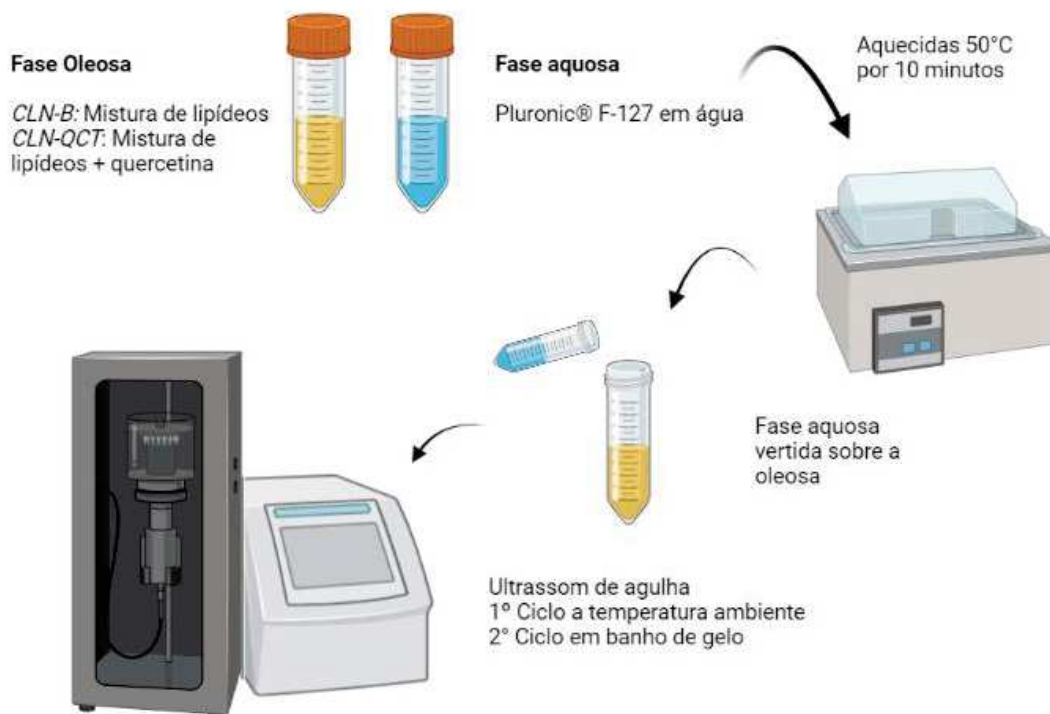
4.2.1 Desenvolvimento dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturado

Os CLN contendo quercetina (CLN-QCT, n=3) foram desenvolvidos a partir da técnica de ultrassonificação com base nos estudos de Palmieri e colaboradores (2020) (figura 12). Para isto, a quercetina (10 mg) foi solubilizada em miglyol (360 mg) constituindo a fase oleosa dessa formulação. Para melhorar a solubilização do ativo no solvente, foi necessário submeter essa mistura a sete ciclos de três minutos em uma amplitude de 50% em homogeneizador ultrassônico (Ultrasonics). Em seguida, na mesma proporção foi adicionado o lipídio sólido, extraído das sementes de *Passiflora incarnata*. No caso dos carreadores sem quercetina (CLN-B, n=3), não houve a etapa de solubilização da quercetina, mas sim a mistura direta dos lipídios.

A fase aquosa foi constituída por Pluronic® F127 na concentração de 15mg/mL. Ambas as fases foram aquecidas a 50°C por 10 minutos. Em seguida 8mL da fase aquosa foi adicionada a fase oleosa e submetida a irradiação ultrassônica (315W) em

homogeneizador ultrassônico durante três minutos por duas vezes em sequência, sendo a última realizada a 4 °C.

Figura 12 - Preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturado



Fonte: Autora (2022).

4.2.2 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm) e do índice de polidispersividade (IP) dos CLN

Para a determinação do DHm e IP foi utilizada a técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS). Nesse método há correlação entre as análises de flutuações da intensidade de espalhamento de luz pelas nanopartículas relacionando com o tamanho das partículas. As nanoestruturas apresentam movimento browniano caracterizado pelo movimento aleatório das partículas suspensas em um fluido (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

O DHm e o IP foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS - *Dynamic Light Scattering*). O ângulo do laser He-Ne (633nm) em relação às amostras foi de 173°. As análises foram realizadas em triplicata a 25°C, após diluição das amostras (1:800 v/v) em água ultrapurificada para obtenção da condição adequada para a dispersão da luz.

4.2.3 Determinação do Potencial Zeta (PZ)

O potencial Zeta (PZ) pode ser definido como a mensuração da carga superficial das partículas em suspensão. Em uma solução, as nanopartículas terão uma carga. Isso faz com que íons de carga oposta estejam associados a superfície, conhecida como contra-íon. Uma segunda camada difusa é formada com íons fracamente associados que são os co-íons. Esses co-íons apresentam a mesma carga da partícula, chamado de plano de cisalhamento. É nesse ambiente que o PZ é medido. Nas medidas de PZ, um campo elétrico é aplicado sobre a amostra e o movimento, através da mobilidade eletroforética, é mensurado por eletroforese laser Doppler (CLOGSTON; PATRI, 2011)

A determinação do PZ foi realizada com o equipamento Zetasizer Nano SZ (Malvern Instruments, UK) utilizando a técnica de mobilidade eletroforética, em campo elétrico de potencial de 150mV. As análises foram realizadas em triplicata a 25°C, após diluição das amostras (1:400 v/v) em solução de cloreto de sódio (0,001M).

4.2.4 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada indiretamente, por meio da técnica de ultrafiltração/centrifugação. Inicialmente os CLN-QCT foram diluídos 100x e centrifugadas a $1.500 \times g$ por 15 minutos (KASVI) em filtros tipo Amicon (MWCO 10.000, Millipore, Alemanha). Posteriormente, o filtrado foi diluído em álcool etílico 50% e, em seguida, analisado utilizando o equipamento Espectrofotômetro UV/Vis Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific). O comprimento de onda selecionado foi de 372nm (KUMAR *et al.*, 2016; ABBASZADEH *et al.*, 2020). Foi construída uma curva de calibração com concentrações 1,25- 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina. A partir da curva, foi possível calcular a concentração de quercetina livre no filtrado e, conseqüentemente, calcular a EE (Equação 1)

Equação 1:

$$EE(\%): \frac{\text{Quercetina total} - \text{Quercetina quantificada}}{\text{Quercetina total}} \times 100$$

4.2.5 Estabilidade preliminar dos CLN

Para o estudo de estabilidade, foram preparadas CLN-B e CLN-QCT. Triplicatas dos carreadores foram armazenadas em temperatura ambiente e à 4°C. Essas amostras foram analisadas quanto DHm, IP e PZ nos seguintes dias, contados a partir do seu preparo: 1, 2, 7, 14, 21, 28 dias e em seguida mensalmente até completar seis meses de seu preparo

4.2.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A técnica de redução de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium]} é um ensaio colorimétrico que consiste na formação do derivado de formazan. Esse sal é insolúvel em água e apresenta coloração roxa, sendo formado pela redução do sal MTT. Essa reação ocorre pelo metabolismo mitocondrial com clivagem do anel tetrazólio feita pelas desidrogenases mitocondriais (STOCKERT *et al.*, 2015). Com isso, células que permanecem com seu metabolismo ativo, metabolizam o MTT possibilitando a formação do formazan revelando a viabilidade celular presente (ANGIUS; FLORIS, 2015).

A viabilidade celular por teste de MTT foi realizado nas linhagens de queratinócitos (HaCat) cultivados em meio DMEM HAM e fibroblastos (L929) cultivados em meio DMEM *high*. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma concentração de 5×10^3 células/poço. No dia seguinte, as células foram tratadas com QCT, CLN-B, CLN-QCT e DMSO 0,5% (n= 6). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO_2 por 24h. Em seguida, o MTT foi acrescentado (5 mg/mL) e as placas foram incubadas por 4h. Posteriormente, os precipitados formados foram solubilizados com DMSO e a absorbância foi medida a 540nm. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com as amostras foi realizado a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DA FORMULAÇÃO

4.3.1 Ensaio Cometa

As células de fibroblastos (L929) foram plaqueadas em placas de seis poços em uma concentração de 1×10^5 células/poço e incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 durante 24h (NOUSHAD *et al.*, 2009). Em seguida, as células receberam seus tratamentos que foram CLN-QCT, QCT e CLN-B por 24h. Ao final desse período, houve a substituição do meio e a exposição das placas a radiação UVA por 5 minutos ($507,5 \pm 68,7 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) (THIESEN *et al.*, 2017).

Novamente as placas foram incubadas durante 24h. Após esse período, as células foram tripsinazadas e centrifugadas à 1200rpm por quatro minutos. O sobrenadante foi descartado e o conteúdo ressuspendido em 1mL de agarose com baixo ponto de fusão 0,5%. Em seguida, a solução foi colocada sobre uma lâmina de microscópio pré-recoberta com agarose com ponto de fusão normal a 1,5%. Para realização do teste cometa foram feitas três lâminas para cada tratamento aplicado.

Após solidificação em 4°C por 10 minutos, as lâminas foram dispersas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10, 1% Triton X-100 e 5% DMSO) durante uma hora e trinta minutos a 4°C . Durante esse período, ocorre a lise celular permitindo a exposição do material genético. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmaras de eletroforese horizontal coberta com solução de tampão de eletroforese (300 mM NaOH e 1 mM EDTA) com pH superior a 13 durante 30 minutos. Nesse momento ocorre o desnovelamento das cadeias de DNA. Depois de ligadas a cubas, as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica em uma Cuba de Eletroforese LPS 300V (Loccus, Brasil), 25V, 300 mA por 30 minutos de forma a induzir a migração de fragmentos de DNA resultantes de danos (NAGHAVI *et al.*, 2014).

Em seguida as lâminas foram cobertas com solução neutralizadora (0,4M Tris, pH 7,5) por 5 minutos a temperatura ambiente. Por fim as lâminas foram submersas em uma solução de $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio e em seguida analisadas no microscópio de fluorescência Olympus BX53 (THANKAM; MUTHU, 2014).

A análise do ensaio foi feita através da obtenção do Índice de dano ao DNA (ID). Para isto, foram contados 100 cometas por lâmina em triplicata. O número de cometa de

cada classe foi multiplicado pelo número correspondente à classe do dano. O ID pode variar de 0 à 400 (FAGIANI et al., 2020). Conforme a fórmula a seguir:

$$ID = [(M0 \times 0) + (M1 \times 1) + (M2 \times 2) + (M3 \times 3) + (M4 \times 4)]$$

Em que:

ID = Índice de Dano

M0 = Número de células com classe de dano 0;

M1 = Número de células com classe de dano 1;

M2 = Número de células com classe de dano 2;

M3 = Número de células com classe de dano 3;

M4 = Número de células com classe de dano 4.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média \pm erro padrão da média. Valores em que p foram menos que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. Na caracterização do CLN a significância estatística foi determinada pelo teste t de Student e o estudo de estabilidade preliminar foi analisado através da Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para comparação dos grupos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO E CARATERIZAÇÃO DOS CLN

5.1.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), e do índice de polidispersividade (IP) dos CLN

Na tabela 1 são apresentados os resultados referentes ao DHm e ao IP das CLN-B e CLN-QCT. As CLN-B e CLN-QTC apresentaram DHm de 210,1 nm \pm 27,014 e 230,7 nm \pm 30,594, respectivamente. O IP foi de 0,196 \pm 0,077 e 0,247 \pm 0,070 para os CLN-B e CLN-QTC, respectivamente. A incorporação da QCT não provocou alterações

significativas no sistema, uma vez que não diferenças significativas entre a formulação sem o IFA.

Tabela 1 - Caracterização físico-química dos CLN em relação ao DHm e IP

	CLN-B	CLN-QCT
DHm (nm)	210,1 ± 27,01	230,7 ± 30,6
IP	0,196 ± 0,08	0,247 ± 0,07

Fonte: Autora (2022).

Todos os valores representam média ± desvio padrão (n=3). Não houve diferença significativa entre as formulações

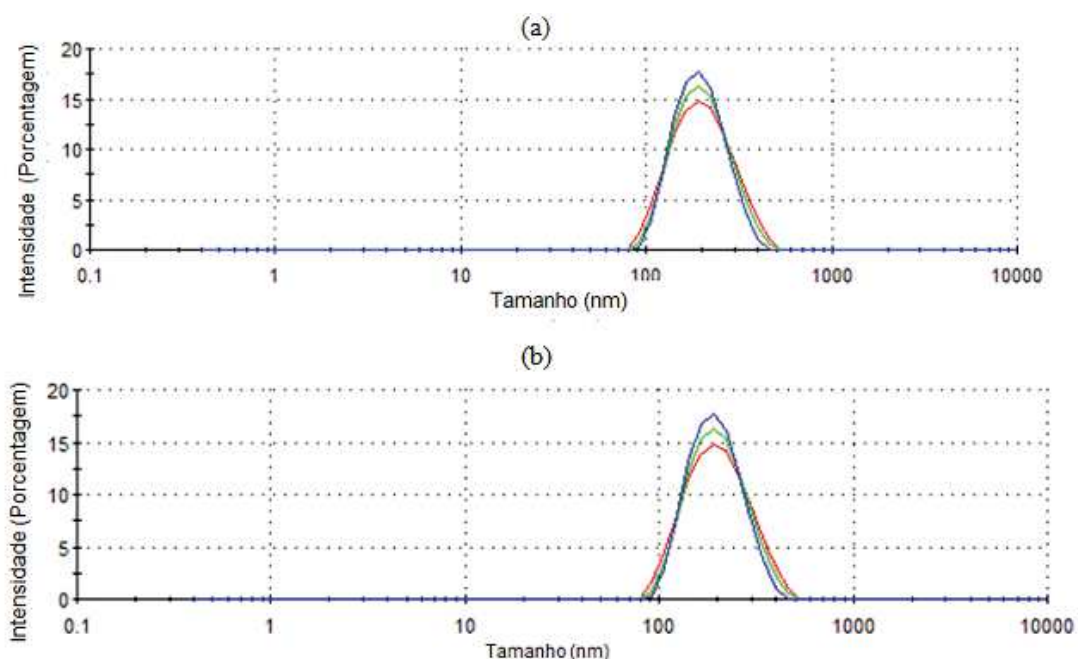
O tamanho das nanopartículas dos CLN auxilia no incremento da permeação cutânea do IFA, devido a maior área superficial (SALA *et al.*, 2018). O tamanho entre 200-400nm dos CLN possibilita a formação de um filme oclusivo que impede a perda de água por evaporação. Esse fenômeno é valioso uma vez que induz a hidratação do estrato córneo levando ao aumento da permeação do IFA e sua melhor absorção pela pele (KHATER *et al.*, 2021). Além disso, os CLN são capazes de interagir com as membranas da bicamada lipídica e causar o rearranjo lipídico, que auxilia na permeação do IFA encapsulado (SOUTO *et al.*, 2022). Outra possibilidade diz respeito à entrega de IFA's pela via folicular. Com isso, os CLN podem se depositar em folículos pilosos (GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2020; SGUIZZATO; ESPOSITO; CORTESI, 2021).

Diante disso, e considerando os valores de DHm obtidos, nossos resultados indicam que os CLN desenvolvidos podem constituir alternativa promissora para uma maior penetração cutânea da QCT. No entanto, estudos de permeação cutânea *ex vivo* serão conduzidos para validar essa hipótese. Nesse sentido, Chen-Yu *et al.* (2012) avaliaram a permeação cutânea da QCT encapsulada em CLN (DHm ~ 215 nm) utilizando célula de difusão vertical de Franz e relataram um aumento de 1,52 vezes na permeação desse IFA até camadas mais profundas da epiderme em comparação à QCT em solução. Esse fato é justificado pelos autores devido ao pequeno tamanho das partículas e sua capacidade de formação de um filme oclusivo sobre a pele, favorecendo a hidratação e permitindo melhor permeação do ativo.

Em relação ao IP, esse parâmetro é usado para revelar a homogeneidade de distribuição de tamanho das partículas. Partículas que apresentam IP próximo de zero apresentam tamanhos semelhantes entre si, o que indica a obtenção de sistema monodisperso. Valores maiores que 0,3 podem indicar uma heterogeneidade de distribuição de tamanho das partículas (VANTI *et al.*, 2021). Nesse contexto, nossos resultados indicam a obtenção de formulações monodispersas (Tabela 1). Esse comportamento também pode ser comprovado a partir dos gráficos de distribuição de tamanho (Figura 13). Ambas formulações apresentaram uma distribuição monomodal de diâmetro de partícula, indicando uma distribuição homogênea e comportamento monodisperso, como desejável para a estabilidade coloidal.

Figura 13 - Distribuição de tamanho por intensidade dos carreadores (n=3).

(a) CLN-B; (b) CLN-QCT



Fonte: Autora (2022).

5.1.2 Determinação do Potencial Zeta (PZ)

O PZ pode fornecer informações sobre a estabilidade do sistema coloidal. Considerando resultados de 0 a 10 mV, em módulo, pode-se considerar o sistema como altamente instável. Enquanto valores de 10 a 20 mV podem indicar um sistema

relativamente estável. Já PZ entre 20 a 30 mV e maiores que 30 mV podem ser classificados em moderadamente estável e altamente estável, respectivamente. Porém, em um sistema é preciso considerar não apenas as forças repulsivas eletrostáticas, mas também estabilidade estérica (BHATTACHARJEE, 2016). Os resultados apresentados (tabela 2 e Figura 14) revelam que o sistema desenvolvido pode ser considerado estável, uma vez que o PZ em modulo apresentam se maiores que 30mV.

Tabela 2 - Caracterização físico-química dos CLN em relação ao PZ

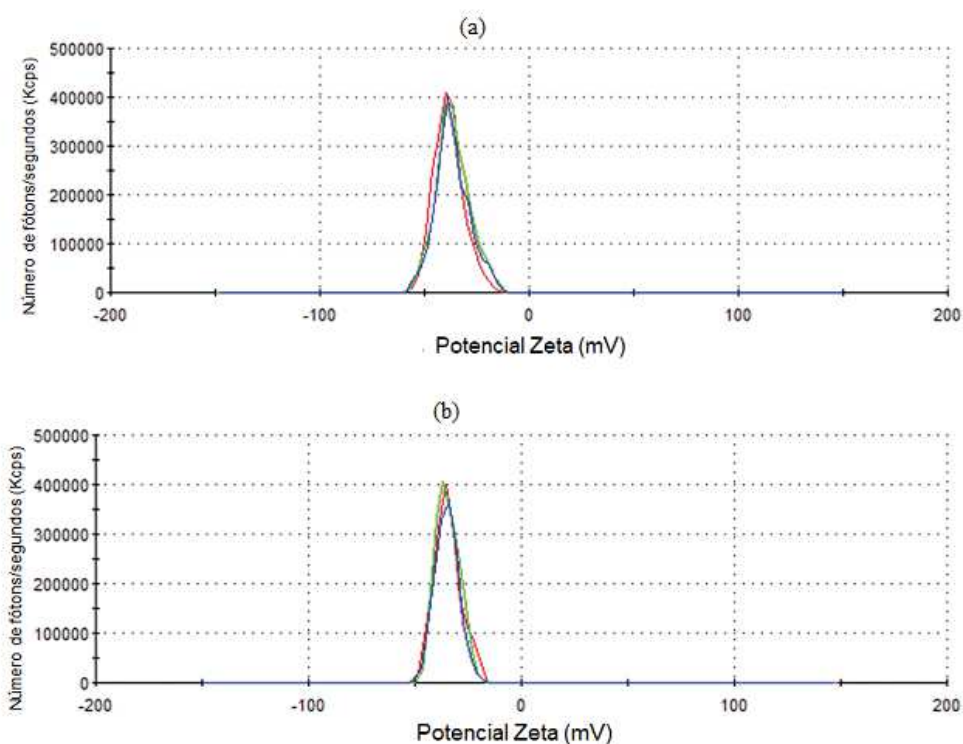
	CLN-B	CLN-QCT
PZ (mV)	$-35,1 \pm 2,0$	$-36,5 \pm 2,1$

Fonte: Autora (2022)

Todos os valores representam média \pm desvio padrão (n=3). Não houve diferença significativa entre as formulações.

Figura 14- Distribuição do Potencial Zeta dos carreadores (n=3).

(a) CLN-B; (b) CLN-QCT



Fonte: Autora (2022)

O segmento de PEG do Pluronic® F127 está presente na porção mais externa do núcleo oleoso do CLN. Esse segmento não apresenta carga, com isso era previsto nanopartículas com PZ próximo a zero. Entretanto, é importante ressaltar que esse tensoativo contribui para a estabilidade do sistema devido ao impedimento estérico gerado pela extensa cadeia monomérica em torno nas nanopartículas. Assim, o PZ negativo pode ser justificado pela provável ionização dos ácidos graxos da manteiga utilizada como constituinte da fase oleosa da formulação. A manteiga de *Passiflora incarnata* é constituída por uma mistura de ácidos graxos (tabela 3) tendo como componente majoritário o ácido oleico, além de conter ácido esteárico e palmítico. Nesse sentido, é possível que os ácidos graxos, em ambiente aquoso, estejam desprontonados, tornando a superfície da nanopartícula carregada negativamente (PALMIERI *et al.*, 2020).

Tabela 3: Composição da *Passiflora incarnata*

Ácido Graxo	Porcentagem
C18:1 – ácido oleico	38,7
C18:0 – ácido esteárico	15,8
C16:0 – ácido palmítico	13,6
C12:0 – ácido láurico	12,2
C18:2 – ácido linoleico	10,6
C14:0 – ácido mirístico	4,9
C10:0 – ácido cáprico	0,9
C8:0 – ácido caprílico	0,7
C16:1 – ácido palmitoleico	0,3
C20:0 – ácido araquidônico	0,3
C18:3 – ácido linolênico	0,2
Outros	1,7

Fonte: PALMIERI *et al.*, 2020

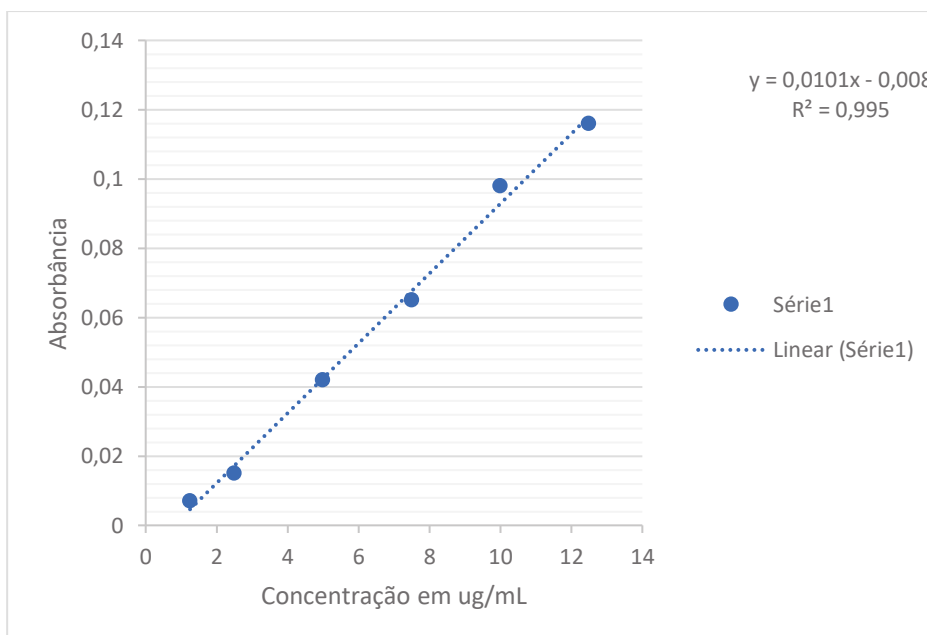
Em um estudo desenvolvido por Silva e colaboradores (2021), também foi utilizado Pluronic® F127 para a formulação das nanopartículas. Nesse trabalho, foram formuladas NLS contendo licochalcona A a partir de alcaçuz. As NLS foram preparadas pelo método de homogeneização por alto cisalhamento. A fase oleosa foi constituída por manteiga de cupuaçu e licochalcona. Enquanto a fase aquosa era formada por Pluronic®

F127. O tamanho médio das nanopartículas foi de $101,01 \pm 1,8$, e o IP foi de $0,13 \pm 0,03$. Enquanto o PZ foi de $-32,34 \pm 2,9$ mV. O PZ negativo foi justificado pela ionização dos ácidos graxos presentes na manteiga utilizada.

5.1.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação

A Eficiência de Encapsulação (EE) foi medida de forma indireta, por meio da quantificação do fármaco presente no ultrafiltrado. Primeiramente, a construção da curva de calibração da QCT foi realizada nas concentrações 1,25-12,5 $\mu\text{g/mL}$. A partir da curva, foi obtido um $r^2 = 0,995$ revelando uma correlação linear com o aumento da concentração de QCT (Figura 15).

Figura 15- Curva de calibração da QCT



Fonte: Autora (2022).

A partir do filtrado das CLN-QCT foi obtida uma EE de $91,29 \pm 2,09\%$, o que pode ser justificado pela elevada lipofilicidade da QCT. Resultado semelhante foi encontrado por Kumar *et al.* (2016) quando da encapsulação da QCT em CLN. Nesse caso, a fase oleosa era composta por lipídio líquido (acetato de tocoferol), lipídio sólido (Compritol[®]) e fosfolipídio (Phospholipon[®] 90G). A EE, calculada após quantificação da QCT em espectrofotômetro UV/VIS, resultou em valor igual a $89,91 \pm 6,41\%$.

5.1.4 Estabilidade preliminar dos CLN

A Avaliação preliminar da estabilidade dos CLN-B (tabela 4) e CLN- QCT (tabela 5) armazenados à temperatura ambiente e em 4°C são apresentados a seguir após o preparo (dia 1), no dia seguinte (dia 2), sete dias após o preparo (dia 7), 14 dias após o preparo (dia 14), 21 dias após o preparo (dia 21), 28 dias após o preparo (dia 28), dois, três, quatro, cinco e seis meses após o preparo.

Tabela 4 - Avaliação preliminar da estabilidade dos CLN-B armazenados à temperatura ambiente e à 4°C

Tempo	Temperatura ambiente			4°C		
	DHm (nm)	IP	PZ (mV)	DHm (nm)	IP	PZ (mV)
Dia 1	235,12 ± 36,77	0,24 ± 0,05	-38,07 ± 3,97	210,10 ± 27,01	0,19 ± 0,08	-35,14 ± 2,19
Dia 2	192,64 ± 22,31	0,14 ± 0,04	-37,29 ± 4,47	198,16 ± 9,03	0,16 ± 0,03	-38,04 ± 2,89
Dia 7	191,98 ± 21,43	0,14 ± 0,03	-36,88 ± 4,46	194,60 ± 8,54	0,14 ± 0,04	-38,77 ± 0,48
Dia 14	193,02 ± 22,26	0,13 ± 0,04	-35,23 ± 2,46	202,23 ± 9,31	0,19 ± 0,03	-36,44 ± 1,39
Dia 21	192,47 ± 19,75	0,16 ± 0,03	-33,27 ± 2,94	200,29 ± 8,45	0,16 ± 0,03	-36,22 ± 1,11
Dia 28	199,60 ± 18,22	0,15 ± 0,04	-29,96 ± 10,72	192,01 ± 8,83	0,13 ± 0,02	-29,67 ± 11,14
2 meses	189,66 ± 21,08	0,14 ± 0,03	-29,32 ± 3,53	194,54 ± 5,98	0,13 ± 0,02	-33,61 ± 3,39
3 meses	186,18 ± 20,72	0,14 ± 0,04	-24,40 ± 0,67	190,13 ± 8,10	0,13 ± 0,02	-24,43 ± 0,09
4 meses	218,03 ± 30,57	0,21 ± 0,09	-30,06 ± 5,13	192,02 ± 9,31	0,14 ± 0,03	-27,59 ± 3,03
5 meses	198,52 ± 21,19	0,19 ± 0,04	-20,98 ± 8,20*	193,41 ± 9,51	0,14 ± 0,03	-24,47 ± 3,25
6 meses	186,96 ± 25,92	0,14 ± 0,06	-12,31 ± 2,50*	188,92 ± 6,55	0,15 ± 0,02	-15,80 ± 0,44*

Fonte: Autora (2022).

Todos os valores representam média ± desvio padrão (n=3). *Observada diferença significativa em relação ao dia 1.

Tabela 5 - Avaliação preliminar da estabilidade dos CLN-QCT armazenados à temperatura ambiente e à 4°C

Tempo	Temperatura ambiente			4°C		
	DHm (nm)	IP	PZ (mV)	DHm (nm)	IP	PZ (mV)
Dia 1	205,76 ± 27,01	0,23 ± 0,04	-33,36 ± 3,75	230,72 ± 30,59	0,25 ± 0,07	-36,58 ± 2,44
Dia 2	196,76 ± 6,79	0,19 ± 0,03	-36,04 ± 2,44	214,56 ± 7,69	0,18 ± 0,03	-36,58 ± 0,86
Dia 7	192,49 ± 4,12	0,16 ± 0,03	-37,57 ± 2,92	207,30 ± 4,81	0,16 ± 0,03	-33,72 ± 2,03
Dia 14	202,22 ± 11,55	0,23 ± 0,04	-27,09 ± 5,56	215,01 ± 8,90	0,20 ± 0,04	-34,38 ± 3,76
Dia 21	193,98 ± 8,05	0,17 ± 0,03	-36,36 ± 3,09	193,63 ± 7,06	0,16 ± 0,04	-34,38 ± 3,76
Dia 28	191,36 ± 6,49	0,17 ± 0,06	-32,50 ± 2,78	204,77 ± 5,97	0,17 ± 0,03	-29,86 ± 1,82
2 meses	193,40 ± 7,57	0,18 ± 0,05	-34,15 ± 2,34	205,24 ± 9,76	0,17 ± 0,03	-33,30 ± 5,65
3 meses	189,13 ± 7,66	0,17 ± 0,03	-19,97 ± 0,50*	203,90 ± 6,83	0,16 ± 0,04	-24,08 ± 1,67*
4 meses	203,47 ± 34,19	0,21 ± 0,08	-23,90 ± 1,39*	207,33 ± 6,34	0,19 ± 0,02	-25,93 ± 1,93*
5 meses	189,72 ± 5,41	0,16 ± 0,04	-22,53 ± 3,38*	212,77 ± 11,87	0,21 ± 0,07	-21,85 ± 5,27*
6 meses	188,50 ± 6,13	0,18 ± 0,04	-14,37 ± 2,30*	203,76 ± 6,16	0,18 ± 0,04	-16,59 ± 1,00*

Fonte: Autora (2022).

Todos os valores representam média ± desvio padrão (n=3). *Observada diferença significativa em relação ao dia 1.

O acompanhamento da estabilidade coloidal dos CLN é crucial para a avaliação da manutenção das propriedades estruturais do sistema durante o tempo de armazenamento. Nesse sentido, modificações estruturais de nanocarreadores utilizados como sistemas de liberação de fármacos podem afetar seu potencial terapêutico (ZHANG *et al.*, 2018). Por meio dos resultados obtidos, não foram encontradas diferenças significativas para os valores de DHm das formulações (CLN-B e CLN-QCT) durante os 6 meses do estudo, independente da condição de armazenamento. Esse resultado indica que não houve tendência à agregação das partículas ao longo do tempo. Uma possível explicação para esse comportamento pode estar relacionada à estabilização eletrostática em combinação à estabilidade estérica proporcionada pelo Pluronic[®]. Além disso, pode ser devido à presença do lipídio líquido no núcleo oleoso dos CLN. Nesse sentido, durante o armazenamento, a matriz lipídica sólida presente em nanopartículas lipídicas tende a cristalizar progressivamente, o que resulta no incremento do diâmetro da partícula. No entanto, quando se adiciona um lipídio líquido à formulação, a nanopartícula tende a ficar mais estável, uma vez que esse lipídio dificulta a recristalização de lipídios sólidos e, assim, o tamanho permanece praticamente inalterado durante o armazenamento (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTA, 2018). De modo semelhante, também não observamos modificações significativas nos valores de IP para ambas as formulações ao longo do estudo. Esse resultado atesta a manutenção do comportamento monodisperso do sistema coloidal.

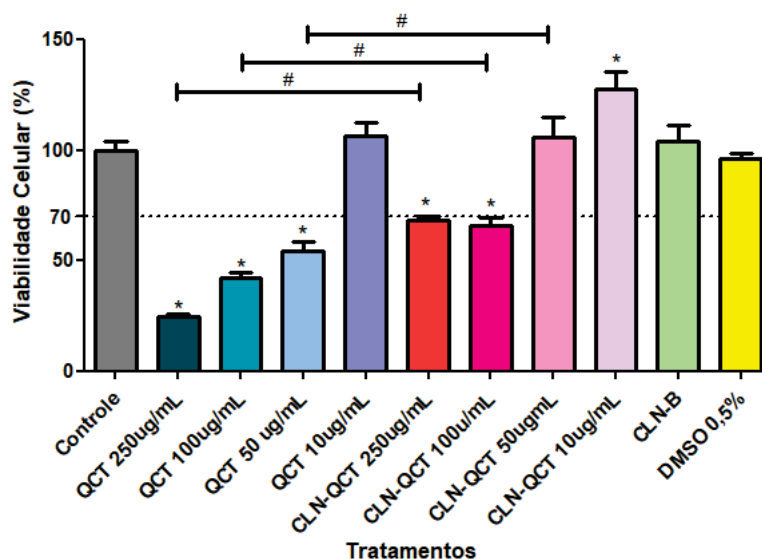
Em relação ao PZ, houve diferença estatística a partir de 5 meses de armazenamento (em temperatura ambiente) e no 6º mês (à temperatura de 4° C) para os CLN-B e a partir do 3º mês para os CLN-QCT, independente da temperatura de armazenamento. Uma possível explicação para esses resultados pode estar relacionada à variação de pH ao longo do tempo, o que impacta diretamente na ionização das moléculas de ácidos graxos presentes na manteiga de *Passiflora incarnata*. Nesse sentido, para os CLN-QCT é possível que a presença da QCT, a qual pode ter sido parcialmente liberada ao longo do tempo, possa ter contribuído para uma maior alteração no valor de pH. Entretanto, para a comprovação dessa hipótese, novos ensaios devem ser conduzidos visando acompanhar o valor de pH ao longo do tempo, bem como avaliar a liberação da QCT nas condições de armazenamento propostas. Apesar de indicar uma possível instabilidade das formulações, essa alteração no PZ para valores menos negativos não refletiu nos outros parâmetros avaliados, possivelmente devido a estabilização estérica proporcionada pelo copolímero não-iônico.

5.1.5 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio da exposição de linhagem de fibroblasto (L929) e queratinócitos (HaCat) à quercetina bem como aos CLN-QCT e CLN-B. Essas linhagens foram escolhidas diante da intenção de uso da formulação pela via tópica. As células foram cultivadas e tratadas com amostras nas concentrações finais de 250-10 µg/mL de QCT. Como controles, foram utilizados meio DMEM e meio DMEM acrescido do solvente para solubilização da quercetina (DMSO 0,5%).

Na linhagem L929 (Figura 16) é possível observar, para a concentração de 50 µg/mL, um aumento significativo na viabilidade das células expostas à QCT nanoestruturada em detrimento à QCT livre ($p < 0,05$). Além disso, é importante ressaltar que o valor de viabilidade celular para a amostra CLN-QCT 50 µg/mL não difere do grupo controle negativo (meio DMEM). Esses dados corroboram um dos pilares da aplicação da nanotecnologia na área biomédica, o qual envolve a redução do potencial tóxico das substâncias encapsuladas. Nesse sentido, é possível que a liberação controlada da QCT a partir dos CLN possa minimizar os efeitos citotóxicos dose-dependentes desse ativo frente à linhagem L929. No entanto, estudos de liberação *in vitro* devem ser conduzidos para que seja possível confirmarmos o perfil de liberação da QCT a partir do carreador nanoestruturado. Ressaltamos ainda que para as formulações CLN-QCT 50 µg/mL e CLN-QCT 10 µg/mL a viabilidade celular encontra-se acima de 70% (Figura 15), o que, de acordo com a ISO 10993-5/2009, não caracteriza efeitos tóxicos significativos.

Figura 16- Avaliação do CLN-QCT, QCT, CLN-B, DMSO 0,5% sobre a viabilidade celular de linhagem de fibroblasto L929 após 24h de tratamento

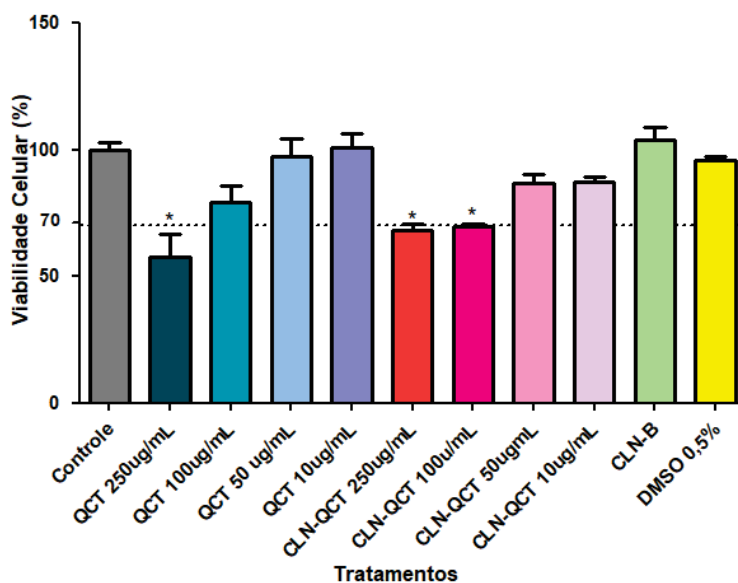


Fonte: Autora (2022).

*Observada diferença significativa em relação ao controle. # Observada diferença significativa entre a QCT e CLN-QCT

Em relação aos queratinócitos (Figura 17), observamos uma maior tolerância dessa linhagem celular à QCT livre. Assim, não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade celular quando em comparação à formulação nanoestruturada. No entanto, é possível constatar que, a partir da concentração de 50 μ g/mL, as formulações de CLN apresentarem viabilidade celular comparável à do controle negativo. Além disso, nesses casos, os valores de viabilidade encontram-se acima de 70%. Em conjunto, os resultados de viabilidade celular realizados nas linhagens L929 e HaCaT podem indicar uma possível segurança em relação ao uso tópico das nanopartículas desenvolvidas

Figura 17- Avaliação do CLN-QCT, QCT, CLN-B, DMSO 0,5% sobre a viabilidade celular de linhagem de queratinócitos HaCat após 24h de tratamento



Fonte: Autora (2022).

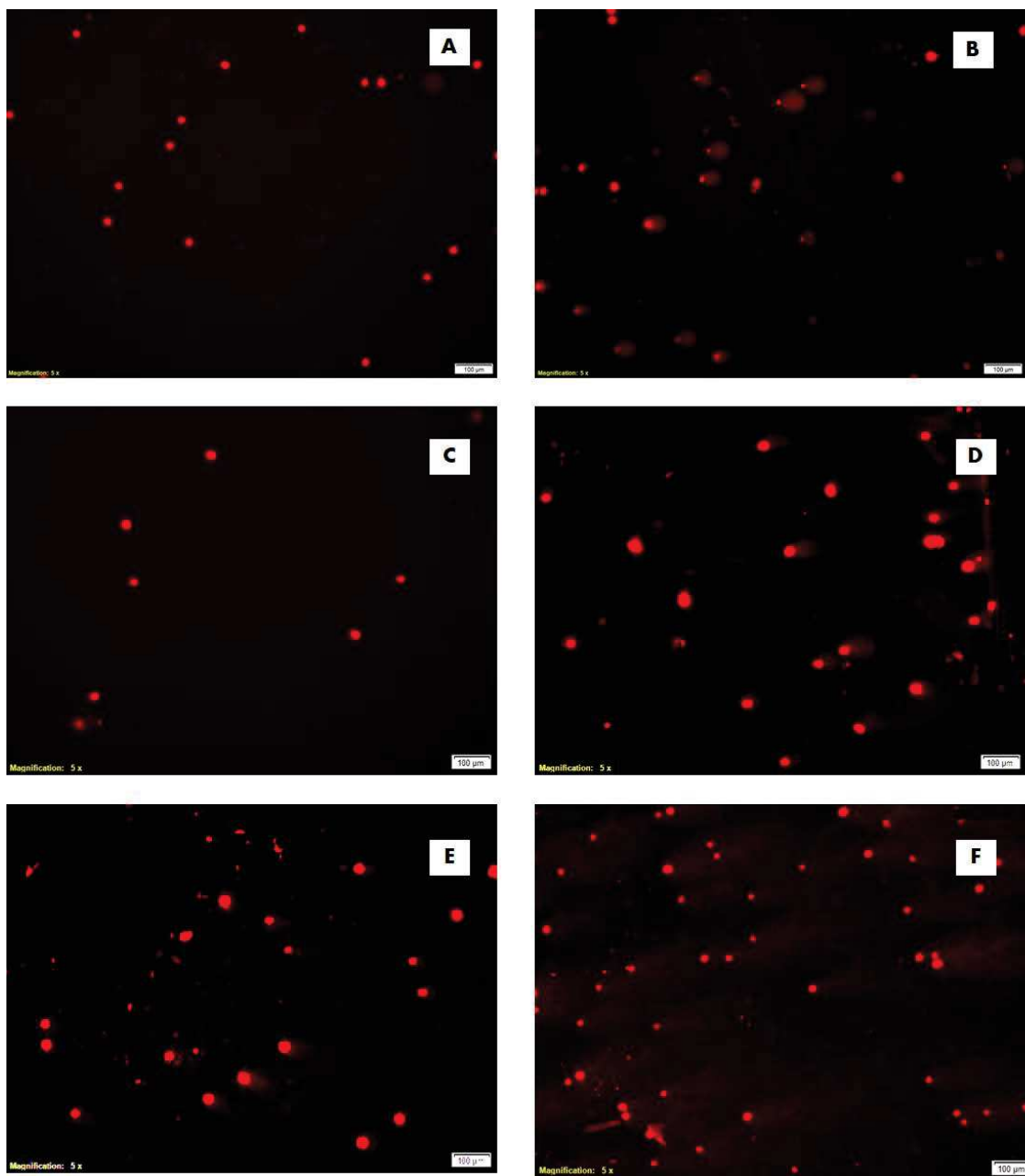
*Observada diferença significativa em relação ao controle

5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOPREVENTIVO DA FORMULAÇÃO

5.2.1 Teste Cometa

É possível verificar na figura 18 as fotos obtidas a partir do ensaio cometa em que as células receberam tratamento de acordo com o grupo correspondentes e posteriormente a radiação, com exceção do controle negativo em que as células não foram expostas a radiação. Nesse ensaio os fibroblastos foram priorizados uma vez que a radiação UVA ocasiona maior permeação na pele e em suas camadas mais profundas há maior produção de ERO.

Figura 18 – Fotos obtidas a partir do ensaio cometa. Com exceção do controle negativo, os demais grupos foram expostos a radiação e receberam pré-tratamento. A: controle negativo. B: Controle positivo. C: grupo CLN-QCT. D: Grupo QCT. E: CLN-B. F: DMSO 0,1%



Fonte: Autora, 2022.

Nesse trabalho, a radiação UVA foi priorizada uma vez que é a responsável pela geração de ERO. A partir da figura abaixo (figura 19) é possível observar que o controle negativo apresentou baixo ID uma vez que é formado por células que não sofreram a exposição da radiação UVA. Já o controle positivo apresentou elevado ID comprovando a significativa formação de cometas. O controle positivo é constituído por células que receberam apenas a exposição à radiação UVA sem receber nenhum tratamento. Além disso, o DMSO a 0,1% apresentou ID elevado, assemelhando ao controle positivo e mostrando, portanto, que o DMSO utilizado para a solubilização da quercetina não interferiu no desempenho da mesma.

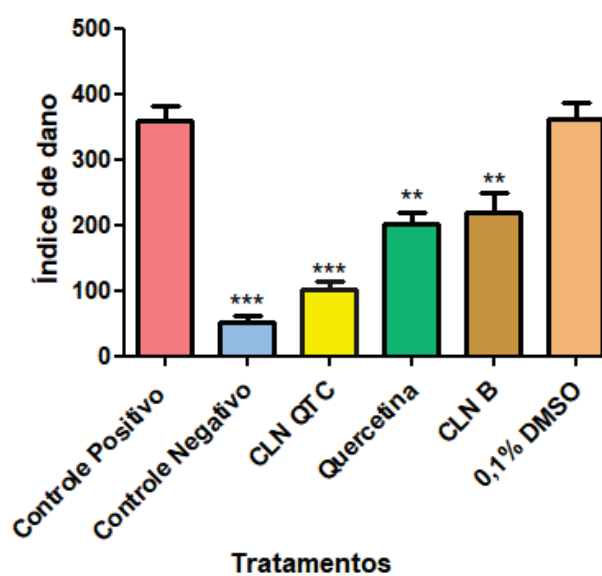
Em relação ao grupo tratado com a QCT foi observado um ID com diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$), comprovando que a QCT proporciona uma proteção às células frente a radiação UVA. A CLN B não apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com a quercetina ($p < 0,05$), mostrando também uma redução do dano ao DNA. Com isso, foi possível observar que o próprio nanocarreador, mesmo sem IFA, apresenta potencial quimiopreventivo.

Como mostrado ainda na figura 19, quando as células foram tratadas com quercetina nanoencapsulada, não houve diferença significativa em relação ao controle negativo. Isso mostra que a nanoencapsulação levou a potencialização do efeito quimiopreventivo da quercetina livre e da nanopartícula branca, mostrando, portanto, um provável efeito aditivo da ação quimioprotetiva de ambos. O sistema nanoestruturado provavelmente tem ação quimioprotetiva devido a sua composição lipídica que forma um filme oclusivo responsável por proteger as células da radiação. Além disso, a nanopartícula protege a QCT de degradação, como também possivelmente facilita a captação do ativo pelas células, proporcionando uma entrega mais eficiente e, conseqüentemente, menor ID.

Resultado semelhante foi encontrado por Ramos *et al.* (2008), a QCT protegeu a células de hepatoma humano HepG2 dos danos ocasionados pela terc-butil hidroperóxido (t-BHP). Em outro estudo realizado em linfócitos humanos expostos a radiação gama, em que o uso da quercetina reduziu o ID em comparação ao controle positivo (SZEJK *et al.*, 2017). Outro ensaio com quercetina, as células do sangue total também foram submetidas ao teste cometa tratadas com quercetina. Nessa situação a QCT ocasionou a redução de danos ao DNA das células (TOPALOVIC *et al.*, 2018). Com isso, é possível observar que a quercetina proporciona proteção as células. Outro estudo feito por Shalini e colaboradores (2018) em que a nanoestruturação da quercetina em nanopartículas de

óxido de zinco reduziu o dano ao DNA de linfócitos do sangue periférico. A partir dos resultados apresentados, é possível sugerir que a nanoencapsulação da QCT promoveu vantagens na proteção de fibroblastos após a exposição à radiação UVA.

Figura 19 - Ensaio cometa realizado com as células L929



Fonte: Autora (2022).

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O método propiciou obtenção de CLN com parâmetros físico-químicos adequados em relação DHm, IP e PZ. Ademais, a formulação apresentou eficiência de encapsulação satisfatória, superior a 90%, além de ter apresentado estabilidade preliminar por pelo menos dois meses à temperatura ambiente e à 4°C

A nanoestruturação da quercetina possibilitou maior tolerabilidade da linhagem celular de fibroblastos à QCT e permitiu aumento significativo nos valores de viabilidade das linhagens de fibroblastos e queratinócitos na concentração de 50µg/mL. Além disso, no ensaio cometa, a quercetina nanoestruturada apresentou maior ação quimiopreventiva quando em comparação à QCT livre nos fibroblastos expostos a radiação UVA. Pelo exposto, é possível sugerir que os carreadores desenvolvidos encapsulando quercetina apresentam potencial quimiopreventivo promissor frente a radiação UVA.

Devido a pandemia pelo SARS-CoV-2, o início desse trabalho foi postergado e, conseqüentemente, alguns ensaios não puderam ser realizados. Esses ensaios são visados como perspectivas futuras:

- Avaliação morfológica dos CLN por Microscopia de Força Atômica;
- Quantificação da QCT nos CLN por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Análise de liberação *in vitro* e permeação *ex vivo* da QCT a partir dos CLN em Célula de Difusão Vertical de Franz;
- Avaliação da capacidade quimiopreventiva da formulação por meio do teste de micronúcleo.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S.; RASHIDIPOUR, M.; KHOSRAVI, P.; SHAHRYARHESAMI, S.; ASHRAFI, B.; KAVIANI, M.; MORADI SARABI, M. Biocompatibility, Cytotoxicity, Antimicrobial and Epigenetic Effects of Novel Chitosan-Based Quercetin Nanohydrogel in Human Cancer Cells. **International journal of nanomedicine**, v. 15, p. 5963–5975, 2020.
- AFRA, B.; MOHAMMADI, M.; SOLEIMANI, M.; MAHJUB, R. Preparation, Statistical Optimization, In Vitro Characterization and In Vivo Pharmacological Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles Encapsulating Propolis Flavonoids: A Novel Treatment for Skin Edema. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 46, n. 7, p. 1163-1176, 2020.
- ALMEIDA, E. D. P.; DIPIERI, L. V.; ROSSETTI, F. C.; MARCHETTI, J. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; NUNES, R. S.; SARMENTO, V. H. V.; VALERIO, M. E. G.; JUNIOR, J. J. R.; MONTALVÃO, M. M.; CORREA, C. B.; LIRA, A. A. M. Skin permeation, biocompatibility and antitumor effect of chloroaluminum phthalocyanine associated to oleic acid in lipid nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 262-273, 2018.
- AMASYA, G.; AKSU, B.; BADILLI, U.; ONAY-BESIKCI, A.; TARIMCI, N. QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 563, p. 110-121, 2019.
- ANDREA, G. D. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications. **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, 2015.
- ANGIUS, F.; FLORIS, A. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. **Toxicology in vitro**, n 29, p 314-319, 2015.
- ARALDI, R. P.; MELO, T. C.; MENDES, T. B.; JUNIOR, P. L. S.; NOZIMA, B. H. N.; ITO, E. T.; CARVALHO, R. F.; SOUZA, E. B.; STOCCO, R. C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.
- AZIZ, Z. A. A.; MOHD-NASIR, H.; AHMAD, A.; SETAPAR, S. H. M.; PENG, W. L.; CHUO, S. C.; KHATOON, A.; UMAR, K.; YAQOOB, A. A.; IBRAHIM, M. N. M. Role of Nanotechnology for Design Application in Makeup and Skin Care. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. 739, p. 1-15, 2019.
- AZQUETA, A.; LANGIE, S. A. S.; BOUTET-ROBINET, E.; DUTHIE, S.; LADEIRA, C.; MOLLER, P.; COLLINS, A. R.; GODSCHALK R. W. L. DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 781, p. 71-87, 2019.
- BAGDE, A.; PATEL, K.; MONDAL, A.; KUTLEHRIA, S.; CHOWDHURY, N.; GEBEYEHU, A.; PATEL, N.; KUMAR, N.; SINGH, M. Combination of UVB Absorbing Titanium Dioxide and Quercetin Nanogel for Skin Cancer Chemoprevention. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 240-260, 2019.

BAJPAYEE, M.; KUMAR, A.; DHAWAN, A. The Comet Assay: Assessment of In Vitro and In Vivo DNA Damage. **Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 2031, p. 237-257, 2019.

BANERJEE, I.; DE, M.; DEY, G.; BHARTI, R.; CHATTOPADHYAY, S.; ALI, N.; CHAKRABARTI, P.; REIS, R. L.; KUNDU, S. C.; MANDAL, M. A peptide-modified solid lipid nanoparticle formulation of paclitaxel modulates immunity and outperforms dacarbazine in a murine melanoma model. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 3, p. 1161-1178, 2019.

BARTEKOVA, M.; RADOSINSKA, J.; PANCZA, D.; BARANCIK, M.; RAVINGEROVA, T. Cardioprotective effects of quercetin against ischemia-reperfusion injury are age-dependent. **Physiological Research**, v. 65, n. 1, p. 101-107, 2016.

BELOQUI, A; SOLINÍS, M. Á; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A; ALMEIDA, A. J; PRÉAT, V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.

BENETOU, V.; LAGIOU, A.; LAGIOU, P. Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects. **F1000 research**, v. 4, p. 1-10, 2015.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 235, p. 337–351, 2016.

BHISE, K.; KASHAW, S. K.; SAU, S.; IYER, A. K. Nanostructured lipid carriers employing polyphenols as promising anticancer agents: Quality by design (QbD) approach. **International journal of pharmaceutics**, v. 526, n. 1-2, p. 506–515, 2017.

BIRCH-MACHIN, M. A.; BOWMAN, A. Oxidative stress and ageing. **The British Journal of dermatology**, v. 175, n. 2, p. 26-29, 2016.

BOAKYE, C; PATEL, K; DODDAPANENI, R; BAGDE, A; BEHL, G; CHOWDHURY, N; SAFE, S; SINGH, M. Ultra-flexible nanocarriers for enhanced topical delivery of a highly lipophilic antioxidative molecule for skin cancer chemoprevention. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 143, p. 156–167, 2016.

BORISOVA, M. E.; VOIGT, A.; TOLLENAERE, M. A. X.; SAHU, S. K.; JURESTSCHKE, T.; KREIM, N.; MAILAND, N.; CHOUDHARY, C.; BEKKER-JENSEN, S.; AKUTSU, M.; WAGNER, S. A.; BELI, P. p38-MK2 signaling axis regulates RNA metabolism after UV-light-induced DNA damage. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1017-1033, 2018.

BRAAFLADT, S.; REIPA, V.; ATHA, D. H. The Comet Assay: Automated Imaging Methods for Improved Analysis and Reproducibility. **Scientific reports**, v. 6, p. 32162, 2016.

CADET, J.; MOURET, S.; RAVANAT, J.; DOUKI, T. Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactons. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 5, p. 1048-1065, 2012.

CADET, J.; WAGNER, J. R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, v. 5, n. 2, p. 1-18, 2013.

CARULLO, G.; CAPPELLO, A. R.; FRATTARUOLO, L.; BADOLATO, M.; ARMENTANO, B.; AIELLO, F. Quercetin and derivatives: useful tools in inflammation and pain management. **Future medicinal chemistry**, v. 9, n. 1, p. 79-93, 2017.

CASSANO, R.; MELLACE, S.; MARRELLI, M.; CONFORTI, F.; TROMBINO, S. α -Tocopheryl linolenate solid lipid nanoparticles for the encapsulation, protection, and release of the omega-3 polyunsaturated fatty acid: in vitro anti-melanoma activity evaluation. **Colloids and Surfaces**, v. 151, p. 128-133, 2017.

CASTELLANI, S.; TRAPANI, A.; SPAGNOLETTA, A.; TOMA, L. D.; MAGRONE, T.; GIOIA, S. D.; MANDRACCHIA, D.; TRAPANI, G.; JIRILLO, E.; CONESE, M. Nanoparticle delivery of grape seed-derived proanthocyanidins to airway epithelial cells dampens oxidative stress and inflammation. **Journal of translational medicine**, v. 16, n. 1, p. 140-155, 2018.

CHAUHAN, I; YASIR, M; VERMA, M; SINGH, A. P. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 10, n. 2, p. 150–165, 2020.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 1013-1024, 2012.

CHEN-YU, G.; CHUN-FEN, Y.; QI-LU, L.; QI, T.; YAN-WEI, X.; WEI-NA, L.; GUANG-XI, Z. Development of a quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 292–298, 2012.

CHHABRA, G.; NDIAYE, M. A.; GARCIA-PETERSON, L. M.; AHMAD, N. Melanoma Chemoprevention: Current Status and Future Prospects. **Photochemistry and photobiology**, v. 93, n. 4, p. 975–989, 2017.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 697, p. 63–70, 2011.

COLLINS, A. R.; MA, A. G.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation research**, v. 336, n. 1, p. 69–77, 1995.

CORTÉS, C.; MARCOS, R. Genotoxicity of disinfection by products and disinfected waters: a review of recent literature. **Mutation Research**, v. 831, p. 1-12, 2018.

DAKER, M.; BHUVANENDRAN, S.; AHMAD, M.; TAKADA, K.; KHOO, A. S. Deregulation of lipid metabolism pathway genes in nasopharyngeal carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, n. 3, p. 731-741, 2013.

DARBAND, S. G.; KAVIANI, M.; YOUSEFI, B.; SADIGHPARVAR, S.; PAKDEL, F. G.; ATTARI, J. A.; MOHEBBI, I.; NADERI, S.; MAJIDINIA, M. Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 9, 6544-6560, 2018.

DOBREVA, M; STEFANOV, S; ANDONOVA, V. Natural Lipids as Structural Components of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Topical Delivery. **Current pharmaceutical design**, v. 26, n. 36, p. 4524-4535, 2020.

DOKTOROVOVA, S; SOUTO, E. B; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 87, n. 1, p. 1-18, 2014.

EGAMBARAM, O. P.; PILLAI, S. K.; RAY, S. S. Materials Science Challenges in Skin UV Protection: a Review. **Photochemistry and Photobiology**, p. 1-19, 2019.

EKI, T. Yeast-based genotoxicity tests for assessing DNA alterations and DNA stress responses: a 40-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 2493-2507, 2018.

ELMOWAFY, M; AL-SANEA, M. M. (2021). Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies. **Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 29, n. 9, p. 999-1012, 2021.

ESCRIBANO-FERRER, E.; REGUE, J. Q.; GARCIA-SALA, X.; MONTANES, A. B.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. In Vivo Anti-inflammatory and Antiallergic Activity of Pure Naringenin, Naringenin Chalcone, and Quercetin in Mice. **Journal of natural products**, v. 82, n. 2, p.177-182, 2019.

FAGIANI, M. A. B.; FLUMINHAN, A.; ARAÚJO, E.; REIS, L. S. L. S. Modified comet assay with Giemsa staining: a suitable method for assessing genotoxicity in rats. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 72, n. 03, 2020.

FANG, C. L; AL-SUWAYEH, S. A; FANG, J. Y. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. **Recent patents on nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2013.

FELLER, L.; KHAMMISSA, R. A. G.; KRAMER, B.; ALTINI, M.; LEMMER, J. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. **Head & face medicine**, v. 12, p. 11-18, 2016.

FERENCZYOVA, K.; KALOCAYOVA, B.; BARTEKOVA, M. Potential Implications of Quercetin and its Derivatives in Cardioprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1585-1609, 2020.

FERREIRA, K.; VALLE, A.; PAES, C. Q.; TAVARES, G. D.; PITTELLA, F. Nanostructured Lipid Carriers for the Formulation of Topical Anti-Inflammatory Nanomedicines Based on Natural Substances. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1454, 2021.

FOULKES, R.; MAN, E.; THIND, J.; YEUNG, S.; JOY, A.; HOSKINS, C. The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: current and future perspectives. **Royal Society of Chemistry**, p. 1-12, 2020.

FUENTES-LEÓN, F.; OLIVEIRA, A. P.; QUINTERO-RUIZ, N.; MUNFORD, V.; KAJITANI, G. S.; BRUM, A. C.; SCHUCH, A. P.; COLEPICOLO, P.; SANCHEZ-LAMAR, A.; MENCK, C. F. M. DNA Damage Induced by Late Spring Sunlight in Antarctica. **Photochemistry Photobiology**, p.1-19, 2020.

GARCÊS, A.; AMARAL, M. H.; LOBO, J. M. S.; SILVA, A. C. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, V. 112, p. 159-167, 2018.

GHANBARZADEH, S.; HARIRI, R.; KOUHSOLTANI, M.; SHOKRI, J.; JAVADZADEH, Y.; HAMISHEHKAR, H. Enhanced stability and dermal delivery of hydroquinone using solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces**, v. 136, p. 1004-1010, 2015.

GHANNAM, J. Y.; WANG, J.; ARIFF, J. Biochemistry, DNA Structure. **Treasure Island**, 2020.

GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Potential of Nanoparticles as Permeation Enhancers and Targeted Delivery Options for Skin: Advantages and Disadvantages. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 3271-3289, 2020.

GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLORMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2315-2336, 2016.

GOETZKE, V. Avaliação do desempenho da DSSC com a variação de parâmetros físicos - Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Pelotas, 2019.

GOINDI, S.; GULERIA, A.; AGGARWAL, N. Development and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of N-6-Furfuryl Adenine for Prevention of Photoaging. **Journal of Biomedical nanotechnology**, v. 11, n. 10, p. 1734-1746, 2015.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 133, p. 285-308, 2018.

GOTO, P. L.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, n. 1-2, p. 228-241, 2017.

GOUVÊA, M. M.; LIMA, G. S.; SILVA NETO, A. A.; NETTO, A. D. P.; MARQUES, F. F. C. Aplicação da radiação ultravioleta como forma de contribuição para a química

verde e construção de um reator fotoquímico alternativo e de baixo custo, para o pré-tratamento de amostras. **Química Nova**, n. 37, n. 2, p. 337-343, 2014.

GUERRA, K. C.; CRANE, J. S. Skin Cancer Prevention. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 3, 2020.

GURAN, M.; SANLITURK, G.; KERKUKLU, N. R.; ALTUNDAG, E. M.; YALCIN, A. S. Combined effects of quercetin and curcumin on anti-inflammatory and antimicrobial parameters in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 859, 2019.

HAWK, J. L. M. Safe, Mild Ultraviolet-B Exposure: An Essential Human Requirement for Vitamin D and Other Vital Bodily Parameter Adequacy. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, 2020.

HEDAYAT, K.; NASROLLAHI, S. A.; FIROOZ, A.; RASTEGAR, H.; DADGARNEJAD, M. Comparison of UVA Protection Factor Measurement Protocols. Clinical, **Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 351-358, 2020.

HOTAMISLIGIL, G.; DAVIS, R. J. Cell Signaling and Stress Responses. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, v. 8, n. 10, p. 1-20, 2018.

HOU, D. D.; ZHANG, W.; GAO, Y. L.; SUN, Y. Z.; WANG, H. X.; QI, R. Q.; CHEN, H. D.; GAO, X. H. Anti-inflammatory effects of quercetin in a mouse model of MC903-induced atopic dermatitis. **International immunopharmacology**, v. 74, 2019.

HUANG, S.; HU, J.; ZHU, G.; ZHANG, C. Sensitive detection of point mutation using exponential strand displacement amplification-based surface enhanced Raman spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 65, p. 191-197, 2015.

IZZO, S.; NAPONELLI, V.; BETTUZZI, S. Flavonoids as Epigenetic Modulators for Prostate Cancer Prevention. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1010-1034, 2020.

JAGER T. L.; COCKRELL, A. E.; PLESSIS, S. S. D. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 996, p. 15-23, 2017.

JAKUBCZYK, K.; DEC, K.; KALDUNSKA, J.; KAWCZUGA, D.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. **Poliski Merkuriusz lekarski**, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.

JEON, H. S.; SEO, J. E.; KIM, M. S.; KANG, M. H.; OH, D. H.; JEON, S. O.; JEONG, S. H.; CHOI, Y. W.; LEE, S. A retinyl palmitate-loaded solid lipid nanoparticle system: effect of surface modification with dicetyl phosphate on skin permeation in vitro and anti-wrinkle effect in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 452, n. 1-2, p. 311-320, 2013.

JOSE, J.; NETTO, G. Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 1, p. 315-321, 2019.

KARAPETSAS, A.; VOULGARIDOU, G.; ILIADI, D.; TSOCHANTARIDIS, I.; MICHAIL, P.; KYNIGOPOULOS, S.; LAMBROPOULOU, M.; STAVROPOULOU,

M.; STATHOPOLOU, K.; KARABOURNIOTI, S.; ALIGIANNIS, N.; GARDIKIS, K.; GALANIS, A.; PANAYIOTIDIS, M.; PAPPAS, A. Honey Extracts Exhibit Cytoprotective Properties against UVB-Induced Photodamage in Human Experimental Skin Models. **Antioxidants (Basel)**, v. 30, n. 9, p.566-592, 2020.

KASHYAP, D.; GARG, V. K.; TULI, H. S.; YERER, M. B.; SAK, K.; SHARMA, A. K.; KUMAR, M.; AGGARWAL, V.; SANDHU, S. S. Fisetin and Quercetin: Promising Flavonoids with Chemopreventive Potential. **Biomecules**, v. 9, n. 5, p. 1-22, 2019.

KASIRI, N.; RAHMATI, M.; AHMADI, L.; ESKANDARI, N.; MOTEDAYYEN, H. Therapeutic potential of quercetin on human breast cancer in different dimensions. **Inflammo pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 39-62, 2020.

KHATER, D.; NSAIRAT, H.; ODEH, F.; SALEH, M.; JABER, A.; ALSHAER, W.; AL BAWAB, A.; MUBARAK, M.S. Design, Preparation, and Characterization of Effective Dermal and Transdermal Lipid Nanoparticles: A Review. **Cosmetics**, v.8, n. 2, p. 39, 2021.

KIM, H. K. Garlic Supplementation Ameliorates UV-Induced Photoaging in Hairless Mice by Regulating Antioxidative Activity and MMPs Expression. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 70-83, 2016.

KIM, S. H.; YOO, E. S.; WOO, J. S.; HAN, S. H.; LEE, J. H.; JUNG, S. H.; KIM, H. J.; JUNG, J. Y. Antitumor and apoptotic effects of quercetin on human melanoma cells involving JNK/P38 MAPK signaling activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 860, p. 172568- 172578, 2019.

KUMAR, N.; JOSE, J. Current developments in the nanomediated delivery of photoprotective phytochemicals. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-26, 2020.

KUMAR, P.; SHARMA, G.; KUMAR, R.; SINGH, B.; MALIK, R.; KATARE, O. P.; RAZA, K. Promises of a biocompatible nanocarrier in improved brain delivery of quercetin: Biochemical, pharmacokinetic and biodistribution evidences. **International journal of pharmaceutics**, v. 515, n. 1-2, p; 307–314, 2016.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell biology and toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53–64, 2009.

KWON, K. R.; ALAM, M. B.; PARK, J. H.; KIM, T. H.; LEE, S. H. Attenuation of UVB-Induced Photo-Aging by Polyphenolic-Rich *Spatholobus Suberectus* Stem Extract Via Modulation of MAPK/AP-1/MMPs Signaling in Human Keratinocytes. **Nutrients**, v. 11, n. 6, 1341-1355, 2019.

LANDIS-PIWOWARE, K. R.; IYER, N. R. Cancer Chemoprevention: Current State of the Art. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 7, p. 19-25, 2014.

LANGIE, S. A.; AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The comet assay: past, present, and future. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 266, 2015.

LEE, W. H.; CHOI, S. H.; KANG, S. J.; SONG, C. H.; PARK, S. J.; LEE, Y. J.; KU, S. K. Genotoxicity testing of *Persicariae Rhizoma* (*Persicaria tinctoria* H. Gross) aqueous extracts. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, p. 123-134, 2016.

LIM, H. W.; ARELLANO-MENDOZA, M.; STENGEL, F. Current challenges in photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 3, p. 91-99, 2017.

LISKOVA, A.; STEFANICKA, P.; SAMEC, M.; SMEJKAL, K.; ZUBOR, P.; BIELIK, T.; BISKUPSKA-BODOVA, K.; KWON, T. K.; DANKO, J.; BUSSELBERG, D.; ADAMEK, M.; RODRIGO, L.; KRUZLIAK, P.; SHLEIKIN, A.; KUBATKA, P. Dietary phytochemicals as the potential protectors against carcinogenesis and their role in cancer chemoprevention. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 20, n. 2, p. 173-190, 2020.

LU, Y.; LIU, Y.; YANG, C. Evaluating in vitro DNA Damage Using Comet Assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 128, p. 1-6, 2017.

MAHAYE, N.; THWALA, M.; COWAN, D. A.; MUSEE, N. Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: a review. **Mutation Research**, p.1-80, 2017.

MARCHIORI, M; RIGON, C; CAMPONOGARA, C; OLIVEIRA, S. M; CRUZ, L. Hydrogel containing silibinin-loaded pomegranate oil based nanocapsules exhibits anti-inflammatory effects on skin damage UVB radiation-induced in mice. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 170, p. 25–32, 2017.

MAURYA, A.; SINGH, A. K.; MISHRA, G.; KUMARI, K.; RAI, A.; SHARMA, B.; KULKARNI, G. T.; AWASTHI, R. Strategic use of nanotechnology in drug targeting and its consequences on human health: A focused review. **Interventional Medicine & Applied Science**, v. 11, n. 1, p. 38-54, 2019.

MEDLEY, C. D.; SMITH, J. E.; WIGMAN, L. S.; CHETWYN, N. P. A DNA-conjugated magnetic nanoparticle assay for assessing genotoxicity. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p. 2233-2239, 2012.

MEYSKENS, F. L.; MUKHTAR, H.; ROCK, C. L.; CUZICK, J.; KENSLER, T. W.; YANG, C. S.; RAMSEY, S. D.; LIPPMAN, S. M.; ALBERTS, D. S. Cancer Prevention: Obstacles, Challenges, and the Road Ahead. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 2, p. 1-8, 2016.

MOLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 00, p. 1-7, 2018.

MØLLER, P; AZQUETA, A; BOUTET-ROBINET, E; KOPPEN, G; BONASSI, S; MILIĆ, M; GAJSKI, G; COSTA, S; TEIXEIRA, J. P; COSTA PEREIRA, C; DUSINSKA, M; GODSCHALK, R; BRUNBORG, G; GUTZKOW, K. B; GIOVANNELLI, L; COOKE, M. S; RICHLING, E; LAFFON, B; VALDIGLESIAS, V; BASARAN, N; LANGIE, S. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature Protocols**, v. 15, p. 3817–3826, 2020.

MOORE, M. M.; POTTENGER, L. H.; HOUSE-KNIGHT, T. Critical Review of Stryrne Genotoxicity Focused on the Mutagenicity/Clastogenicity Literature and Using Current Organization of Economic Cooperation and Development Guidance. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 60, p. 624-663, 2019.

MOSHAMMER, H.; SIMIÇ, S.; HALUZA, D. UV "Indices"- What do they Indicate?. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 10, p. 1041- 1051, 2016.

MULLENDERS, L. Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 17, n. 12, p. 1842-1852, 2018.

NAGHAVI, N.; GHODDUSI, J.; SADEGHNIA, H. R.; ASADPOUR, E.; ASGARY, S. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. **Dental materials journal**, v. 33, n. 1, p. 64–69, 2014.

NAKAJIMA, S.; KITAMURA, M. Bidirectional regulation of NF- κ B by reactive oxygen species: A role of unfolded protein response. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 162-174, 2013.

NAN, W.; DING, L.; CHEN, H.; KHAN, F. U.; YU, L.; SUI, X.; SHI, X. Topical Use of Quercetin-Loaded Chitosan Nanoparticles Against Ultraviolet B Radiation. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 826, 2018.

NAQVI, S.; PANGHAL, A.; FLORA, S. J. S. Nanotechnology: a promising approach for delivery of neuroprotective drugs. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. 494, p. 1-26, 2020.

NIRMALA, J. G; NARENDHIRAKANNAN, R. T. Vitis vinifera peel and seed gold nanoparticles exhibit chemopreventive potential, antioxidant activity and induce apoptosis through mutant p53, Bcl-2 and pan cytokeratin down-regulation in experimental animals. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 89, p. 902–917, 2017.

NOHMI, T. Thresholds of Genotoxic and Non-Genotoxic Carcinogens. **Toxicological Research**, v. 34, n. 4, p. 281-290, 2018.

NOUSHAD, M.; KANNAN, T. P.; HUSEIN, A.; ABDULLAH, H.; ISMAIL, A. R. Genotoxicity evaluation of locally produced dental porcelain--an in vitro study using the Ames and Comet assays. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 23, n. 6, p. 1145–1150, 2009.

OCA, M. K. M.; PEARLMAN, R. L.; MCCLESS, S. F.; STRICKLAND, R.; AFAQ, F. Phytochemicals for the Prevention of Photocarcinogenesis, v. 93, n. 4, p. 956-974, 2017

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research**, v. 122, n. 1, p. 86-94, 1990.

ONG, Y. S; SAIFUL YAZAN, L; NG, W. K; ABDULLAH, R; MUSTAPHA, N. M; SAPUAN, S; FOO, J. B; TOR, Y. S; HOW, C. W; ABD RAHMAN, N; ZAKARIAL ANSAR, F. H. Thymoquinone loaded in nanostructured lipid carrier showed enhanced anticancer activity in 4T1 tumor-bearing mice. **Nanomedicine (London, England)**, v. 13, n. 13, p. 1567–1582, 2018.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PACHOLCZYK, M.; CZERNICKI, J.; FERENC, T. The effect of solar ultraviolet radiation (UVR) on induction of skin cancers. **Medycyna pracy**, v. 67, n. 2, p. 255-266, 2016.

PALLIYAGE, G. H; HUSSEIN, N; MIMLITZ, M; WEEDER, C; ALNASSER, M; SINGH, S; EKPENYONG, A; TIWARI, A. K; CHAUHAN, H. Novel Curcumin-Resveratrol Solid Nanoparticles Synergistically Inhibit Proliferation of Melanoma Cells. **Pharmaceutical research**, v. 38, n. 5, p. 851–871, 2021.

PALLIYAGE, G. H; SINGH, S; ASHBY, C. R; TIWARI, A. K; CHAUHAN, H. Pharmaceutical Topical Delivery of Poorly Soluble Polyphenols: Potential Role in Prevention and Treatment of Melanoma. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 250, 2019.

PALMIERI, M.G.S.; FERREIRA, K.C.B.; VALLE, A.B.C.S.; ALEIXO, D.T.; TAVARES, G.D.; CORRÊA, J.O.A.; PITTELLA, F. Development of nanostructured lipid carriers containing finasteride. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v. 2, n. 1, p. 20-27, 2020

PANG, B.; XU, X.; LU, Y.; JIN, H.; YANG, R.; JIANG, C.; SHAO, D.; LIU, Y.; SHI, J. Prediction of new targets and mechanisms for quercetin in the treatment of pancreatic cancer, colon cancer, and rectal cancer. **Food & Function**, v. 10, n. 9, p. 5339-5349, 2019.

PETRUCK, G.; GIUDICE, R. D.; RIGANO, M. M.; MONTI, D. M. Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, V. 2018, P. 1-11, 2018.

PHILLIPS, D. H.; ARLT, V. M. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**, v. 1, p. 87-110, 2009.

PIBERGER, A. L.; KRUGER, C. T.; STRAUCH, B. M.; SCNEIDER, B.; HARTWIG, A. BPDE-induced genotoxicity: relationship between DNA adducts, mutagenicity in the in vitro PIG-A assay, and the transcriptional response to DNA damage in TK6 cells. **Genotoxicity and Carcinogenicity**, v. 92, p. 541-551, 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicine Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PRASAD, R. R.; PAUDEL, S.; RAINA, K.; AGARWAL, R. Silibinin and non-melanoma skin cancers. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 10, n. 3, p. 236-244, 2020.

PUGLIA, C.; SANTONOCITO, D. Cosmeceuticals: Nanotechnology-Based Strategies for the Delivery of Phytocompounds. **Current Pharmaceutical design**, v. 25, n. 21, p. 2314-2322, 2019.

QUINET, A.; CARVAJAL-MALDONADO, D.; LEMACON, D.; VINDIGNI, A. DNA Fiber Analysis: Mind te Gap. **Methods in Enzymology**, v. 591, p. 55-82, 2017.

RAFIQ, R. A; QUADRI, A; NAZIR, L. A; PEERZADA, K; GANAI, B. A; TASDUQ, S. A. A Potent Inhibitor of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) and Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase Signalling, Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-Pentahydroxyflavone) Promotes Cell Death in Ultraviolet (UV)-B-Irradiated B16F10 Melanoma Cells. **PLoS one**, v. 10, n. 7, p. e0131253, 2015.

RAMOS, A. A.; LIMA, C. F.; PEREIRA, M. L.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. **Toxicology letters**, 177(1), 66–73, 2008.

RAUF, A.; IMRAN, M.; KHAN, I. A.; UR-REHMAN, M.; GILANI, S. A.; MEHMOOD, Z.; MUBARAK, M. S. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. **Phytotherapy research**, v. 32, n. 11, p. 2109-2130, 2018.

RIBEIRO, D. A.; YUJRA, V. Q.; SILVA, V. H. P.; CLAUDIO, S. R.; ESTADELLA, D.; VIANA, M. B.; OSHIMA, C. T. F. Putative mechanisms of genotoxicity induced by fluoride: a comprehensive review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 18, p. 15254-15259, 2017.

RICHA; SINHA, R. P.; HADER, D. Physiological Aspects of UV-Excitation of DNA. **Topics in Current Chemistry**, v. 356, p. 203-248, 2014.

RIZEQ, B.; GUPTA, I.; ILESANMI, J.; ALSAFRAN, M.; RAHMAN, M.; OUHTIT, A. The Power of Phytochemicals Combination in Cancer Chemoprevention. **Journal of Cancer**, v. 11, n. 15, p. 4521-4533, 2020.

ROCHA, V.; MARQUES, C.; FIGUEIREDO, J. L.; GAIO, A. R.; COSTA, P. C.; LOBO, J. M. S.; ALMEIDA, I. F. In vitro cytotoxicity evaluation of resveratrol-loaded nanoparticles: Focus on the challenges of in vitro methodologies. **Food and chemical toxicology**, v. 103, p. 214-222, 2017.

ROY S. Impact of UV Radiation on Genome Stability and Human Health. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 996, p. 207–219, 2017.

ROY, S. Impact of UV Radiation on Genome Stability and Human Health. **Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment, Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 996, p. 207-219, 2017.

RUSSO, A.; PACCHIEROTTI, F.; CIMINI, D.; GANEM, N. J.; GENESCA, A.; NATARAJAN, A. T.; PAVANELLO, S.; VALLE, G.; DEGRASSI, F. Genomic Instability: Crossing Pathways at the Origin of Structural and Numerical Chromosome Changes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 56, n. 7, p. 563-580, 2015.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Natural products as photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 47-63, 2015.

SALA, M.; DIAB, R.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 35, n. 1-2, p. 1-17, 2018.

SAPINO, S.; UGAZIO, E.; GASTALDI, L.; MILETTO, I.; BERLIER, G.; ZONARI, D.; OLIARO-BOSSO, S. Mesoporous silica as topical nanocarriers for quercetin: characterization and in vitro studies. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 89, p. 116-125, 2015.

SCHUCH, A. P.; GARCIA, C. C. M.; MAKITA, K.; MENCK, C. F. M. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 12, n. 8, p. 1259-1272, 2013.

SGUIZZATO, M.; ESPOSITO, E.; CORTESI, R. Lipid-Based Nanosystems as a Tool to Overcome Skin Barrier. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, p.8319, 2021.

SHAFABAKHSH, R.; ASEMI, Z. Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. **Journal of Ovarian Research**, v. 12, n. 1, p. 55-64, 2019.

SHALINI, D.; SENTHILKUMAR, S.; RAJAGURU, P. Effect of size and shape on toxicity of zinc oxide (ZnO) nanomaterials in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 28, n. 2, p. 87-94, 2018.

SHIN, E. J.; LEE, J. S.; HONG, A.; LIM, T. G.; BYUN, S. Quercetin Directly Targets JAK2 and PKC δ and Prevents UV-Induced Photoaging in Human Skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5262-5273, 2019.

SIDDIQUI, I. A.; BHARALI, D. J.; NIHAL, M.; ADHAMI, V. M.; KHAN, N.; CHAMCHEU, J. C.; KHAN, M. I.; SHABANA, S.; MOUSA, S. A.; MUKHTAR, H. Excellent anti-proliferative and pro-apoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate encapsulated in chitosan nanoparticles on human melanoma cell growth both in vitro and in vivo. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 10, n. 8, p. 1619-1626, 2014.

SILVA, L. S. B.; PERASOLI, F. B.; CARVALHO, K. V.; VIEIRA, K. M.; LOPES, M. T. P.; SOUZA, G. H. B.; SANTOS, O. D. H. Melaleuca leucadendron L. flower exhibits antioxidant and photoprotective activities in human keratinocytes exposed to ultraviolet B radiation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 159, p. 54-65, 2020.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cell. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p.184-191, 1988.

SINGH, V.; SINGH, R.; KUJUR, P. K.; SINGH, R. P. Combination of Resveratrol and Quercetin Causes Cell Growth Inhibition, DNA Damage, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Oral Cancer Cells. **Assay and drug development technologies**, v. 18, n. 5, p. 226–238, 2020.

SIQUEIRA, W. N. Estudo do efeito radioprotetor do flavonóide quercetina sobre linfócito humanos - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Recife, Pernambuco, 2013.

SONDENHEIMER, K.; KRUTMANN, J. Novel means for photoprotection. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. 162, p. 1-5, 2019.

SOUTO, E. B.; FANGUEIRO, J. F.; FERNANDES, A. R.; CANO, A.; SANCHEZ-LOPEZ, E.; GARCIA, M. L.; SEVERINO, P.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V.; SILVA, A. M. Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08938, 2022.

SOUZA, A. C. F.; YUJRA, V. Q.; PISANI, L. P.; VIANA, M. B.; CASTRO, G. M.; RIBEIRO, D. A. The Use of Single-Cell Comet Assay on Oral Cells: A Critical Review. **Anticancer Research**, v. 39, p. 4011-4017, 2019.

SOUZA, Rebeca Oliveira de; FONSECA, Maria José Vieira. Avaliação in vitro e in vivo da atividade fotoquimioprotetora da fração de *Byrsonima crassifolia* e da (+)-catequina contra os danos induzidos pela radiação UVB. 2015. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; SOLEY, B. S.; MELLO-SAMPAYO, C.; CABRINI, D. A.; CORRER, M. F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

SRIVASTAVA, S.; SOMASAGARA, R. R.; HEGDE, M.; NISHANA, M.; TADI, S. K.; SRIVASTAVA, M.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S. C. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24049-24052, 2016.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 71-77, 2014.

STEWART, W. P.; BROWN, K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. **British Journal of Cancer**, n. 109, v. 1, p. 1-7, 2013.

STOCKERT, J. C.; BLAZQUEZ-CASTRO, A.; CANETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, n 114, p. 785-796, 2015.

STURZA, A.; PAVEL, I.; ANCUŞA, S.; DANCIU, C.; DEHELEAN, C.; DUICU, O.; MUNTEAN, D. Quercetin exerts an inhibitory effect on cellular bioenergetics of the B16A5 murine melanoma cell line. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 447, n. 1-2, p. 103–109, 2018.

SUN, X.; ZHANG, N.; YIN, C.; ZHU, B.; LI, X. Ultraviolet Radiation and Melanomagenesis: From Mechanism to Immunotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. 951, p. 1-15, 2020.

SUNDARAM, M. K.; RAINA, R.; AFROZE, N.; BAJBOUJ, K.; HAMAD, M.; HAQUE, S.; HUSSAIN, A. Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 8, p. 1-17, 2019.

SUOZZI, K.; TURBAN, J.; GIRARDI, M. Cutaneous Photoprotection: A Review of the Current Status and Evolving Strategies. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 93, p. 55-67, 2020.

SUVARNA, C.; CHAITANYA, N. C.; AMEER, S.; INAMDAR, P.; ALUGUBELLI, S.; BHAGYANAGAR, A. Chemopreventive Agents in Oral Premalignancy: A Medical Management Review. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 10, n. 2, p. 127-133, 2020.

SZEJK, M.; POPLAWSKI, T.; CZUBATKA-BIENKOWSKA, A.; OLEJNIK, A. K.; PAWLACZYK-GRAJA, I.; GANCARZ, R.; ZBIKOWSKA, H. M. A comparative study on the radioprotective potential of the polyphenolic glycoconjugates from medicinal plants of Rosaceae and Asteraceae families versus their aglycones. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 171, p. 50–57, 2017.

TEKADE, R. K.; MAHESHWARI, R.; TEKADE, M.; CHOUGULE, M. B. Solid Lipid Nanoparticles for Targeting and Delivery of Drugs and Genes. **Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes**, P. 257-281, 2017

TESKAC, K.; KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 390, n. 1, p. 61-69, 2010.

THANKAM, F. G.; MUTHU, J. Infiltration and sustenance of viability of cells by amphiphilic biosynthetic biodegradable hydrogels. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 25, n. 8, p. 1953–1965, 2014.

THIESEN, L. C.; BACCARIN, T.; FISCHER-MULLER, A. F.; MEYRE-SILVA, C.; COUTO, A. G.; BRESOLIN, T. M.; SANTIN, J. R. Photochemoprotective effects against UVA and UVB irradiation and photosafety assessment of Litchi chinensis leaves extract. **Journal of photochemistry and photobiology**, v. 167, p. 200-207, 2017.

TOPALOVIĆ, D.; DEKANSKI, D.; SPREMO-POTPAREVIĆ, B.; DJELIĆ, N.; BAJIĆ, V.; ŽIVKOVIĆ, L. Assessment of adrenaline-induced DNA damage in whole blood cells with the comet assay. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 69, n. 4, p. 304–308, 2018.

TUPAL, A.; SABZICHI, M.; RAMEZANI, F.; KOUHSOLTANI, M.; HAMISHEHKAR, H. Dermal delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of skin cancer. **Journal of microencapsulation**, v. 33, n. 4, p. 372-380, 2016.

TURKEZ, H.; ARSLAN, M. E.; OZDEMIR, O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 10, p. 1089-1098, 2017.

UMEZAWA, S.; HIGURASHI, T.; KOMIYA, Y.; ARIMOTO, A.J.; HORITA, N.; KANEKO, T.; IWASAKI, M.; NAKAGAMA, H.; NAKAJIMA, A. Chemoprevention of colorectal cancer: Past, present, and future. **Cancer Science**, v. 110, n. 10, p. 3018-3026, 2019.

UZARSKA, M.; CZAJKOWSKI, R.; SCHWARTZ, R. A.; BAJEK, A.; ZEGARSKA, B.; DREWA, T. Chemoprevention of skin melanoma: facts and myths. **Melanoma research**, v. 23, n. 6, p. 426–433, 2013.

VAIDYA, B.; CHO, S. Y.; OH, K. S.; KIM, S. H.; KIM, Y. O.; JEONG, E. H.; NGUYEN, T. T.; KIM, S. H.; KIM, I. S.; KWON, J.; KIM, D. Effectiveness of Periodic Treatment of Quercetin against Influenza A Virus H1N1 through Modulation of Protein Expression. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 21, p. 4416-4425, 2016.

VANTI, G.; MUTI, L.; D'AMBROSIO, M.; GRIFONI, L.; BERGONZI, M. C.; LUCERI, C.; BILIA, A. R. Nanostructured Lipid Carriers Can Enhance Oral Absorption of Khellin, a Natural Pleiotropic Molecule. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 24, p. 7657, 2021.

VILLALBA-CAMPOS, M.; CHUAIRE-NOACK, L.; SÁNCHEZ-CORREDOR, M. C.; RONDÓN-LAGOS, M. High chromosomal instability in workers occupationally exposed to solvents and paint removers. **Molecular cytogenetics**, v. 9, p. 46, 2016.

VINAYAK, M.; MAURYA, A. K. Quercetin Loaded Nanoparticles in Targeting Cancer: Recent Development. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 1560-1576, 2019.

WALCZAK, K.; MARINIAK, S.; RAJTAR, G. Cancer chemoprevention – selected molecular mechanisms. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 71, n. 0, p. 149-161, 2017.

WARD, A. B.; MIR, H.; KAPUR, N.; GALES, D. N.; CARRIERE, P. P.; SINGH, S. Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways. **World journal of surgical oncology**, v. 16, n. 1, p. 108-120, 2018.

XINGYT, Z.; PEIJIE, M.; DAN, P.; YOUNG, W.; DAOJUN, W.; XINZHENG, C.; XIJUN, Z.; YANGRONG, S. Quercetin suppresses lung cancer growth by targeting Aurora B kinase. **Cancer medicine**, v. 5, n. 11, p. 3156-3165, 2016.

XU, D.; HU, M.; WANG, Y.; CUI, Y. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. **Molecules**, v. 24, n.6, p. 1123-1138, 2019.

YU, Y. Q.; YANG, X.; WU, X. F.; FAN, Y. B. Enhancing Permeation of Drug Molecules Across the Skin via Delivery in Nanocarriers: Novel Strategies for Effective Transdermal Applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 9, p. 646554, 2021.

ZHANG, J.; XIAO, X.; ZHU, J.; GAO, Z.; LAI, X.; ZHU, X.; MAO, G. Lactoferrin- and RGD-comodified, temozolomide and vincristine-co-loaded nanostructured lipid carriers for gliomatosis cerebri combination therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 3039–3051, 2018.

ZHENG, Y. Y.; VISWANATHAN, B; KESARWANI, P; MEHROTRA, S. Dietary agents in cancer prevention: an immunological perspective. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n. 5, p. 1083–1098, 2012.

ZHOU, Q.; XI, S. A review on arsenic carcinogenesis: Epidemiology, metabolism, genotoxicity and epigenetic changes. **Regulatory toxicology and Pharmacology**, p. 1-60, 2018.