

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Raiane Rosales Diniz

**O USO DE DIFERENTES FONTES DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DE SUBSTÂNCIAS
FOTOPROTETORAS EM *Saccharomyces cerevisiae***

Rio de Janeiro

2019

Raiane Rosales Diniz

**O USO DE DIFERENTES FONTES DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DE SUBSTÂNCIAS
FOTOPROTETORAS EM *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Katia Christina Leandro

Co-orientador: Marcelo de Pádula

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Diniz, Raiane

O uso de diferentes fontes de irradiação ultravioleta na avaliação da eficácia e segurança de substâncias fotoprotetoras em *Saccharomyces cerevisiae*. / Raiane Diniz. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

92 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadora: Katia Christina Leandro.

Co-orientador: Marcelo de Pádula.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Fotoprotetores. 3. Controle de qualidade.
4. Fotomutagênese. 5. Eficácia e segurança.

The use of different UV irradiation sources in the efficacy and safety assessment of photoprotective substances in *Saccharomyces cerevisiae*.

Raiane Rosales Diniz

**O USO DE DIFERENTES FONTES DE IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA
AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DE SUBSTÂNCIAS
FOTOPROTETORAS EM *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fabio Coelho Amendoeira (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Mônica Freiman de Souza Ramos (Doutor)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Katia Christina Leandro (Doutor) - Orientadora

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marcelo de Pádula (Doutor) – Co-orientador

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico este trabalho àqueles que sempre acreditaram em mim, me deram força e apoio nessa jornada. Aos meus pais e a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela saúde, pela força e pelo privilégio de estar realizando esse sonho.

À minha mãe Andréa e ao meu pai Ricardo, pelos ouvidos, pelas orações, pela paciência, pelo carinho e por terem vivido junto comigo essa minha conquista.

À minha vó Léa, vô Ademar e tia-avó Sildileca, que sempre foram os meus maiores “fãs”.

Ao meu namorado e melhor amigo Felipe, que com sua serenidade e leveza me confortou quando me encontrava aflita e estressada.

À minha orientadora Katia por toda ajuda, oportunidades e carinho nessa etapa da minha vida, e ao meu orientador Marcelo, por ser fundamental no meu desenvolvimento acadêmico e intelectual, não só durante o mestrado, como também durante toda a graduação.

À Alicia Viviana, minha orientadora na Iniciação Científica, que em reuniões incansáveis desde 2012, me ensinou tudo sobre confecção de pôsteres, apresentações de slides e técnicas de apresentação oral. Agradeço pela ajuda, também, com as análises estatísticas.

À Juliana Paiva por toda amizade dentro e fora do laboratório. Às alunas de Iniciação Científica Victória e Juliana Brito pela ajuda na bancada. À Bianca pela sede de conhecimento e pronta disponibilidade. À Janine, Rita e Cláudia pelo carinho e pela amizade. À Professora Elisabete por colaborar com as substâncias fotoprotetoras.

Às meninas da Secretaria de Pós-Graduação, Jessica, Samela, Gisele e Goretti, pela paciência e ajuda. E aos meus amigos de turma de pós-graduação 2017.1.

Ao INCQS/FIOCRUZ, CAPES, CNPq, FAPERJ e UFRJ, por me proporcionarem essa experiência incrível.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

Embora existam diversos ensaios propostos para avaliar o potencial fototóxico de compostos químicos, seus respectivos modelos celulares são altamente sensíveis a radiação ultravioleta B (UVB) que, por sua vez, é constantemente evitada e reduzida dos espectros de irradiação. Além disso, as taxas de dose e os tempos de irradiação desses testes não são, na maioria das vezes, compatíveis a exposições ambientais usuais da população. Nesse sentido, *Saccharomyces cerevisiae* tem se mostrado uma interessante ferramenta para prever o potencial fotomutagênico de diversos compostos, incluindo de substâncias usadas em formulações cosméticas de protetores solares. Cepas de *S. cerevisiae* podem suportar doses ambientais de UVB compatíveis a exposições diárias à luz solar natural, viabilizando o uso de fontes de irradiação que mimetizam fielmente as condições externas da luz solar. Neste trabalho, foram usadas 4 cepas de *S. cerevisiae* (FF18733, CD138, AWP001 e LPW002) sensíveis à radiação ultravioleta A (UVA), UVB e a Luz Solar Simulada (LSS) para avaliar a aplicabilidade das mesmas como potenciais bioindicadores para eficácia e segurança no desenvolvimento de fotoprotetores, para cada uma das fontes de irradiação. O potencial bioindicador das cepas foi avaliado a partir do emprego de substâncias fotoprotetoras amplamente utilizadas em fotoprotetores: octil metoxicinamato, octocrileno e dióxido de titânio. A cepa que melhor indicou o potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico, tanto para a fonte de irradiação UVA quanto para UVB foi a cepa AWP001 (*yno1*). Para a LSS, a cepa LPW002 (*ogg1yno1*) foi a eleita para indicar o potencial fotoprotetor, enquanto a cepa AWP001 (*yno1*) foi, mais uma vez, a escolhida para indicar o potencial foto/antifotomutagênico dos fotoprotetores. Por essa razão, as cepas AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) mostraram-se promissores modelos experimentais para compor este ensaio. Dessa forma, o conjunto de resultados evidenciou um conjunto de cepas de *S. cerevisiae* particularmente útil para a avaliação do potencial fotoprotetor (indicando eficácia) e foto/antifotomutagênico (indicando segurança) de filtros UV, atendendo a demanda de indústrias e agências regulatórias por testes de *screening* eficientes e robustos, visando desenvolver produtos de qualidade e seguros aos consumidores.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Fotoprotetores. Controle de Qualidade. Fotomutagênese. Eficácia. Segurança.

ABSTRACT

Although there are several suggested assays to evaluate the phototoxic potential of chemicals, their cell models are highly sensitive to ultraviolet B radiation (UVB), which is constantly avoided. In addition, their dose rate and irradiation exposure time are not compatible with the environmental conditions. In this sense, *Saccharomyces cerevisiae* has already proved to be an interesting tool to predict photomutagenic potential of several compounds, including sunscreens. Yeast can support environmental UVB doses compatible with human daily exposure to sunlight, allowing the use of irradiation sources to faithfully mimic the external conditions of ambient sunlight. Herein, it was used a set of *S. cerevisiae* mutant strains sensitive to ultraviolet A radiation (UVA), UVB and Solar Simulated Light (LSS) in order to evaluate if these strains would be useful as potential bioindicators for sunscreen development for each ultraviolet source tested in this study. The bioindicator potential of the strains was tested with the widely-used octyl methoxycinnamate, octocrylene and titanium dioxide. The strain that best indicated the photoprotective and photo/antiphotomutagenic potential for both UVA and UVB irradiation source was AWP001 (*yno1*) strain. For LSS, LPW002 (*ogglyno1*) strain was the chosen strain to indicate the photoprotective potential of the UV filters, while AWP001 strain (*yno1*) was, once again, chosen to indicate photo/antiphotomutagenic potential. In this reason, AWP001 (*yno1*) and LPW002 (*ogglyno1*) strains tested in this study stood out as promising experimental tools for the validation of this assay. These results evidenced a set of *S. cerevisiae* strains particularly useful for evaluating the photoprotective (efficacy) and photo/antiphotomutagenic (safety) potential of UV filters, meeting the industries and regulatory agencies demand for robust and efficient screening tests.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae*. Sunscreens. Quality Control. Photomutagenesis. Efficacy. Safety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espectro da radiação ultravioleta.....	15
Figura 2 – Representação esquemática da interação da radiação UV com o DNA e seus efeitos diretos e indiretos.	17
Figura 3 – Fotoprodutos originados no DNA após exposição do DNA à radiação UV.....	19
Figura 4 – Representação da lesão oxidativa 8-oxoG e a transversão GC → TA.....	21
Figura 5 – Efeitos biológicos gerados pela ação de agentes exógenos e endógenos sobre o DNA e a influência dos sistemas de reparo celular.....	23
Figura 6 – Reparo por excisão de bases (BER) e Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	25
Figura 7 – Foto do Simulador Solar ORIEL/NEWPORT® emitindo Luz Solar Simulada (LSS) e representação esquemática dos seus compartimentos internos.....	46
Quadro 1 – Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usadas no estudo	47
Figura 8 – Fluxograma da metodologia do estudo	48
Figura 9 – Preparo inicial, comum a todos os experimentos, da suspensão celular.....	50
Figura 10 – Esquema da metodologia para avaliação da citotoxicidade em levedura das substâncias testadas	53
Figura 11 – Irradiação das cepas com diferentes fontes de radiação, com e sem tratamento com as substâncias fotoprotetoras testadas e metodologia para avaliação da sobrevivência celular e mutagênese após irradiação	54
Figura 12 – Perfil de letalidade/sobrevivência de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após irradiação com radiação ultravioleta A (UVA).....	58
Figura 13 – Perfil de letalidade/sobrevivência de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após irradiação com radiação ultravioleta B (UVB)	61
Figura 14 – Perfil de letalidade/sobrevivência de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS) emitida por um simulador solar	64
Figura 15 – Citotoxicidade no escuro de substâncias fotoprotetoras na cepa AWP001 (<i>yno1</i>)	67
Figura 16 – Citotoxicidade no escuro de substâncias fotoprotetoras na cepa LPW002 (<i>ogg1yno1</i>).....	67
Figura 17 – Diversas possibilidades de desfechos das características de uma substância fotoprotetora testada na Fase 3 e suas respectivas classes de grau de risco	69

Figura 18 – Sobrevivência da cepa AWP001 (<i>yno1</i>) após irradiação com ultravioleta A, na presença e na ausência de TiO ₂	70
Figura 19 – Mutagênese na dose letal 63% (DL ₆₃) da cepa AWP001 (<i>yno1</i>) após irradiação com ultravioleta A (UVA), na presença e na ausência de TiO ₂	71
Figura 20 – Sobrevivência da cepa AWP001 (<i>yno1</i>) após irradiação com ultravioleta B (UVB), na presença e na ausência de substâncias fotoprotetoras.....	72
Figura 21 – Mutagênese na dose letal 63% (DL ₆₃) da cepa AWP001 (<i>yno1</i>) após irradiação com ultravioleta B (UVB), na presença e na ausência de substâncias fotoprotetoras.....	73
Figura 22 – Sobrevivência da cepa LPW002 (<i>ogg1yno1</i>) após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS), na presença e na ausência de substâncias fotoprotetoras	74
Figura 23 – Mutagênese na dose letal 63% (DL ₆₃) da cepa AWP001 (<i>yno1</i>) após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS), na presença e na ausência de substâncias fotoprotetoras	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns filtros ultravioleta (UV) permitidos e comumente usados em formulações fotoprotetoras e suas respectivas faixas de absorção majoritária.....	27
Tabela 2 – Métodos exigidos para avaliação da eficácia dos protetores solares.....	30
Tabela 3 – Alguns exemplos de testes de fototoxicidade, mutagenicidade/genotoxicidade, suas variações, desfechos avaliados, princípios e limitações	33
Tabela 4 – Variações das taxas de dose de ultravioleta A e ultravioleta B da radiação solar em um dia de sol de verão na cidade do Rio de Janeiro/RJ no período de 10:00-16:00 h.....	55
Tabela 5 – Doses de ultravioleta A (UVA), ultravioleta B (UVB) e UVA+UVB contidos na Luz Solar Simulada (LSS) e seus respectivos tempos de irradiação.....	56
Tabela 6 – Mutagênese espontânea, induzida e incremento relativo de mutagênese de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na DL ₆₃ após irradiação com ultravioleta A (UVA).....	59
Tabela 7 – Mutagênese espontânea, induzida e incremento relativo de mutagênese de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na DL ₆₃ após irradiação com ultravioleta B (UVB)	62
Tabela 8 – Mutagênese espontânea, induzida e incremento relativo de mutagênese de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na DL ₆₃ após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS)	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-4PPs – fotoprodutos 6-4 pirimidina pirimidona

8-oxoG – lesão 7,8-di-hidro-8oxoguanina

$^1\text{O}_2$ – oxigênio singlete

$\cdot\text{OH}$ – radical hidroxila

BER – reparo por excisão de bases

CAN1 – gene da arginina permease

Can^R – mutantes resistentes à canavanina

CPDs – dímeros de pirimidina ciclobutano

DL₆₃ – Dose Letal 63%

DNA – ácido desoxirribonucléico

ERO – espécies reativas de oxigênio

FDA – *Food and Drug Administration*

GLC – golpe letal por célula

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IV – radiação infravermelha

IWGTP – *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*

LSS – luz solar simulada

NER – reparo por excisão de nucleotídeos

NOX – NADPH-oxidase

O₂^{•-} – radical superóxido

OCR – octocrileno

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

Ogg1 – 8oxoG-DNA glicosilase

OMC – octil metoxicinamato

sítios AP – sítios abásicos, apurínicos ou apirimidínicos

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

TiO₂ – dióxido de titânio

UV – ultravioleta

UVA – ultravioleta A

UVB – ultravioleta B

UVC – ultravioleta C

Vis – radiação visível

YNBD – *yeast nitrogen base*

Yno1 – yeast NADPH-oxidase

YPG – *yeast Peptone Glucose*

ZnO – óxido de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A radiação ultravioleta.....	15
1.1.1 Os efeitos da radiação ultravioleta.....	16
1.1.2 Aspectos fotobiológicos das radiações UVA e UVB	18
1.1.2.1 Formação direta de lesões no DNA pela radiação UV.....	19
1.1.2.2 Formação indireta de dano oxidativo no DNA pela radiação UV.....	20
1.2 Conceitos em mutagênese e genotoxicidade	21
1.3 Sistemas de reparo e tolerância celular	22
1.3.1 Reparo por Excisão de Bases (BER) e de Nucleotídeos (NER).....	23
1.4 Fotoproteção contra os efeitos da radiação UV	25
1.4.1 Controvérsias quanto às formulações fotoprotetoras	28
1.4.2 Aspectos relacionados a eficácia e a segurança de fotoprotetores: avaliação de risco... 29	
1.5 Testes <i>in vitro</i> de fototoxicidade, fotomutagênese e fotogenotoxicidade.....	31
1.5.1 Considerações sobre os ensaios de fotogenotoxicidade/fotomutagenicidade: <i>International Workshop on Genotoxicity Test Procedures Working Group (IWGTP)</i>	35
1.6 O emprego de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em estudos <i>in vitro</i>	38
1.6.1 As cepas mutantes <i>ogg1</i> , <i>yno1</i> e <i>ogg1yno1</i>	41
1.7 Justificativa e relevância à luz da vigilância sanitária	42
2 OBJETIVO	43
2.1 Objetivo geral.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3 METODOLOGIA.....	44
3.1 Material	44
3.1.1 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
3.1.2 Meios de cultivo	45
3.1.3 Fontes de radiação ultravioleta	45
3.1.4 Substâncias fotoprotetoras	47
3.2 Métodos	47
3.2.1 Fase 1: Determinação das condições de irradiação	49
3.2.2 Fase 1: Determinação da letalidade e mutagênese induzida pelas fontes de radiação ...	49
3.2.3 Fase 2: Citotoxicidade e mutagenicidade no escuro das substâncias fotoprotetoras testadas em <i>S. cerevisiae</i>	52

3.2.4 Fase 3: Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pelas fontes de radiação na presença das substâncias fotoprotetoras	53
3.2.5 Tratamento estatístico.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Determinação das condições de irradiação	55
4.2 Determinação da letalidade e mutagênese induzida pelas fontes de radiação.....	57
4.2.1 Determinação da letalidade/sobrevivência e mutagênese induzida pelo UVA	57
4.2.2 Determinação da letalidade/sobrevivência e mutagênese induzida pelo UVB	61
4.2.3 Determinação da letalidade/sobrevivência e mutagênese induzida pela LSS	63
4.3 Citotoxicidade e mutagenicidade no escuro das substâncias fotoprotetoras testadas em <i>s. cerevisiae</i>	66
4.4 Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pelas fontes de radiação na presença das substâncias fotoprotetoras	68
4.4.1 Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pela radiação UVA na presença das substâncias fotoprotetoras	69
4.4.2 Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pela radiação UVB na presença das substâncias fotoprotetoras	71
4.4.3 Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pela exposição à LSS na presença das substâncias fotoprotetoras	74
4.5 Eleição do(s) melhor(es) sistema(s) cepa-fonte para avaliar eficácia e segurança de fotoproteção de substâncias fotoprotetoras em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	77
5 CONCLUSÃO.....	79
6 PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE A - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DO TiO₂ EUSOLEX T AVALIADO A PARTIR DA TÉCNICA DE DLS (DLS) USANDO O EQUIPAMENTO ZETASIZER NANO S90 (MALVERN INSTRUMENTS, MALVERN, UK).....	92

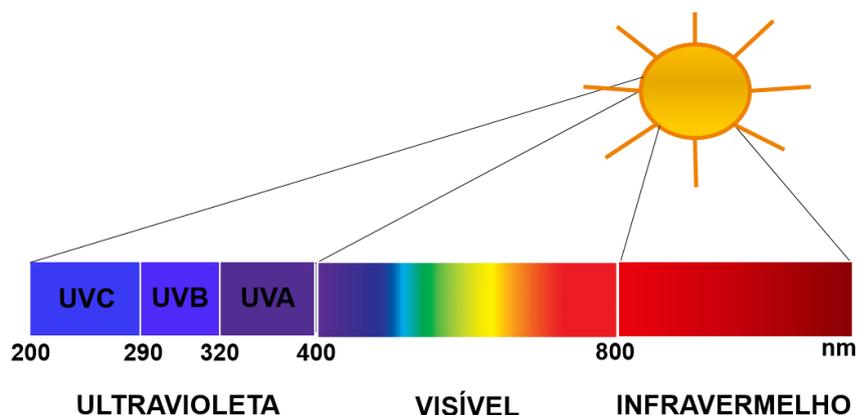
1 INTRODUÇÃO

1.1 A radiação ultravioleta

O sol é responsável por produzir uma ampla quantidade de energia que compreende desde radiações de alto grau energético, como a radiação X, cósmica e gama, até radiações menos energéticas, tais como a radiação ultravioleta (UV), visível (Vis) e infravermelha (IV). As radiações cujo espectro é mais energético, tais como os raios cósmicos, gama e X são refletidos ou absorvidos completamente pela atmosfera que envolve o planeta Terra, não atingindo a superfície terrestre (HOLICK, 2016). Nesse sentido, a luz solar que efetivamente atinge a superfície terrestre é composta pela radiação UV, Vis e IV. A radiação IV (comprimento de onda - $\lambda > 800$ nm), é percebida sob a forma de calor; a radiação Vis ($\lambda = 400 - 800$ nm), por meio das diferentes cores detectadas pelo sistema óptico e a radiação UV ($\lambda = 290 - 400$ nm), por meio de reações fotoquímicas e fotobiológicas (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007).

A radiação UV do espectro eletromagnético, por sua vez, é subdividida em três bandas denominadas ultravioleta A (UVA), ultravioleta B (UVB) e ultravioleta C (UVC). A região do UVA compreende os comprimentos de onda de 320 a 400 nm, o UVB de 290 a 320 nm e o UVC de 200 a 290 nm (DIFFEY, 1991), como representado ilustrativamente na Figura 1.

Figura 1 - Espectro da radiação ultravioleta



Esquema ilustrativo do espectro emitido pelo sol formado pelas radiações infravermelha (IV) (comprimento de onda $\lambda > 800$ nm), visível (Vis) ($\lambda = 400-800$ nm) e ultravioleta (UV) ($\lambda = 200-400$ nm). Subdivisão da radiação ultravioleta em ultravioleta A (UVA) ($\lambda = 320-400$ nm), ultravioleta B (UVB) ($\lambda = 290-320$) e ultravioleta C (UVC) ($\lambda = 200-290$).

Fonte: (Do autor, adaptado de DIFFEY, 1991).

A radiação UVC é totalmente absorvida pela camada de ozônio e não atinge a superfície da Terra. A radiação UVB também é absorvida por esta camada, porém de forma menos eficiente, o que possibilita sua irradiação, mesmo que reduzida, sobre a superfície terrestre. O espectro da radiação UVA, por sua vez, quase não é afetado pela presença da camada de ozônio (HOLICK, 2016). Aproximadamente 95% de toda radiação UV recebida pela superfície terrestre corresponde a radiação UVA, ao passo que, apenas 5% corresponde à radiação UVB (MARIONNET; TRICAUD; BERNERD, 2015). Uma análise espectral da energia recebida pelo planeta permite verificar que cerca de 50% do total energético recebido é composto pelas radiações infravermelhas, aproximadamente 40% de luz visível, cerca de 6% de uma combinação de UVA e UVB e os outros 4% atribuídos a outros tipos de radiações como as ondas eletromagnéticas, por exemplo (HOLICK, 2016).

1.1.1 Os efeitos da radiação ultravioleta no organismo

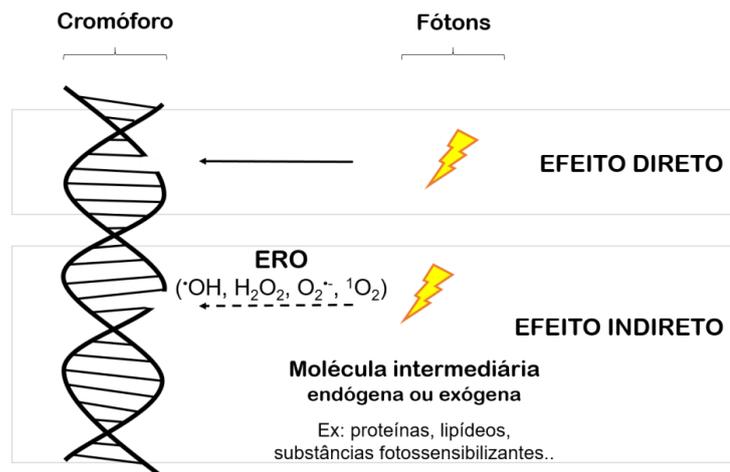
Os benefícios da exposição a luz solar sobre o organismo são notoriamente conhecidos. Dentre eles o mais evidente é a síntese de vitamina D a partir da exposição ao componente UVB da luz solar. Ao favorecer a produção de vitamina D, a radiação UV participa indiretamente do processo de manutenção dos níveis de cálcio, fator fundamental para a homeostase do organismo (HOLICK, 2016). Além disso, também é descrito na literatura o aumento na expressão e produção de beta-endorfina, hormônio relacionado ao bem-estar, relaxamento e alívio de dores, após exposição a níveis controlados de radiação UV (JUSSILA et al., 2016). Adicionalmente, a irradiação UV é explorada no processo de fototerapia e fotoquimioterapia para o tratamento de diversas patologias, tais como: icterícia neonatal, psoríase, vitiligo (BATYCKA-BARAN et al., 2016; BHUTANI; WONG; STEVENSON, 2016; ESMAT et al., 2017). Existe, ainda, uma associação indireta entre efeitos cardiovasculares e a radiação UV, responsável por produzir redução da pressão arterial sistêmica, aumento do ritmo cardíaco e dos níveis de óxido nítrico na circulação (WELLER, 2016).

Apesar dos efeitos benéficos da exposição à radiação UV explicitados anteriormente, os seus efeitos nocivos ainda são de maior relevância para a saúde pública quando se trata de exposição ao sol. Resumidamente, os efeitos nocivos da radiação UV são classificados como efeitos agudos, de curto e médio prazo e efeitos crônicos, de longo prazo. Eritema ou queimaduras solares e pigmentação da pele ou bronzeamento são exemplos de efeitos agudos, enquanto a fotocarcinogênese e o fotoenvelhecimento são efeitos crônicos atribuídos ao UV. Esses efeitos são reflexo de processos tais como: danos diretos ao DNA; geração de espécies

reativas de oxigênio (ERO) e produção de radicais livres; melanogênese; apoptose; imunossupressão e modulação de expressão gênica de proteínas relacionadas ao processo carcinogênico (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2016).

A interação da radiação UV com o organismo é iniciada em nível molecular envolvendo cromóforos da pele e fótons. Os cromóforos são moléculas capazes de absorver a energia da radiação UV ou Vis. Cada cromóforo possui um espectro de absorção característico e específico. Os fótons, por sua vez, são descritos como o *quantum* de energia sob a forma de radiação eletromagnética emitida ou absorvida pela matéria ou pelos cromóforos (LEWIS, 1926). Ao absorver energia de um fóton, o cromóforo assume um estado de energia superior (excitado), tornando-se instável. Tal instabilidade pode resultar em uma mudança estrutural, favorecendo a interação e ligação do cromóforo à outras biomoléculas, sendo este o chamado efeito direto. O cromóforo instável pode, também, atuar como mediador sensibilizante ao gerar ERO e radicais livres, que, por sua vez, interagem com moléculas intermediárias, que, em último nível, danificam biomoléculas adjacentes, como DNA ou proteínas, constituindo-se o efeito indireto (Figura 2). Nesse sentido, quando no estado excitado, os cromóforos são os iniciadores de todas as respostas fotobiológicas de curto e longo prazo (YOUNG, 1997; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2016).

Figura 2 - Representação esquemática da interação da radiação UV com o DNA e seus efeitos diretos e indiretos



Efeitos da radiação ultravioleta (UV) a nível molecular com interação dos seus fótons com os cromóforos da pele, como o DNA. Efeito direto e indireto através da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) por moléculas intermediárias fotossensibilizadas.

Fonte: (Do autor, 2019).

Os cromóforos endógenos mais conhecidos são o DNA, melaninas e seus precursores, ácido urocânico, aminoácidos aromáticos, flavinas, porfirinas, entre outras biomoléculas. Já os exógenos incluem fármacos fotossensibilizantes como, por exemplo, as fluoroquinolonas, azatioprina, 8-metoxipsoraleno e os filtros UV dos fotoprotetores (BALOGH et al., 2011).

1.1.2 Aspectos fotobiológicos das radiações UVA e UVB

Sabe-se que a energia de determinado fóton é inversamente proporcional ao seu comprimento de onda (DIFFEY, 1991). Sendo assim, a radiação UVA, que possui maior comprimento de onda, é menos energética que a radiação UVB. Porém, a radiação UVA é capaz de penetrar através da epiderme, atingindo a derme de forma mais eficiente do que a radiação UVB. Isso ocorre porque a pele contém uma variedade de macromoléculas cromóforas incluindo DNA, RNA e proteínas cujo espectro de absorção compreende a faixa de UVB majoritariamente, sendo assim, quase todos os fótons de UVB são absorvidos pelas macromoléculas na epiderme e não atingem com eficiência as camadas subsequentes, enquanto a radiação UVA, pouco absorvida pelas macromoléculas da pele, penetra livremente para camadas mais profundas (HOLICK, 2016). Esse fenômeno reflete diretamente nos efeitos diferenciais de cada espectro, UVA e UVB, sobre o organismo.

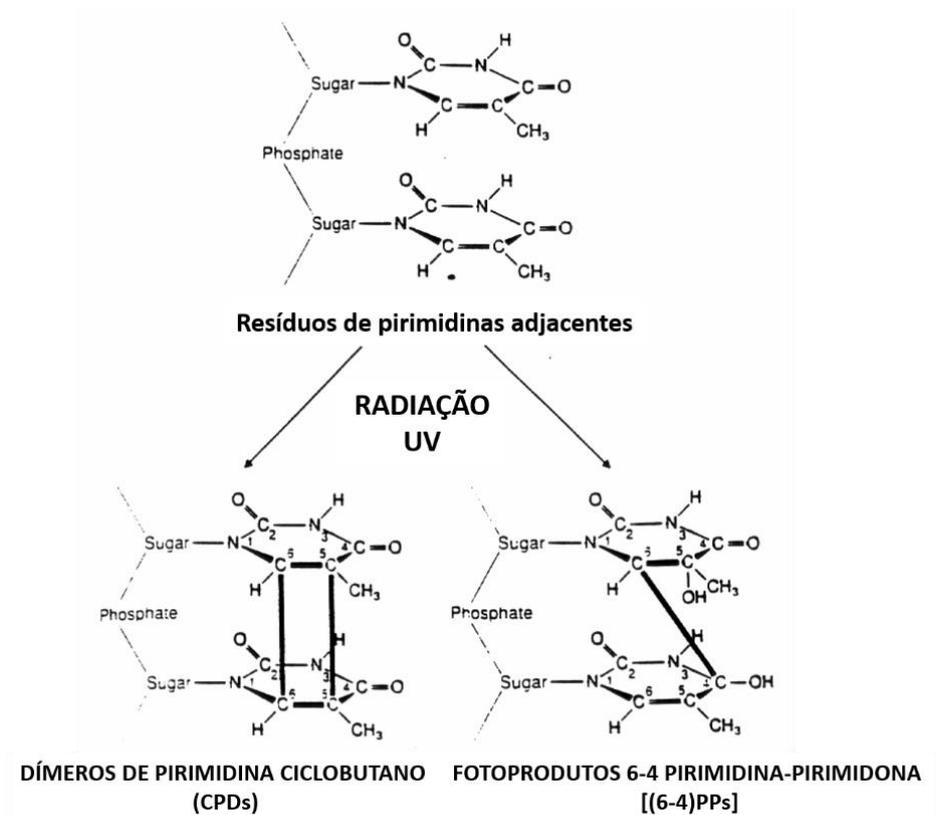
Ao penetrar mais profundamente pela pele, a radiação UVA alcança a derme e interage com os fibroblastos dessa camada causando um fenômeno de reticulação da rede de colágeno e elastina, o que resulta em danos e enrugamento, que, em longo prazo, está diretamente relacionado ao fotoenvelhecimento precoce da pele (HAN; CHIEN; KANG, 2014). Além desse aspecto, a radiação UVA é a radiação majoritariamente responsável pela pigmentação ou bronzeamento da pele (COELHO; HEARING, 2009). O componente UVA da luz solar é bastante relacionado à formação de ERO e danos de caráter oxidativo, portanto, apesar de não ser eficientemente absorvida pelo DNA, a radiação UVA possui ação genotóxica indireta sobre o organismo provocando danos celulares (MARIONNET; TRICAUD; BERNERD, 2015).

Por sua vez, a radiação UVB, apesar de ser o comprimento de onda atribuído à síntese de vitamina D, é majoritariamente responsável pelos fenômenos de queimaduras solares (eritema) e formação de lesões no DNA por efeito direto que, se não reparadas por meio de mecanismos de reparo celular, acumulam-se e dão início ao processo carcinogênico (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

1.1.2.1 Formação direta de lesões no DNA pela radiação UV

As mais frequentes lesões de DNA geradas diretamente pela radiação UV são os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e os fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Os CPDs são lesões que se caracterizam pela formação de uma ligação covalente entre duas bases pirimidínicas adjacentes por meio de um de anel ciclobutano formado a partir da saturação da dupla ligação entre o carbono 5 e o carbono 6 das bases nitrogenadas pirimidínicas vizinhas (FRIEDBERG et al., 2006). Já os 6-4PPs são caracterizados por uma ligação covalente entre a extremidade 5' do carbono 6 de uma base com a extremidade 3' do carbono 4 de sua base adjacente (FRIEDBERG et al., 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Fotoprodutos originados no DNA após exposição à radiação UV



Formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs) no DNA pela exposição à radiação ultravioleta (UV).

Fonte: (<https://www.ufpe.br/biolmol/GenMendel/mutacoes&reparo.htm>, adaptado). Acesso em: 22 ago. 2016.

Apesar da ação carcinogênica da radiação UVA ser comumente atribuída à sua interação indireta com o DNA por meio de danos oxidativos, diversos estudos evidenciaram a geração de CPDs e 6-4PPs, no DNA, induzidos diretamente pela radiação UVA com relevância comparável ao mesmo efeito induzido por UVB, indicando que tais lesões não são geradas exclusivamente por UVB. Alguns desses estudos, inclusive, demonstram que esses tipos de

lesões são produzidas em maior rendimento do que as de carácter oxidativo em células irradiadas com UVA (TYRREL, 1973; DOUKI et al., 2003; MOURET et al., 2010).

1.1.2.2 Formação indireta de dano oxidativo no DNA pela radiação UV

Sabe-se que o comprimento de onda da radiação UVA é majoritariamente responsável pela geração de danos indiretos ao DNA através de processos oxidativos (NOONAN et al., 2012). Porém, a geração ERO por UVB também é conhecida há bastante tempo e pode ser evidenciada pelo uso de técnicas que detectam a formação de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), após irradiação nesta faixa de comprimento de onda. A geração de ERO por UVB é atribuída à ativação de enzimas, como a NADPH-oxidase (NOX) (SCHUCH et al., 2017). Nesse sentido, tanto a radiação UVA quanto a UVB participam de processos oxidativos à nível celular e molecular em diferentes proporções.

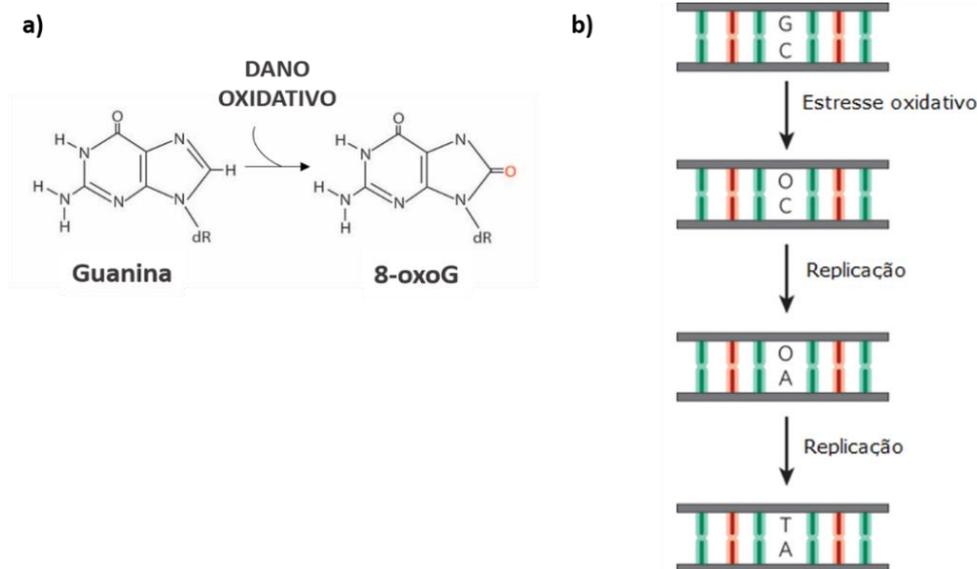
A produção de ERO depende da ação de mediadores sensibilizantes fotoexcitados através da interação direta ou indireta com biomoléculas por meio de reações do tipo I e II. Ambos os tipos de reações se iniciam pela absorção de fótons por cromóforos no seu estado eletrônico fundamental, induzindo fotoexcitabilidade dessas moléculas que se tornam mediadores sensibilizantes. Na reação do tipo I, estes podem interagir diretamente com moléculas substrato, tais como bases de DNA, gerando ERO tais como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e radical hidroxil ($\cdot OH$). Na reação de tipo II, estes mediadores sensibilizantes ativam o oxigênio molecular por meio de reações de transferência energética ou eletrônica, resultando na formação de oxigênio singlete (1O_2) e $O_2^{\cdot-}$ e, conseqüentemente, oxidação de biomoléculas (WONDRAK; JACOBSON; JACOBSON, 2006; SCHUCH et al., 2017).

Embora muitas ERO participem de mecanismos de sinalização celular, a geração destas espécies em níveis elevados pode danificar biomoléculas susceptíveis à oxidação, resultando em efeitos deletérios quanto à integridade e funcionalidade das células. A peroxidação lipídica, por exemplo, pode desestabilizar a membrana, o que pode conduzir à mutagênese e morte celular. Os aldeídos insaturados, que são os produtos finais dessas reações, podem formar adutos de DNA, lesões potencialmente mutagênicas, através da alquilação de bases nitrogenadas (SCHUCH et al., 2017).

O produto de oxidação de DNA mais estudado é a lesão 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), majoritariamente detectada após exposição à radiação UVA (DOUKI et al., 2003). É descrito na literatura que as ERO induzem modificações oxidativas no DNA, incluindo quebras de fita simples e duplas, afetando preferencialmente guanina, devido ao seu menor potencial

redox entre outras bases de DNA. Isso ocorre porque quando radicais $\cdot\text{OH}$ interagem com a guanina, gera-se um radical redutor neutro que reage com o oxigênio molecular (O_2) e, através de transferência eletrônica, forma-se a 8-oxoG (BELANGER et al., 2016) (Figura 4.a).

Figura 4 - Representação da lesão oxidativa 8-oxoG e a transversoão GC \rightarrow TA.



Representação da lesão 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) gerada após oxidação da guanina e representação da transversoão GC \rightarrow TA após dois eventos de replicação sobre uma guanina oxidada, evidenciando a lesão 8-oxoG como pré-mutagênica.

fonte: a) (Adaptado de: <https://geneofinterest.wordpress.com/tag/xeroderma-pigmentosum/>. Acesso em: 22 ago. 2016 e b); (DAVID; O'SHEA; KUNDU, 2007).

A 8-oxoG é uma lesão oxidativa que pode ser gerada por diversos agentes exógenos, como a radiação UV e é potencialmente mutagênica, visto que, quando uma guanina é oxidada, se a fita simples de DNA na qual há essa oxidação servir de fita molde numa primeira replicação celular, ela pode parear tanto com a citosina quanto com a adenina. Caso o pareamento ocorra com a adenina, forma-se um pareamento pré-mutagênico (8-oxoG:A) que, após uma próxima replicação, se não reparado, torna-se uma mutação por transversoões GC \rightarrow TA como mostra a Figura 4.b. (THOMAS et al., 1997; SHOCKLEY et al., 2013).

1.2 Conceitos em mutagênese e genotoxicidade

Quando se discute o fenômeno de ocorrência de mutações e suas consequências biológicas, os termos e definições acerca deste assunto são, por vezes, confundidos. Define-se mutação como uma mudança hereditária na sequência do genoma de um organismo, que ao transportar uma ou mais mutações em seu genoma é referido como um mutante. Dá-se o nome

de agente mutagênico àquele agente, seja físico (radiação UV, por exemplo), químico (substâncias mutagênicas) ou biológicos (vírus, bacteriófagos e outros), que leva a um aumento na frequência de ocorrência de mutações ou de mutantes em uma população (FRIEDBERG et al., 2006).

O processo pelo qual as mutações são produzidas é referido como mutagênese, podendo ocorrer sem a exposição a um agente mutagênico, chamada de mutagênese espontânea (erros de replicação, por exemplo) ou após exposição, chamada mutagênese induzida. Aquela lesão do DNA potencialmente geradora de uma mutação neste local é chamada de lesão pré-mutagênica, como é o caso da oxidação da guanina, 8-oxoG, citada anteriormente, que, se não reparada, origina uma mutação. As mutações puntiformes resultam da substituição de um par de bases podem ser de transição, envolvendo uma alteração de uma purina para outra ou uma pirimidina para outra, como também de transversão que envolve a troca de uma purina para uma pirimidina ou vice-versa, como no caso da transversão GC→TA da 8-oxoG (FRIEDBERG et al., 2006).

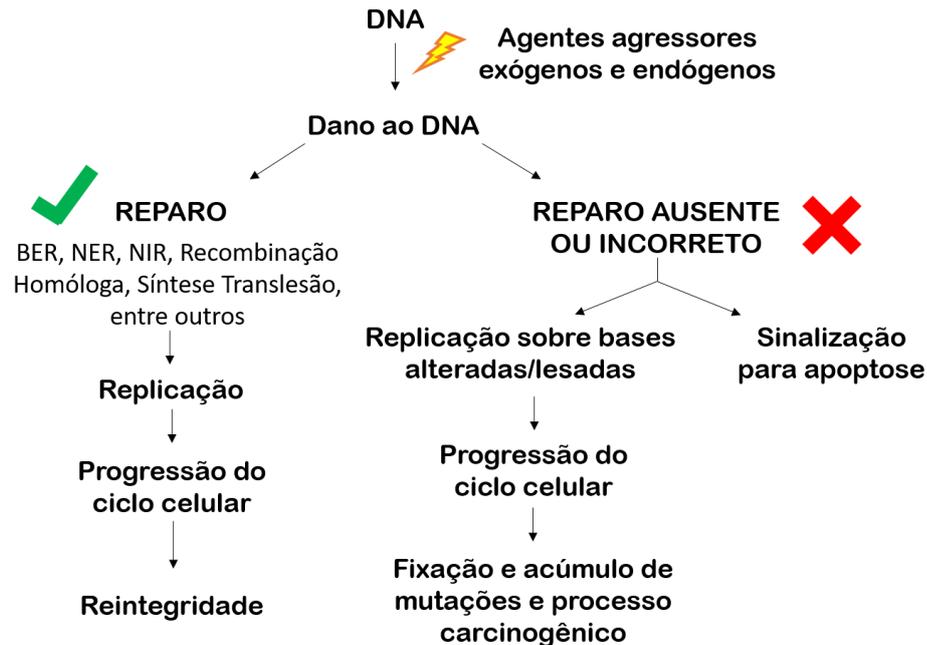
Enquanto o termo mutagenicidade refere-se à indução de mudanças transmissíveis permanentes na estrutura do material genético de células ou organismos, podendo envolver um único gene ou um conjunto de genes, genotoxicidade é um termo mais amplo que se refere à capacidade de um agente genotóxico causar danos ao material genético, incluindo danos mutagênicos. Dessa forma, pode-se dizer que todo dano mutagênico é genotóxico, mas nem todo dano genotóxico é mutagênico (FRIEDBERG et al., 2006).

1.3 Sistemas de reparo e tolerância celular

A estrutura primária do DNA é constantemente agredida por agentes endógenos e exógenos. Em virtude da variada gama de danos que o genoma está passível de sofrer, tanto espontaneamente quanto pela exposição a agentes genotóxicos e mutagênicos ambientais, é plausível considerar que o organismo deva possuir estratégias celulares de remoção desses danos potencialmente letais, caso contrário os seres vivos seriam rapidamente eliminados da natureza. À estratégia celular de remoção ou tolerância aos danos dá-se o nome de sistemas ou mecanismos enzimáticos de reparo. Quando um organismo é atingido por agentes nocivos, sejam eles exógenos ou endógenos são geradas lesões no DNA que podem ser reparadas mediante o funcionamento e presença de mecanismos de reparo e tolerância, tais como o Reparo por Excisão de Bases (BER); Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER); Reparo por Incisão de Nucleotídeos (NIR); Recombinação Homóloga; Síntese Translesão, entre outros. Caso

contrário pode ocorrer uma sinalização para a apoptose celular ou acúmulo e fixação de mutações (FRIEDBERG et al., 2006), sendo esta etapa uma das primeiras do processo carcinogênico (ALMEIDA et al., 2005) (Figura 5).

Figura 5 - Efeitos biológicos gerados pela ação de agentes exógenos e endógenos sobre o DNA e a influência dos sistemas de reparo celular.



BER: Reparo por excisão de bases; NER: Reparo por excisão de nucleotídeos; NIR: Reparo por incisão de nucleotídeos.

Fonte: (Adaptado de FRIEDBERG, et al., 2006).

1.3.1 Reparo por Excisão de Bases (BER) e de Nucleotídeos (NER)

O sistema de reparo mais especializado em reparar lesões oxidativas é o BER (FRIEDBERG et al., 2006; PANICH et al., 2016; SCHUCH et al., 2017). Esse mecanismo de reparo é iniciado por uma classe de enzimas chamadas DNA glicosilases que reconhecem as lesões e catalisam a hidrólise das ligações N-glicosídicas que ligam bases nitrogenadas quimicamente alteradas ou incorretamente ligadas ao esqueleto de desoxirribose-fosfato do DNA, gerando sítios abásicos,apurínicos ou apirimidínicos, denominados sítios AP. A remoção dos sítios AP é iniciada por uma segunda classe de enzimas do reparo BER, as AP endonucleases, que reconhecem estas regiões, fazendo incisões no DNA através da hidrólise da ligação fosfodiéster no lado 5' do sítio AP, gerando um resíduo 5'-desoxirribose-fosfato, que é removido pelas exonucleases, bem como pelas enzimas com atividade DNA-

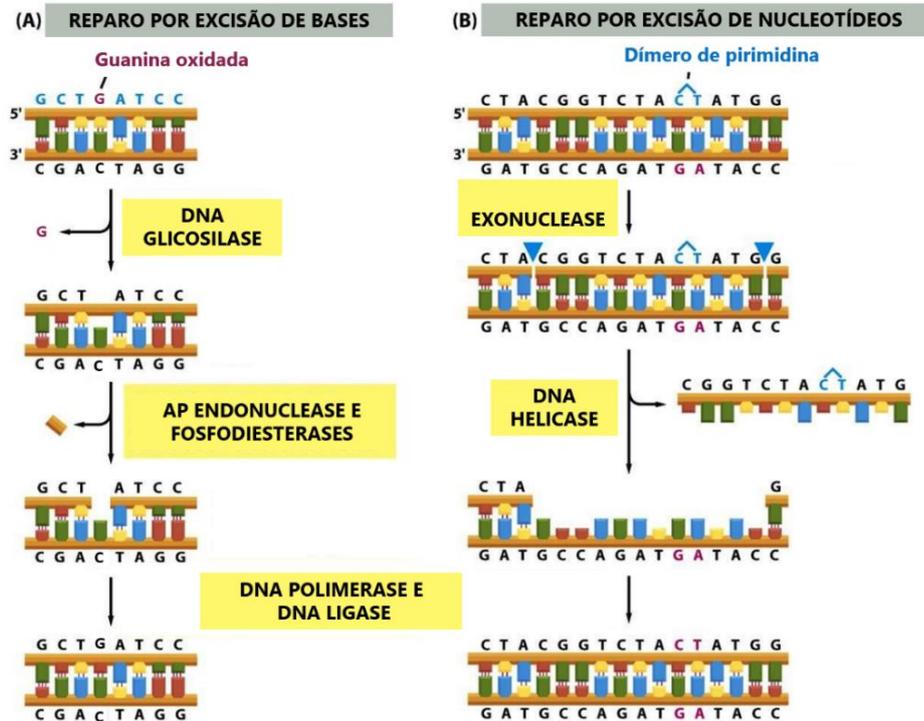
desoxirribosfodiesterase (dRpase). DNA polimerases e DNA ligases completam o reparo reestabelecendo a fita íntegra (FRIEDBERG et al., 2006) (Figura 6).

Em células de mamíferos, são descritos, aproximadamente, 11 tipos de DNA glicosilases, caracterizadas por diferentes especificidades de substrato e modos de ação (CHRISTMANN et al., 2003). Bactérias, *Saccharomyces cerevisiae* e células humanas possuem diversas DNA glicosilases com funções semelhantes, porém a que mais se destaca no reparo BER é a 8-oxoG-DNA glicosilase (Ogg1) presente em *S. cerevisiae* e em humanos. Esta enzima é uma DNA glicosilase/AP liase bifuncional que promove a excisão de lesões do tipo Fapy-Guanina e 8-oxoG de DNA lesado por irradiação, assim como, também repara pirimidinas e adeninas oxidadas. Em *S. cerevisiae*, a enzima Ogg1, codificada pelo gene *OGG1*, é ortóloga a das células humanas, ou seja, possui mesma estrutura e função de reparo nas duas espécies. (THOMAS et al., 1997; PADULA et al., 2004; FRIEDBERG et al., 2006; BOITEUX; ROBERTSON, 2013).

Lesões como os CPDs e os 6-4PPs são removidas principalmente por meio do reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Este fato é evidenciado observando-se pacientes com xeroderma pigmentoso, doença na qual a capacidade de reparo de DNA por NER encontra-se ausente ou prejudicada por mutações nas enzimas envolvidas nesse tipo de reparo, favorecendo a permanência de CPDs e 6-4PPs no DNA irradiado (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2016; SCHCHU et al., 2017). O mecanismo de reparo NER pode ser subdividido em duas vias: reparo global do genoma (GG-NER) e reparo acoplado à transcrição (TC-NER). Em ambas as vias após o reconhecimento da lesão, exonucleases fazem duas incisões na fita simples onde está localizado o dano, flanqueando-o. Após as incisões, o fragmento contendo a lesão é liberado, e a lacuna gerada é polimerizada pela DNA polimerase e posteriormente o fragmento é ligado ao pré-existente pela DNA ligase. Diz-se, no geral, que o mecanismo de reparo é constituído de 5 etapas basicamente: reconhecimento da lesão, incisão, excisão, síntese de reparo e ligação (Figura 6).

A Figura 6 representa, esquematicamente, o mecanismo geral de reação dos reparos BER e NER explicados anteriormente.

Figura 6 - Reparo por excisão de bases (BER) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER)



AP: sítios abásicos

Fonte: (Adaptado de: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/chapter-5-dna-replication-repair-and-recombination/deck/6250485>. Acesso em: 05 ago. 2017).

1.4 Fotoproteção contra os efeitos da radiação UV

Além dos sistemas de reparo e tolerância, as células possuem também estratégias preventivas de proteção natural contra os efeitos da radiação UV. É o caso da melanogênese induzida pela radiação UV, processo que resulta em um aumento do número de melanócitos ativos e da taxa de síntese de melanina. Dessa forma, maior quantidade de melanina produzida favorece a proteção natural contra os raios UV e seus efeitos deletérios (PAWELEK et al., 1992).

Em contrapartida, este fenômeno não é garantia de uma fotoproteção adequada a todos os tipos de pele visto que cada tom de pele possui quantidade diferente de melanina e, consequentemente, níveis de proteção natural também diferentes. O fototipo de pele, conforme descrito pela escala de Fitzpatrick (FITZPATRICK, 1988), é um dos determinantes clínicos mais úteis para prever a sensibilidade a radiação UV e relaciona a quantidade de melanina e tom de pele a níveis em uma escala de proteção natural. Os tipos mais **baixos** de pele são mais suscetíveis a queimaduras solares e ao risco de câncer de pele, devido à baixa taxa de melanina (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2016).

Nesse sentido, torna-se necessário o emprego de estratégias de defesa artificial contra a radiação solar (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007). Evitar intensa exposição ao sol e adotar vestimentas adequadas, óculos escuros e chapéus são abordagens facilmente disponíveis e eficazes (BALOGH et al., 2011), porém a forma de defesa artificial mais explorada contra os efeitos deletérios da luz solar é o uso de formulações fotoprotetoras ou protetores solares (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 30 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 1º de junho de 2012, que aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre protetores solares em cosméticos, protetor solar ou fotoprotetor é qualquer preparação cosmética destinada a entrar em contato com a pele e lábios, com a finalidade exclusiva ou principal de protegê-la contra a radiação UVB e UVA, absorvendo, dispersando ou refletindo a radiação (BRASIL, 2012).

Com relação à regularização técnica dos fotoprotetores, segundo a RDC nº 7 da ANVISA, de 10 de fevereiro de 2015, que dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização desses produtos, os fotoprotetores são classificados na categoria de produtos cosméticos de grau 2 por possuírem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações, cuidados, modo e restrições de uso (BRASIL, 2015).

Inicialmente, os fotoprotetores foram desenvolvidos no objetivo de proteger a pele contra as queimaduras solares, isto é, buscando cobrir o espectro apenas da radiação UVB, permitindo a exposição ao UVA e, conseqüentemente, deixando o organismo desprotegido contra seus efeitos. A partir do crescente conhecimento científico a respeito da radiação UVA e seus efeitos genotóxicos indiretos pela geração de ERO, tornou-se evidente a necessidade de se proteger a pele de toda a faixa UVA/UVB, objetivando-se a redução do risco de câncer de pele causado direta ou indiretamente pela exposição solar (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007; BALOGH et al., 2011; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2016).

As formulações fotoprotetoras contém filtros UV, moléculas ou complexos moleculares com capacidade de absorver, refletir ou dispersar a radiação UV, dependendo de sua natureza. Pretende-se que essas moléculas atuem, portanto, como cromóforos em detrimento das biomoléculas (DNA, RNA, proteínas, entre outras) da pele, preservando-as do dano causado pela radiação UV (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007).

Existem duas classes de filtros UV: orgânicos e inorgânicos, classificados rotineira e respectivamente como filtros de efeito químico (filtros químicos) e filtros de efeito físico (filtros físicos). Cada filtro UV possui seu espectro de absorção característico, sendo assim, é comum

que existam mais de um filtro por formulação visando aumentar o espectro de proteção pela ação sinérgica ou aditiva. No geral, os filtros UV orgânicos atuam absorvendo a radiação e os inorgânicos refletindo a radiação, porém existem no mercado filtros UV orgânicos que, além de absorver, também refletem a radiação UV, assim como também existem filtros UV inorgânicos com capacidade de absorção dependendo do seu tamanho de partícula (GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-LORENTE; GILABERTE-CALZADA, 2008).

A Tabela 1 apresenta alguns filtros orgânicos e inorgânicos permitidos pela RDC nº 69 da ANVISA, de 23 março de 2016 (BRASIL, 2016) e mais frequentemente empregados nas formulações fotoprotetoras comercializadas, bem como seu espectro de absorção característico majoritário (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2016).

Tabela 1 - Alguns filtros ultravioleta (UV) permitidos e comumente usados em formulações fotoprotetoras e suas respectivas faixas de absorção majoritária.

Substância (NOMENCLATURA INCI)	FAIXA DE ABSORÇÃO
Filtros orgânicos	
Ácido 4-aminobenzóico PABA	UVB
4-Dimetil-aminobenzoato de 2-etilhexila ETHYLHEXYL DIMETHYL PABA	UVB
4-Metoxicinamato de 2-etilhexila OCTYL METHOXYCINNAMATE	UVB
4-Metoxicinamato de 2-etoxietila CINOXATE	UVB
Salicilato de 2-etilhexila ETHYLHEXYL SALICYLATE	UVB
Salicilato de homomentila HOMOSALATE	UVB
Filtros orgânicos	
Salicilato de trietanolamina TEA-SALICYLATE	UVA/UVB
2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona BENZOPHENONE-3	UVA
Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfônico BENZOPHENONE-4	UVA
2, 2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona BENZOPHENONE-8	UVA
Filtros inorgânicos	
Dióxido de titânio TITANIUM DIOXIDE	UVA/UVB*
Óxido de zinco ZINC OXIDE	UVA/UVB*

INCI - International Nomenclature of Cosmetic Ingredient

*dependendo do tamanho da partícula

Fonte: (BRASIL, 2016); (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2016).

Os filtros UV inorgânicos agem de acordo com suas propriedades de absorção, espalhamento e reflexão que, por sua vez, são determinadas pelo índice de refração intrínseco da molécula, o tamanho das partículas, a dispersão na base de emulsão e a espessura do filme da formulação na epiderme (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007). Já o mecanismo de ação dos filtros UV orgânicos envolve basicamente a transmissão da energia da absorção dos fótons UV para elétrons de sua estrutura. Ao absorver a radiação UV, os elétrons situados no orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) são excitados para orbital π^* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e, ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor ou de luz em um comprimento de onda mais longo e menos nocivo (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007; MANCEBO; HU; WANG, 2014).

1.4.1 Controvérsias quanto às formulações fotoprotetoras

Diversos estudos demonstraram que o uso diário de fotoprotetores pode prevenir o desenvolvimento de câncer do tipo melanoma e não-melanoma (DARLINGTON et al., 2003; VAN DER POLS et al., 2006; GREEN et al., 2011), envelhecimento precoce (HUGHES et al., 2013) e evitar exacerbações de fotodermatoses (BISSONNETTE; NIGEN; BOLDUC, 2012). Porém, existem diversas controvérsias e desafios relacionados à eficácia e à segurança desses produtos no que se refere a aspectos relacionados a fototoxicidade, penetração percutânea, disrupção endócrina, fotoinstabilidade, geração de ERO, processos fotogenotóxicos, entre outros (LÓDEN et al., 2011).

Nesse sentido, alguns filtros UV orgânicos, em especial a benzofenona-3 e benzofenona-4, têm despertado a atenção da comunidade científica devido ao seu potencial de disrupção endócrina observado em estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram a indução de atividade estrogênica e antiandrogênica em modelos animais (MA et al, 2003; SCHLUMPF et al., 2004).

Além disso, atualmente, a segurança de micro e nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO) usadas na fotoproteção também é questionada (MANCEBO; HU; WANG, 2014). A potencial toxicidade é resultado dos tamanhos dessas partículas que favorecem a penetração percutânea tornando-se sistêmicas e não mais tópicas; da habilidade de escapar dos mecanismos de defesa imunológica e de formar complexos com proteínas e, principalmente, da habilidade de induzirem à formação de radicais livres (NEWMAN; STOTLAND; ELLIS, 2009; BALOGH et al., 2011). Dentre essas evidências, estudos recentes

têm demonstrado que o TiO_2 quando irradiado com UVA e/ou UVB pode resultar em aumento do estresse oxidativo, pela formação de ERO, e em aumento da citotoxicidade em diversos modelos experimentais (WAMER; YIN; WEI, 1997; PINTO et al., 2010; LIU; LIN; ZHAO, 2013). Dependendo do seu tamanho de partícula, o TiO_2 absorve radiação UV e, então, seus elétrons reagem com o O_2 para produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, enquanto os espaços vazios da banda de valência oxidam os grupos de hidroxila (OH^{\cdot}) para gerar radicais $^{\cdot}\text{OH}$, que, por sua vez, quando são produzidos dentro do citoplasma celular originam radicais carboxil ($^{\cdot}\text{CO}_2^-$), que, posteriormente, oxidam outros componentes celulares e formam outros radicais prejudiciais à célula (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007). Adicionalmente, apesar do TiO_2 não irradiado apresentar fraca ou nenhuma genotoxicidade, ensaios cometa e de aberração cromossômica mostram, desde muito tempo, que, na presença de radiação UV, o TiO_2 induz danos fotogenotóxicos significativos (NAKAGAWA et al., 1997).

Adicionalmente, diversos estudos *in vitro* indicaram a geração de ERO e indução fotogenotóxica de alguns filtros UV orgânicos amplamente usados, tais como o octocrileno, octil metoxicinamato e benzofenona-3 após a irradiação com UV (McHUGH; KNOWLAND, 1997; HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006; DUALE et al., 2010; ZHAO et al., 2013; AMAR et al., 2015).

Apesar dos filtros UV orgânicos cumprirem sua função absorvendo a radiação UV eficientemente, eles não são necessariamente fotoestáveis (HAURI et al., 2004; MacMANUS-SPENCER et al., 2011; HANSON et al., 2015; STEIN et al., 2017). Alguns filtros UV, quando em associação com a radiação UV, sofrem degradação e geram fotoprodutos com eficácia de fotoproteção reduzida. Além disso, alguns desses fotoprodutos não só perdem eficácia fotoprotetora, como, de fato, tornam-se citotóxicos e mutagênicos às células (BUTT; CHRISTENSEN, 2000; DUALE et al., 2010; KRAUSE et al., 2012; KLIMOVA; HOJEROVÁ; PAZOUREKOVA, 2013; STEIN et al., 2017), como é o caso do octil metoxicinamato, por exemplo (STEIN et al., 2017).

1.4.2 Aspectos relacionados a eficácia e a segurança de fotoprotetores: avaliação de risco

Tendo em vista o paradoxo entre a necessidade da proteção do organismo contra os efeitos nocivos da radiação UV a partir de fotoprotetores e, ao mesmo tempo, as constantes controvérsias a respeito dessas formulações, torna-se fundamental assegurar uma avaliação rígida da eficácia e segurança desses produtos.

A eficácia de um fotoprotetor diz respeito a capacidade do mesmo em favorecer incremento da fotoproteção, evitando a influência das manifestações nocivas que são produzidas pela radiação UV. Por outro lado, a segurança de um fotoprotetor refere-se à inocuidade do mesmo, ou seja, a habilidade de não causar reações indesejáveis, tais como fotoalergias, fototoxicidade, fotomutagenicidade/fotogenotoxicidade, entre outras (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007).

Para que sejam realmente eficazes e inócuas, estas formulações devem atender alguns requisitos básicos, tais como: os filtros UV da formulação devem proteger contra todo o espectro UV solar (UVA + UVB); não devem sofrer fotodegradação ou fotoinstabilidade, ou seja, devem ser estáveis quando irradiados; não devem ser absorvidos pela pele, tornando-se sistêmicos; nem produzirem reações locais tóxicas, irritantes ou alérgicas; não devem ser facilmente removidos pela água ou pelo suor; não devem ser fotosensibilizantes ou fotomutagênicos/fotogenotóxicos; não devem alterar a cor da pele e não devem manchar a pele e vestimentas. Além disso, devem ser química, fotoquímica e termicamente estáveis (FLOR; DAVOLOS; CORRÊA, 2007; JANSEN et al., 2013; OSTERWALDER; SOHN; HERZOG, 2014).

Com relação a avaliação da eficácia fotoprotetora, a RDC nº30, de 1º de junho de 2012, da ANVISA (BRASIL, 2012), estabelece que os métodos exigidos para a avaliação de eficácia dos protetores solares são os apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Métodos exigidos para a avaliação de eficácia dos protetores solares (continua)

Metodologia	Referência metodológica
Determinação do FPS em voluntários humanos	<i>FDA, Department of Health and Human Services, Sunscreen drug products for over-the-counter human use. Final Monograph: Proposed Rule, 21 CFR Part 352 et al., 1999 OU COLIPA/JCIA/CTFA-SA. International Sun Protection Factor (SPF) Test Method, 2006.</i>
Determinação da resistência à água	<i>FDA, Department of Health and Human Services, Sunscreen drug products for over-the-counter human use, Final Rule, 21 CFR Part 352 et al, 1999 OU COLIPA Guideline for evaluating sun product water resistance, 2005.</i>
Determinação do nível da proteção UVA	<i>Método in vivo: European Commission – Standardization Mandate Assigned to CEN Concerning Methods for Testing Efficacy of Sunscreen Products – 2006 Annex 2 – Determination of the UVA protection factor based on the principles recommended by the Japanese Cosmetic Industry Association (PPD method published 15.11.1995) OU Método in vitro: COLIPA Guideline, In vitro Method for the Determination of the UVA Protection Factor and “Critical Wavelength” Values of Sunscreen Products, 2009.</i>

Tabela 2 - Métodos exigidos para a avaliação de eficácia dos protetores solares (continuação)

Amplitude da proteção UV	Avaliada através do comprimento de onda crítico.
--------------------------	--

FPS: Fator de Proteção Solar; FDA: *Food and Drug Administration*; COLIPA: *The European Cosmetic and Perfumery Association*; JCIA: *Japan Cosmetic Industry Association*; CTFA-SA: *Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association of South Africa*; CFR: *Code of Federal Regulations*.

Fonte: (BRASIL, 2012).

Apesar de não serem os preconizados pela ANVISA para o controle de qualidade desses produtos, ensaios *in vitro* alternativos para avaliar eficácia já foram desenvolvidos, como os espectrofotométricos, e baseiam-se na análise do espectro de absorção ou de transmissão da radiação UV de soluções diluídas dos fotoprotetores em solvente adequado (BALOGH et al., 2011).

Com relação a avaliação da segurança, entretanto, o efeito protetor desse tipo de cosmético contra fotogenotoxicidade, incluindo aspectos relacionados com sua mutagenicidade, não estão incluídos nos aspectos regulatórios e, notavelmente, também deve ser levado em conta. O *Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)* em *Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation* (SCCS, 2018), da Comissão Europeia, afirma que, com relação a avaliação da fototoxicidade de compostos, a *Food and Drug Administration (FDA)* e a *European Medicines Agency (EMA)* não recomendam que ensaios de fotogenotoxicidade/fotomutagênese façam parte da bateria de testes de segurança. Este fato começa a despertar a atenção da União Europeia, que reivindica, cada vez mais, que a avaliação fotogenotóxica/fotomutagênica seja incluída nos testes obrigatórios no desenvolvimento e controle de qualidade de fotoprotetores (LÓDEN et al., 2011; PAIVA et al., 2014).

Atualmente, a garantia da segurança e inocuidade dos produtos cosméticos acabados baseia-se nos conhecimentos relativos à segurança dos ingredientes ou substâncias isoladas que compõe esses produtos, porém o modo pelo qual se realiza a avaliação da segurança desses compostos isoladamente não é definida nem descrita no Brasil, tampouco fica evidente os aspectos regulatórios de outros países como na Europa e Estados Unidos. Apesar de existirem uma ampla gama de testes *in vitro*, por exemplo, de fototoxicidade, fotomutagênese e fotogenotoxicidade, nenhum é mandatório para o registro de cosméticos, subestimando a relevância desse aspecto para a qualidade e segurança do produto ofertado ao consumidor.

1.5 Testes *in vitro* de fototoxicidade, mutagênese e genotoxicidade.

Os efeitos fotobiológicos da radiação UV já eram reconhecidamente potenciais precursores de eventos mutagênicos e carcinogênicos celulares, quando, surgiu a hipótese dos fótons UV interagirem com os filtros UV dos fotoprotetores, transformando-os em intermediários reativos que podem contribuir para a geração de diversas lesões e danos ao DNA. Tal fato, com o passar dos anos, evidenciou a importância de se incluir testes de fotomutagenicidade e fotogetonoxidade à bateria de testes que avaliem o potencial genotóxico e segurança de produtos químicos (DOKE; DHAWALE, 2015).

Paralelamente, despertava-se a necessidade de se atentar ao modo como esses testes seriam conduzidos. A pressão política exercida por setores ativistas na luta em defesa dos direitos dos animais motivou a ideia de substituir o uso de animais em testes, sempre que possível, por metodologias alternativas. A fim de suprir esta demanda, foram criados, em diversos países, centros de pesquisa e fomento para o desenvolvimento e validação de metodologias alternativas ao uso de animais. E então, em 1959, o postulado **Princípio dos 3R's** foi apresentado à comunidade científica a partir do livro *Principles of Humane Experimental Technique* de Russell e Burch, que preconizava *refinement, reduction and replacement* na experimentação. O refinamento refere-se à modificação de algum procedimento operacional com animais, a fim de minimizar a dor e/ou o estresse, assegurando que as condições ambientais para os animais sejam as melhores possíveis. A redução preconiza o menor número de animais sendo utilizado para obter a mesma qualidade de informação. E a substituição, por fim, pretende substituir os testes *in vivo* por testes *in vitro* (RUSSELL; BURCH, 1959).

Foi somente em 1980 que o interesse pela busca de novas metodologias alternativas se consolidou diante da primeira publicação oficial sobre a aplicação dos 3R's, quando foi criada na Europa a Diretriz 86/906/EEC que descreveu as leis que regem a proteção de animais usados em experimentação científica (ROWAN; ANDRUTIS, 1990).

Conseqüentemente, observou-se, ao longo do tempo, uma gradativa diminuição do número de animais utilizados em pesquisa científica. Até que foi criada a 7ª Emenda da Diretiva 76/768/CEE (2000), na qual países membros da União Europeia se comprometeram a abolir o uso de animais de forma definitiva e permanente no controle toxicológico de produtos cosméticos (DOKE; DHAWALE, 2015). Como resultado de todo esse esforço mundial iniciado na Europa, existe, hoje, um número considerável de ensaios *in vitro* validados e aplicáveis ao controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária (Tabela 3).

Tabela 3 - Alguns exemplos de testes de fototoxicidade, mutagenicidade/genotoxicidade, suas variações, desfechos avaliados, princípios e limitações (continua)

Nome do teste e (suas variações)	Parâmetro avaliado e desfecho	Princípio do teste	Limitações
Teste de Ames ou teste de mutação reversa em bactérias (OECD No. 471, 1997)	Mutagenicidade. Mutações gênicas puntiformes em bactéria	Utilização de linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> para detectar substâncias mutagênicas que revertem mutações iniciais presentes nas cepas teste e restauram a capacidade funcional das bactérias em sintetizar um aminoácido essencial. As bactérias revertentes são detectadas pela sua capacidade de crescer na ausência do aminoácido requerido pela cepa no início do teste.	Não aplicável para substâncias bactericidas. O modelo é um procarioto. Resultados falsos positivos e falsos negativos descritos.
Ensaio Cometa <i>in vivo</i> (OECD No. 489, 2016) e <i>in vitro</i> (TICE; AGURELL; ANDERSON, 2000)	Genotoxicidade. Dano ao DNA	Usado para a detecção de quebras de fitas de DNA em células ou núcleos isolados expostos a substâncias testadas. As suspensões de células/núcleos isolados são tratados com tampão de lise e álcalis promovendo o desenovelamento e liberação de fragmentos de DNA. A análise por eletroforese indica possíveis quebras e danos ao DNA devido a padrões de migrações diferenciais.	Não detecta alguns tipos de danos ao DNA que são reparados em curto período de tempo.
Teste de fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU (OECD No. 432, 2004)	Fototoxicidade	Compara-se a citotoxicidade de uma substância, em células Balb/c 3T3, na presença e na ausência de exposição a uma dose não citotóxica de irradiação com simulador solar. A citotoxicidade é expressa pela redução da captura do corante vital vermelho neutro 24 horas após o tratamento com a substância teste e a irradiação.	Não detecta fotogenotoxicidade e fotomutagenicidade. Sensibilidade das células ao UVB que é evitado no espectro de irradiação.

Tabela 3 - Alguns exemplos de testes de fototoxicidade, mutagenicidade/genotoxicidade, suas variações, desfechos avaliados, princípios e limitações (continuação).

Nome do teste e (suas variações)	Parâmetro avaliado e desfecho	Princípio do teste	Limitações
Teste <i>in vitro</i> de aberração cromossômica em célula de mamífero (OECD No. 473, 2016)	Mutagenicidade. Aberrações cromossômicas.	As culturas celulares são expostas à substância testada. Em intervalos pré-determinados após a exposição, as células são tratadas com uma substância que interrompe a metáfase (por exemplo, Colcemid® ou colchicina). As alíquotas das células são coradas e analisadas microscopicamente para observar a presença de aberrações cromossômicas.	Crescentes evidências de substâncias potencialmente genotóxicas que não são detectados por este teste porque parecem agir através de mecanismos indiretos de danos ao DNA.
Teste <i>in vitro</i> de mutação gênica em células de mamífero (OECD No. 490, 2016)	Mutagenicidade. Mutações gênicas pontuais	A suspensão celular é exposta à substância teste durante um período de tempo adequado. Posteriormente, determina-se a citotoxicidade, pelo crescimento total relativo e a frequência de mutantes, pela semeadura de números conhecidos de células em meio contendo o agente seletivo para detectar colônias mutantes.	Resultados falsos positivos descritos
Teste de micronúcleo <i>in vitro</i> (OECD No. 487, 2016)	Mutagenicidade, Clastogênese e Aneugênese	É um teste que detecta a presença de micronúcleos no citoplasma de células na interfase. A detecção de um micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico, induzido por substâncias ou agentes genotóxicos.	Resultados falsos positivos descritos

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development.

Fonte: (OECD No. 432, 2004); (OECD No. 471, 1997); (OECD No. 473, 2016); (OECD No. 487, 2016); TICE; AGURELL; ANDERSON, 2000; (OECD No. 489, 2016); (OECD No. 490, 2016).

Durante a avaliação da genotoxicidade e/ou da mutagenicidade, diferentes desfechos são possíveis: indução de mutações puntiformes; mudanças no número de cromossomos ou aberrações cromossômicas numéricas; aberrações cromossômicas com mudança na estrutura cromossômica (quebras, deleções, rearranjos), entre outros. Devido à esta diversidade de desfechos, torna-se evidente que o potencial genotóxico e/ou mutagênico de um composto não pode ser avaliado por meio de um único sistema de ensaios (PFUHLER et al., 2010).

Adicionado a isso, os testes *in vitro* apresentam limitações cruciais: a influência da capacidade metabólica não é considerada em alguns casos; algumas situações são superestimadas em comparação com situações *in vivo* levando a resultados falso positivos; baixa especificidade; às vezes são usadas linhagens celulares não relevantes para prever os desfechos genotóxicos, levando a resultados falso negativos, entre outros (NESSLANY, 2016). Por estes motivos, nenhum teste *in vitro* pode substituir completamente um teste *in vivo* já existente, porém pode, efetivamente, contribuir para o Princípio dos 3R's ao servir de *screening* ou triagem prévia (avaliação de risco) e assim evitar que substâncias potencialmente tóxicas em testes *in vitro* sejam testadas em animais, favorecendo a redução e refinamento preconizados por Russell e Burch (PFUHLER et al., 2010; SCHOLZ et al., 2013).

Ainda nesse sentido, em virtude da constante preocupação atribuída ao fato de alguns compostos induzirem efeitos genotóxicos quando irradiados com radiação UV ou Vis, os testes já validados para avaliar mutagenicidade e genotoxicidade descritos anteriormente na Tabela 3 foram adaptados para a avaliar fotomutagenicidade e fotogenotoxicidade na presença e na ausência de irradiação com UV e Vis (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004). Entretanto, quando se deseja avaliar o potencial fototóxico, fotogenotóxico ou fotomutagênico de uma substância por um teste *in vitro*, é preciso assegurar que o modelo experimental adotado seja suficientemente resistente a toda faixa de comprimento de onda da radiação UV da luz solar para que as condições experimentais mimetizem o espectro ambiental completo (UVA e UVB), e que os níveis de dose e tempos de exposição sejam, também, compatíveis com as exposições naturais e usuais da população.

1.5.1 Considerações sobre os ensaios de fotogenotoxicidade/fotomutagenicidade: *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures Working Group* (IWGTP)

Em 1993 foi criado o primeiro *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (IWGTP), grupo responsável pelo estudo de testes que avaliam a genotoxicidade de compostos,

e desde então tornou-se evidente a relevância de se estudar as propriedades genotóxicas das substâncias químicas (KIRKLAND et al., 2007).

O segundo IWGTP, realizado em Washington em 1999, destacou, entre outros aspectos a avaliação da fotogenotoxicidade, apontando, não só, a bateria de testes recomendados para compostos supostamente fotomutagênicos, como também, definindo diretrizes que guiavam a condução destes testes (KIRKLAND et al., 2000). O fator motivador para tal preocupação foi o maior conhecimento acerca da atividade fotoreativa e fototóxica subsequente gerada por algumas substâncias quando irradiadas. A primeira preocupação foi definir as classes de compostos para as quais o teste de fotogenotoxicidade é de óbvia relevância. Nesse sentido, os filtros UV utilizados em formulações fotoprotetoras são os principais candidatos visto que, no cumprimento de sua finalidade de agente protetor, tais substâncias, por si, só são capazes de absorver os fótons da radiação UV e, além disso, pelo fato de serem substâncias presentes em uma pele fortemente exposta ao sol (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004).

Em primeiro lugar, a ideia fundamental de um teste de fotogenotoxicidade é a exposição concomitante das células do modelo experimental à substância teste e à irradiação, seja através de uma fonte de radiação UV artificial ou não. Tal princípio básico é essencial na detecção da fotogenotoxicidade tanto de compostos que reagem diretamente com o DNA, quanto de compostos responsáveis por gerar produtos intermediários reativos que interagem indiretamente com o DNA e outras macromoléculas do organismo, como é o caso das ERO e radicais livres.

Um ponto importante para testes de triagem/*screening* é que o espectro de irradiação (faixa de comprimento de onda) e os tempos de exposição devem ser os mais próximos possíveis do espectro solar e da exposição usual da população, a fim de torná-los confiáveis e passíveis de extrapolação. Uma grande conquista nesse âmbito foi a crescente preconização para adoção de simuladores solares em detrimento da utilização das lâmpadas de espectros isolados, ou seja, lâmpadas UVA e UVB isoladas. Simuladores solares contendo lâmpadas de xenônio combinadas com diversos filtros sejam eles atenuantes de radiação UVB, levando-a para os níveis emitidos pela luz solar ambiental; removedores de UVC; atenuantes de infravermelho; entre outros, são os mais utilizados (GOCKE et al., 2000).

Para o controle desse aspecto, ao se utilizar um sistema de simulação solar, é importante se conhecer informações sobre a proporção da [taxa de dose de UVB]: [taxa de dose de UVA]. A radiação solar possui uma proporção de cerca de 1:20 (UVB:UVA). Obedecer a essa proporção, a partir da medição por um dosímetro específico, garante que a exposição das células a uma fonte artificial seja o mais reprodutível possível das condições naturais. Além disso, o

uso de fontes de radiação de espectro isolado, como por exemplo lâmpadas UVA e lâmpadas de UVB isoladamente podem superestimar os efeitos genotóxicos atribuídos a uma das faixas, ao passo que subestima da outra. Cabe ressaltar que, ao se utilizar um simulador solar, as doses de UVB e UVA emitidas devem ser determinadas e relatadas separadamente, usando dosímetros detectores do comprimento de onda de UVA e UVB de forma individual (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004).

Outro ponto é a forma pela qual as células escolhidas para o modelo experimental estarão dispostas. No caso de uma suspensão disposta em uma placa de irradiação de vidro, as células dispostas na superfície servirão de **guarda-chuva** para as localizadas no fundo que estarão protegidas pela **sombra** das demais, dessa forma uma subpopulação de células pode, portanto, receber doses muito mais baixas, e outra doses muito mais altas. Para células irradiadas em suspensão, isso pode ser superado adotando-se agitação magnética (GOCKE et al., 2000). O aquecimento das células do teste, seja pela exposição ao componente infravermelho, seja pela cinética de movimentação da agitação magnética, pode causar problemas em altas taxas de dose, isso porque os tempos de irradiação devem ser suficientemente longos para permitir uma dosagem exata, aumentando as chances de aumento da temperatura. Nesse caso, deve-se investir no uso de filtros espectrais associados ao simulador solar ou à lâmpada, que barrem infravermelho, já que esta radiação não contribui ativamente para lesões ou danos ao DNA tal qual a radiação UV (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004).

O 2º IWGTP recomendou fortemente, em 1999, a inclusão de etapas que avaliem a curva de dose-resposta do modelo experimental frente à irradiação na ausência do composto teste. Esta etapa é essencial na avaliação da fototoxicidade do composto uma vez que permite a comparação da viabilidade celular e genotoxicidade antes e após o tratamento com o composto. Nesse âmbito, é bastante compreensível que uma dose de irradiação que provoca, por si só, um forte efeito fotogenotóxico não deve ser escolhida, visto que um aumento adicional da fotogenotoxicidade devido ao potencial fotogenotóxico de um composto pode ser difícil de detectar ou pode ser completamente imperceptível. O IWGTP concluiu que a dose de irradiação adequada deve ser aquela que produz um efeito genotóxico ou tóxico pequeno. Porém, ao se testar filtros solares, torna-se interessante pesquisar, também, o efeito protetor do composto teste contra fotomutagenicidade. Nesse caso, é aconselhável usar uma dose de irradiação que provoca um efeito mais expressivo, de modo que a atenuação da fotogenotoxicidade seja medida com mais facilidade (GOCKE et al., 2000).

Quanto ao critério de escolha da concentração do composto teste, deve-se levar em consideração a toxicidade, na ausência de irradiação, do composto ao modelo experimental e

sua a precipitação, a fim de evitar concentrações potencialmente citotóxicas no escuro e precipitantes. Ou seja, uma etapa de controle no escuro, ou seja, etapa de exposição do modelo experimental ao composto teste na ausência de irradiação deve ser incluída. Por fim, o 2º IWGTP recomenda, ainda, a inclusão de um controle positivo, isto é, um tratamento sabidamente fotogenotóxico como a radiação UV ou um composto fotogenotóxico, tanto na presença quanto na ausência de irradiação, como por exemplo o 8-metoxipsoreleno, clorpromazina ou fluoroquinonas. (GOCKE et al., 2000)

1.6 O emprego de *Saccharomyces cerevisiae* em estudos *in vitro*

Apesar da ampla gama de testes *in vitro* de fototoxicidade, fotogenotoxicidade e fotomutagenicidade existentes e validados, as diversas limitações desses ensaios (Tabela 3) motivam a constante busca por estratégias de aperfeiçoamento das técnicas ou de desenvolvimento de novos sistemas de estudo.

Apesar de bastante conhecido e empregado, o teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU, não fornece informação quanto ao risco fotogenotóxico/fotomutagênico do composto testado, indicando apenas aspectos de fotocitotoxicidade como desfecho (OECD, 2004). Além disso, uma grande controvérsia deste teste deve ao fato de que as células Balb/c 3T3 são muito sensíveis aos efeitos citotóxicos do UVB, o que faz com que esta faixa de comprimento de onda seja evitada do espectro de irradiação da fonte UV usada, por meio do uso de filtros bloqueadores (SPIELMANN et al., 1998). Esta medida não parece razoável uma vez que subestima os efeitos do maior carcinógeno ambiental já descrito (UVB) (GOCKE et al., 2000). Além disso, essa alteração do espectro de irradiação prejudica uma avaliação de segurança de compostos que absorvem preferencialmente na faixa do UVB uma vez que favorece a ocorrência de resultados falso negativos, já que apenas os efeitos fototóxicos do UVA são considerados (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004).

Já o teste de Fotoames, ainda muito explorado como teste adaptado para avaliar fotomutagenicidade, vem enfrentando algumas críticas e controvérsias que colocam em risco sua credibilidade. O principal fator limitante desse ensaio é, mais uma vez, a altíssima sensibilidade das cepas bacterianas usadas frente à radiação UV, impossibilitando uma boa observação dos resultados (WANG et al., 2003; MARROT et al., 2006). Esta alta sensibilidade ainda dificulta a extrapolação dos experimentos para a condição real, já que a estratégia usada neste caso é a redução do tempo de irradiação para tempos incompatíveis com a exposição ambiental usual da população. Por exemplo: é descrito que uma exposição de 15 segundos ao

sol do meio-dia em determinada localização na Europa, sem a exposição à uma substância potencialmente fotomutagênica, já é capaz de induzir uma duplicação do número de mutantes inicial na cepa TA100 de *S. typhimurium* adotada para o teste, condição esta inconsistente com a duração da exposição solar usual da população. Nesse mesmo estudo, é demonstrado que a cepa TA100 é cerca de 100-300 vezes mais responsiva do que as células de mamíferos do teste de fotoaberrações cromossômicas (CHÉTELAT et al., 1993; GOCKE et al., 2000). Dessa forma, em alguns casos, o teste de Fotoames acaba por superestimar o potencial fotogenotóxico de um composto. Paradoxalmente, existem, também, evidências de compostos que se mostraram fotogenotóxicos em testes *in vivo* e *in vitro* usando células de mamíferos e que não tiveram o mesmo efeito observado quando testadas com o Fotoames (UTESCH; SPLITTGERBER, 1996; GOCKE et al., 2003). Cabe ressaltar, ainda, que as enzimas de reparo bacterianas não são homólogas ou ortólogas às das células de mamífero (FRIEDBERG et al., 2006), evidenciando a pouca correlação desse modelo com o organismo humano.

Nesse sentido, cresce a demanda das agências regulatórias por testes que utilizem modelos celulares suficientemente resistentes aos efeitos citotóxicos da radiação UVB para que não seja necessário evitar/filtrar este comprimento de onda do espectro de irradiação dos ensaios, permitindo que os compostos sejam testados frente a uma fonte de radiação cujo espectro UV seja equivalente ao da luz solar (UVA + UVB). Além disso, clamam também por testes com taxas de dose e tempos de irradiação compatíveis às condições ambientais externas (GOCKE et al., 2000).

Dessa forma, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de ser um eucarioto inferior, é um dos micro-organismos mais explorados como modelo de estudo alternativo ao uso de animais e células de mamífero (MARROT et al., 2006), sendo o primeiro micro-organismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996). Por meio desse sequenciamento foi possível observar um aspecto muito explorado nesse micro-organismo em estudos genéticos e de fotobiologia: a similaridade enzimática com os sistemas de reparo humano. Isso porque, *S. cerevisiae* possui diversos genes homólogos e ortólogos aos das células de mamífero (LAURENT et al., 2015), incluindo diversos genes de reparo celular, como é o caso do gene *OGG1* que codifica a enzima Ogg1, envolvida no reparo BER (FRIEDBERG et al., 2006) e o gene *YNO1*, que codifica a enzima *Yeast NADPH-oxidase* (Yno1), ortóloga às NADPH-oxidases humanas, responsável pela sinalização e defesa celular contra o estresse oxidativo, por exemplo (RINNERTHALER et al., 2012).

Adicionalmente, as cepas de *S. cerevisiae* são suficientemente resistentes a radiação UV ambiental e/ou artificial, inclusive ao UVB, permitindo, assim, exposições à doses comparáveis

às que podem ser encontradas sob a luz solar natural, diferente do observado para as cepas bacterianas usadas no teste de Fotoames e para as células Balb/c 3T3 do teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU (MARROT et al., 2006). Além disso, outras características tornam esse micro-organismo um bom modelo experimental para testes *in vitro*, sendo elas: sua não patogenicidade; fácil manipulação em laboratório; baixo custo; rápido crescimento; permissibilidade que sequências exógenas de DNA se integrem no seu genoma por meio de recombinação homóloga; presença de um grande número de cepas mutantes em diversos mecanismos de reparo e atende às exigências das agências regulatórias, que preconizam testes alternativos de cito e genotoxicidade baseando-se no princípio dos 3R's (BARR, 2003).

Nesse sentido, diversos estudos mostraram que *S. cerevisiae* é um bom modelo bioindicador de danos ao DNA. As cepas de *S. cerevisiae* são capazes de evidenciar o potencial conhecidamente fotogenotóxico de compostos já descritos na literatura, como é o caso do 8-metoxipsoreleno e da clorpromazina, por exemplo (CHÉTELAT et al., 1993). Desde 1992, cepas de levedura já eram bastante exploradas em estudos fotobiológicos para a avaliação de fototoxicidade e fotogenotoxicidade/fotomutagenicidade e fotoproteção de componentes fotoprotetores já usados e em desenvolvimento. Ainda nesta época passou-se a observar que o emprego de cepas de *S. cerevisiae* mutantes podia fornecer diversas evidências acerca do mecanismo pelo qual ocorrem as lesões induzidas pela radiação UV (MONDON; SHAHIN, 1992; CHÉTELAT et al., 1993). Marrot e colaboradores (2006) demonstraram que o teste de fototoxicidade de levedura pode detectar o potencial fototóxico de vários compostos previamente relatados como indutores de efeitos colaterais dermatológicos e genotóxicos após exposição solar. Zhang, Bao e Fang (2016), Kasemets e colaboradores (2009), Pinto e colaboradores (2010); Paiva e colaboradores (2014) e Hossy e colaboradores (2017) também utilizaram *S. cerevisiae* para estudar a fototoxicidade/fotogenotoxicidade e fotoproteção de filtros UV orgânicos e inorgânicos.

Sendo assim, a avaliação da participação de filtros UV nos efeitos causados pela radiação UV nesse modelo permite a investigação dos seus potenciais fotoprotetores (SOUZA, 2009), de forma que o potencial fotoprotetor e sua segurança podem ser avaliados por meio da observação dos efeitos letais e mutagênicos induzidos tanto pela radiação em leveduras pré-tratadas com os ativos que se deseja estudar em comparação com a exposição à radiação de leveduras não tratadas (PINTO et al., 2010).

1.6.1 As cepas mutantes *ogg1*, *yno1* e *ogglyno1*

Em estudos anteriores, nosso grupo evidenciou o potencial da cepa *ogg1* em demonstrar a geração de danos oxidativos ao DNA de *S. cerevisiae* pelo amplamente usado TiO_2 em associação ao UVB (PINTO et al., 2010). Além de ser capaz de evidenciar o potencial fotomutagênico desse composto, tal cepa também foi útil em indicar o efeito antimutagênico de nanocompósitos de TiO_2 -montmorilonita em desenvolvimento, após tratamento com UVB (PAIVA et al., 2014). A aplicabilidade da cepa mutante *ogg1* vai além da avaliação de substâncias fotoprotetoras ao se mostrar capaz, inclusive, de identificar o potencial fototóxico de excipientes usados em formulações, como os parabenos e seus derivados (HOSSY et al., 2017). Uma vez que parte dos efeitos danosos da radiação UV é decorrente do efeito indireto mediado pela geração de ERO, a cepa *ogg1* de *S. cerevisiae* encontrou, ainda, função na avaliação do efeito fotoprotetor indireto de antioxidantes com potencial de compor formulações fotoprotetoras (dados submetidos).

O potencial bioindicador de eventos oxidativos induzidos pelo UV da cepa *ogg1* é decorrente da deficiência no gene *OGG1*, responsável pela codificação da enzima Ogg1 que repara lesões de caráter oxidativo como a 8-oxoG em bases oxidadas, tornando-se cepas deficientes nesta enzima mais sensíveis às lesões oxidativas (THOMAS et al., 1997; PADULA et al., 2004).

Essas evidências reforçam a ideia de que a cepa *ogg1* é uma ferramenta interessante para avaliar eficácia (em termos de fotoproteção) e segurança (em termos de fotomutagênese/fotogenotoxicidade) tanto de filtros UV já usados em formulações quanto de novos candidatos. Entretanto, após uma rápida caracterização da resposta fotobiológica da cepa *ogg1* ao UVA isolado (lâmpada isolada) e a um simulador solar, ela não se mostrou responsiva à essas fontes de radiação a ponto de avaliar inequivocadamente os parâmetros citados anteriormente (dados não apresentados), motivando a busca por novas cepas que cobrissem todo o espectro UVA e UVB.

Nesse sentido, desde que foi descoberto que, em levedura, o gene *YNO1* codifica uma NADPH oxidase ortóloga às NOXs humanas, chamada Yno1 (RINNERTHALER et al., 2012), a investigação do potencial bioindicador de uma cepa deficiente nesse sistema foi encorajada. A Yno1 é uma NADPH oxidase de levedura que produz $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 de forma indireta para sinalizar uma resposta à geração de ERO endógena ou exógena, como por exemplo pela radiação UVA e UVB. Então, nosso grupo de estudo obteve, por meio de técnicas de recombinação homóloga e micromanipulação (SHERMAN; HICKS, 1991), não somente a cepa *yno1*, como também a cepa duplo mutante *ogg1yno1*, para fazer parte da coleção de cepas úteis para predizer eficácia e segurança de fotoprotetores.

1.7 Justificativa e relevância à luz da vigilância sanitária

Tendo em vista a importância da pesquisa laboratorial científica no aperfeiçoamento de técnicas de avaliação da qualidade de produtos e no desenvolvimento de novos testes ou ensaios que venham a suprir ou complementar as limitações dos já existentes, o projeto em questão tem como justificativa proporcionar inovações metodológicas no âmbito da Vigilância Sanitária, partindo-se do princípio que a associação deste candidato a teste alternativo aos preconizados pela ANVISA e aos já validados pela comunidade científica implicará numa maior garantia de que sejam oferecidos produtos de qualidade e seguros à saúde da população.

Em virtude do exposto, torna-se fundamental o desenvolvimento de testes rápidos e eficazes que avaliem o potencial fotoprotetor e fotomutagênico de substâncias que compõe formulações tópicas que venham, eventualmente, causar efeitos fototóxicos indesejáveis quando os indivíduos se expõem à luz solar, como é o caso dos fotoprotetores.

Nesse sentido, a aplicação das informações geradas neste projeto prevê a utilização de *S. cerevisiae* tratadas ou não com substâncias fotoprotetoras em associação a diferentes fontes de irradiação ultravioleta (lâmpadas isoladas de UVA e UVB e Luz Solar Simulada), a fim de se desenvolver um teste rápido que permitirá a avaliação (*screening*) da eficácia e segurança de substâncias presentes em formulações fotoprotetoras tópicas em etapas pré-clínicas de estudo, atendendo a exigências recentes das agências regulatórias, que vêm preconizando testes alternativos de cito e genotoxicidade, utilizando bactérias e leveduras (GOCKE et al., 2000).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Propor um sistema teste *in vitro* com *S. cerevisiae* como *screening* para avaliação da eficácia e segurança de substâncias com finalidade fotoprotetora.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade (letalidade/sobrevivência e mutagênese) das cepas FF18733, CD138, AWP001 e LPW002 de *S. cerevisiae* ao UVA, UVB e Luz Solar Simulada (LSS);
- Determinar a citotoxicidade e mutagenicidade, na ausência de irradiação, das substâncias fotoprotetoras octil metoxicinamato (OMC), octocrileno (OCR) e dióxido de titânio (TiO₂) nas cepas de *S. cerevisiae* que apresentarem melhor potencial bioindicador após avaliação da sensibilidade na etapa anterior.
- Determinar a sobrevivência celular e mutagênese das cepas de *S. cerevisiae* induzidas pela irradiação com as diferentes fontes (UVA, UVB e LSS) na presença das substâncias testadas (OMC, OCR e TiO₂).
- Comparar e analisar os efeitos biológicos da irradiação com as diferentes fontes UV;
- Eleger o(s) melhor(es) sistema(s) cepa-fonte para se avaliar eficácia e segurança de fotoproteção de substâncias fotoprotetoras em *S. cerevisiae*.

3 METODOLOGIA

3.1 Material

3.1.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

As diferentes cepas de *S. cerevisiae* proficiente e deficientes em distintos sistemas de reparo e tolerância a dano no DNA celular usadas nesse estudo, assim como seus respectivos genótipos, fenótipos e origens, estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* usadas no estudo

Designação das cepas	Genótipo relevante	Fenótipo	Origem
FF18733	MATa, <i>leu2-3-112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>his7-2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys1-1</i>	Selvagem (wt)	F. Fabre (Fontenay aux Roses, France)
CD138	FF18733 com <i>ogg1::TRP1</i>	<i>ogg1</i> Δ	D. Thomas (CNRS, Gif/Yvette, France)
AWP001	FF18733 com <i>yno1::KanMX6</i>	<i>yno1</i> Δ	Aquino, Wilmart e Pádula (UFRJ, RJ, Brasil)
LPW002	FF18733 com <i>ogg1::TRP1</i> <i>yno1::KanMX6</i>	<i>ogg1yno1</i> Δ	Leitão, Pádula e Wilmart (UFRJ, RJ, Brasil)

CNRS: *Centre National de la Recherche Scientifique*; UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro
Fonte: (Do autor, 2018).

Toda a coleção de cepas do laboratório é estocada em glicerol 87% 1:1 em meio YPG líquido e mantida a - 80°C.

As cepas empregadas nesse estudo foram selecionadas em função de suas características genóticas, de forma que a proficiência ou deficiência de alguns sistemas de reparo e tolerância a danos celulares possam servir de indicativo da ocorrência de lesões mutagênicas no DNA frente ao tratamento com agentes genotóxicos, sejam eles físicos (radiação UV) ou químicos (filtros UV).

A cepa de *S. cerevisiae* selvagem FF18733 é proficiente em todos os sistemas de reparo de DNA, permitindo a comparação dos efeitos dos agentes externos, irradiação e substâncias testadas, quando na presença ou ausência de mecanismos de reparo (THOMAS et al., 1997). A cepa mutante CD138 (*ogg1*) é deficiente no gene *OGG1*, responsável pela codificação da enzima Ogg1 que repara lesões de caráter oxidativo como a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG)

em bases oxidadas, portanto, cepas deficientes nesta enzima, acumulam transversões GC → TA devido à ausência de reparo, sendo, portanto, mais sensível às lesões oxidativas (THOMAS et al., 1997; PADULA et al., 2004). Por sua vez, a cepa mutante AWP001 (*yno1*) é deficiente no gene *YNO1* que codifica a proteína Yno1. A proteína Yno1 é uma NADPH oxidase de levedura, ortóloga às NADPH oxidases humanas, responsável por produzir $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 de forma indireta para sinalizar a resposta a eventos endógenos ou exógenos, tais como a geração de ROS em resposta à exposição à radiação UVA ou UVB. Portanto, na ausência dessa proteína, as células tendem a ficar sensíveis à apoptose e às mutações, evidenciando a ocorrência de danos no DNA induzidos por esses agentes externos (AGUIRRE; LAMBETH, 2010; RINNERTHALER et al., 2012). E, finalmente, a cepa LPW002, deficiente no sistema de reparo mediado tanto pela proteína Ogg1 quanto pela proteína Yno1, foi escolhida para compor o *set* de cepas por demonstrar-se particularmente interessante como potencial bioindicadora de sensibilidade a danos oxidativos.

3.1.2 Meios de cultivo

- Meio *Yeast Nitrogen Base* (YNBD) sólido

7 g de YNB (Difco™), 20 g de glicose (Merck) e 20 g de ágar (Bacto™) para 1 L de água bidestilada. Autoclavou-se por 20 minutos à pressão de 1 atmosfera. Acrescentou-se 10 mL dos aminoácidos histidina (2%), leucina (1%), triptofano (0,2%), uracila (0,2%) e lisina (0,4%), de acordo com a auxotrofia da cepa (THOMAS et al, 1997). Observação: para determinar a mutagênese, acrescentou-se 60 mg/L de canavanina (Sigma).

- Meio *Yeast Peptone Glucose* (YPG) líquido e sólido

10 g de extrato de levedura (Bacto™) e 10 g de bacto de peptona (Bacto™) e 20 g de glicose (Merck) para 1 L de água bidestilada. Para o meio sólido, acrescentou-se 20 g/L de ágar (Bacto™). Autoclavou-se por 20 minutos à pressão de 1 atmosfera (THOMAS et al, 1997).

3.1.3 Fontes de radiação ultravioleta

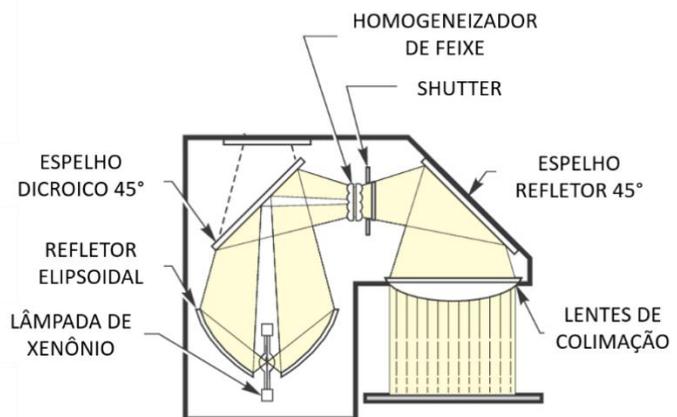
Foram empregadas três diferentes fontes de radiação UV: lâmpada isolada de radiação UVA, lâmpada isolada de radiação UVB e simulador solar.

Para irradiação com UVA foi usado um aparato Vilber-Loumart VL-215 LM com lâmpadas de 15 W com comprimento de onda entre 320-400 nm, com pico em 365 nm (GARCÍA-CELA et al., 2015).

Para irradiação com UVB foi usado um aparato Vilber-Loumart VL-215 LM com lâmpadas de 15 W com comprimento de onda entre 280-320 nm, com pico em 312 nm (PINTO et al., 2010; PAIVA et al., 2014).

Para simular a radiação solar, segundo protocolo descrito por Hossy e col. (2017), foi usado simulador solar da marca Oriel/Newport®, modelo 91192 (Figura 7), com lâmpada de xenônio e potência de até 1000 W contendo o filtro (Newport) AMO atenuador atmosférico, que boqueia a emissão de infravermelho e o filtro 87066, que bloqueia parte da luz visível. Ao espectro emitido pelo simulador solar quando em associação aos filtros AMO e 87066, deu-se o nome de Luz Solar Simulada (LSS), portanto, composta por visível (400 a 700 nm), UVA (320 a 400 nm) e UVB (280 a 320 nm), os últimos na proporção de aproximadamente 17:1 (UVA:UVB), permitindo a mimetização de condições equivalentes à exposição solar ambiental, de forma controlada, sem as flutuações sazonais encontradas quando se utiliza a exposição direta ao sol em diferentes períodos do ano.

Figura 7 - Foto do Simulador Solar ORIEL/NEWPORT® emitindo Luz Solar Simulada (LSS) e representação esquemática dos seus compartimentos internos



Fonte: (<https://www.newport.com/f/flood-exposure-sources>, adaptado. Acesso em: 04 fev. 2019).

Um dosímetro Vilber-Loumart VLX-3W acoplado a uma fotocélula CX-365 e CX-312 foi usado para aferir taxa de dose da radiação UVA e UVB, respectivamente.

3.1.4 Substâncias fotoprotetoras

As substâncias fotoprotetoras testadas no modelo experimental sugerido, na presença ou ausência de irradiação, foram o octil metoxicinamato (OMC) (Sarfam[®]), o octocrileno (OCR) (Sarfam[®]) e o dióxido de titânio (TiO₂) (Eusolex[®] T, tamanho médio de partícula 618 nm - PdI 0.407, Merck, como descrito no Anexo A). Foi preparada uma solução-mãe de 10 mg dos filtros em 1 mL de água bidestilada estéril e armazenada em refrigerador (aproximadamente 2°C) em eppendorfs. Para a dispersão dos filtros foi utilizado o polissorbató Tween[®] 80 (CAS 9005-65-6 | 817061 - Merck Millipore). Os três filtros são permitidos (BRASIL, 2016) e comumente explorados nas formulações comerciais (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2016).

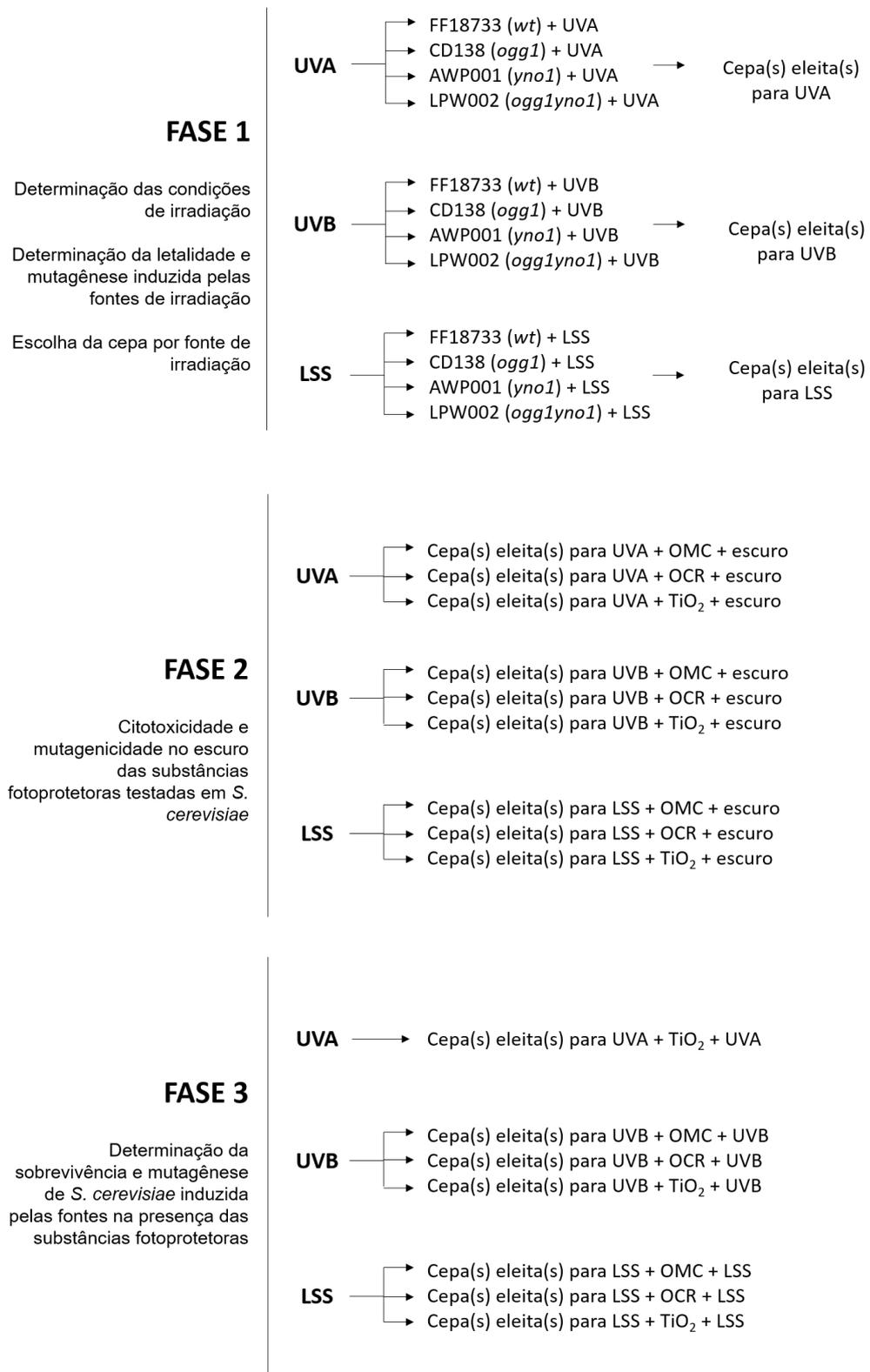
3.2 Métodos

A fim de avaliar a resposta das 4 cepas de *S. cerevisiae* da coleção às três diferentes fontes de irradiação, para, então, escolher o melhor sistema cepa-fonte indicador de eficácia e segurança e, então, desafiá-lo com a adição das substâncias fotoprotetoras, a metodologia do estudo obedeceu a um fluxograma composto por 3 fases (Figura 8).

A metodologia geral do estudo seguiu os critérios básicos sugeridos para testes de genotoxicidade *in vitro* preconizados pelo IWGTP, descritos anteriormente (GOCKE et al., 2000) e consistiu em basicamente três fases.

Abaixo encontra-se representado o fluxograma das fases do estudo (Figura 8). A metodologia adotada em cada fase será descrita nos itens 3.2.1; 3.2.2; 3.2.3; 3.2.4; 3.2.5 subsequentes.

Figura 8 - Fluxograma da metodologia do estudo.



Fluxograma de fases do estudo compreendendo as fontes de radiação lâmpada de ultravioleta A (UVA) isolada, lâmpada de ultravioleta B (UVB) isolada e simulador solar emitindo Luz Solar Simulada (LSS); as cepas de *S. cerevisiae* FF18733 (*wt*), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) e os filtros UV octil metoxicinamato (OMC), octocrileno (OCR) e dióxido de titânio (TiO₂).
 fonte: (Do autor, 2018).

3.2.1 Fase 1: Determinação das condições de irradiação

A taxa de dose das radiações UVA e UVB das lâmpadas isoladas e em conjunto, expostas pela LSS, foi aferida por um dosímetro Vilber-Loumart VLX-3W acoplado a uma fotocélula CX-365 para detecção da radiação UVA e fotocélula CX-312 para a detecção da radiação UVB.

Uma vez tendo-se determinado a taxa de dose de cada espectro através do dosímetro e fotocélulas correspondentes, calculou-se o tempo de exposição ou irradiação necessário para se obter cada dose na qual serão retiradas alíquotas para análise. Esse cálculo foi feito a partir da seguinte equação:

$$t_{min} = \frac{\text{dose desejada (kJ/m}^2\text{)} \times 1000}{\text{taxa de dose medida (J/m}^2\text{/s)} \times 60}$$

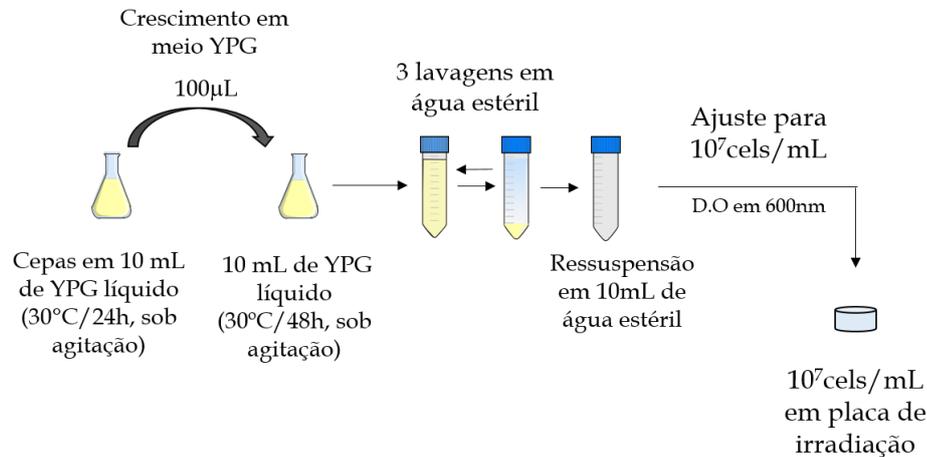
3.2.2 Fase 1: Determinação da letalidade e mutagênese induzida pelas fontes de radiação

O estoque das cepas em glicerol 87% 1:1 em meio YPG líquido foi mantido a - 80°C e a cada 2 meses uma pequena massa dessas células foi descongelada e teve sua auxotrofia verificada a fim de confirmar o genótipo/fenótipo de cada cepa. Após confirmação dos respectivos genótipos/fenótipos, as cepas descongeladas foram plaqueadas em meio YPG sólido e, após crescimento em estufa 30°C, foram mantidas em refrigeradores 2°C para servirem de estoque temporário para a realização dos experimentos durante este período (2 meses), até um novo descongelamento a partir do estoque original armazenado no freezer -80°C.

Para a determinação da letalidade e mutagênese induzida pelas fontes de radiação, procedeu-se com o preparo inicial comum a todos os experimentos (Figura 9) que consistiu em cultivar as cepas retiradas do estoque temporário a 2°C em 10 mL de meio YPG líquido (30°C, sob agitação por 24 horas), em seguida, foram repicados 100 µL desse cultivo em novos 10 mL de meio YPG líquido (30°C, sob agitação por 48 horas) até a fase estacionária de crescimento. Posteriormente, as culturas foram lavadas por três vezes com água estéril e centrifugadas por 10 minutos a 5,8 g em temperatura ambiente e ressuspensas em 10 mL de água estéril. A densidade ótica foi verificada em 600 nm, em espectrofotômetro. As células foram diluídas a 10⁷ células/mL (o que corresponde a densidade ótica igual a 1). Essa suspensão celular em um volume final de 10 mL foi, então, disposta em placas de irradiação de vidro de 5 cm de diâmetro.

A Figura 9 representa esquematicamente a metodologia do preparo inicial da suspensão celular. Tal protocolo é comum a todos os experimentos das demais fases.

Figura 9 - Preparo inicial, comum a todos os experimentos, da suspensão celular



YPG: meio *Yeast Peptone Glucose*; D.O : Densidade ótica
 Fonte: (Do autor, 2018).

Uma vez finalizado este preparo inicial, as células estão prontas para a irradiação. Para tal, as suspensões celulares das cepas foram expostas a doses crescentes de cada fonte de radiação (conforme metodologia descrita no item 3.2.1), em placas de Petri de vidro (5 cm de diâmetro) contendo 10⁷ células/mL com volume final de 10 mL, em água estéril. Após cada dose e tempo de irradiação, foi retirada uma alíquota em duplicata da suspensão celular irradiada para o plaqueamento.

Para a avaliação da letalidade/sobrevivência celular, a alíquota retirada em cada tempo de irradiação foi de 100 µL e, então, foi diluída em 900 µL de água estéril em tubos de ensaio. Foram feitas duas ou mais diluições na mesma proporção a fim de viabilizar a contagem ideal das colônias (em torno de 100 colônias por placa) e, então, seguiu-se com o plaqueamento de 100 µL, em duplicata, em meio YPG sólido. As placas foram, então, mantidas em estufa a 30°C e as colônias foram contadas após um período de aproximadamente 96 horas. Em seguida, foi calculada a média dos resultados (mais ou menos o erro padrão) com a respectiva representação em gráficos de fração de sobrevivência (N/N₀) x dose de irradiação, em que N₀ representa o número inicial de células e N é o número de células após tratamento.

Para a avaliação da mutagênese foi adotado o sistema de resistência à canavanina. Trata-se de um sistema de **mutagênese direta** que detecta todas as mutações que inativam o gene da arginina permease, *CANI*. Este gene presente na levedura *S. cerevisiae* codifica uma arginina-

permease (Can1p), responsável pela incorporação de arginina. No entanto, esta permease também transporta o análogo tóxico da arginina, a L-canavanina (L-can), adicionado intencionalmente no meio de cultura. As células que possuem o gene *CAN1* não funcionando (*can1*), devido à ocorrência de mutações gênicas induzidas pela radiação UV, por exemplo, irão sobreviver, pois não utilizarão a canavanina do meio. O gene *CAN1* é utilizado em estudos de mutagênese por meio do cálculo da frequência de mutações em uma determinada população celular antes e depois de um desafio supostamente genotóxico. Este sistema de seleção é possível, uma vez que as cepas utilizadas no trabalho são prototróficas para arginina (PADULA et al., 2004; DZIERZBICKI et al., 2004; SOUZA, 2009; PINTO et al., 2010).

Nesse sentido, paralelamente à avaliação da letalidade/sobrevivência, para análise da mutagênese foi retirada uma alíquota em duplicata de 200 µL da suspensão irradiada, nos mesmos tempos de irradiação, e foi plaqueada em meio YNBD sólido contendo 60 mg/mL de canavanina (PADULA et al., 2004). As placas foram mantidas em estufa 30°C e as colônias de mutantes resistentes a canavanina (Can^R) foram contadas após um período de aproximadamente 96 horas. Foi calculada a média dos resultados (mais ou menos o erro padrão) em tabelas de Can^R/10⁷ células x dose, somente na dose letal de 63% (DL₆₃). Também foram calculadas a mutagênese espontânea de cada cepa no tempo 0' e seu respectivo incremento relativo de mutagênese [(mutantes Can^R/10⁷ células na DL₆₃) / (Mutagênese espontânea/10⁷ células)] (PINTO et al, 2010; PAIVA et al, 2014).

Quando são analisadas amostras com diferentes origens e sensibilidades de reparo do DNA, uma das melhores abordagens para comparar sobrevivência e mutagênese é a estratégia de **um golpe letal por célula**. Neste modelo, com 37% de sobrevivência, o número médio de golpes letais por célula (GLC) numa dada população é 1. Isto estabelece um limiar para eventos letais e tende a maximizar a mutagênese. Porém, o conceito de **golpe letal** não significa o número real de lesões que levam à morte celular, pois isso dependerá diretamente da capacidade de reparo de uma determinada cepa. Se a mutagênese é avaliada em níveis mais elevados do que 37% de sobrevivência, a quantidade de danos induzidos no DNA será menor que 1 GLC e favorecerá a sobrevivência celular, quando as lesões tendem, também, a ser geridas por sistemas de reparo que levam a baixo ou sequer qualquer nível de mutagênese induzida. Por outro lado, sobrevivências muito inferiores a 37%, nas quais o número de GLC é maior que 1, haverá favorecimento da morte celular em detrimento dos eventos de mutação (KOCH-PAIZ et al., 2004).

Todos os experimentos de avaliação da letalidade/sobrevivência e mutagênese induzida pelas fontes de irradiação foram realizados de forma independente, por, pelo menos, cinco vezes (PINTO et al., 2010; PAIVA et al., 2014).

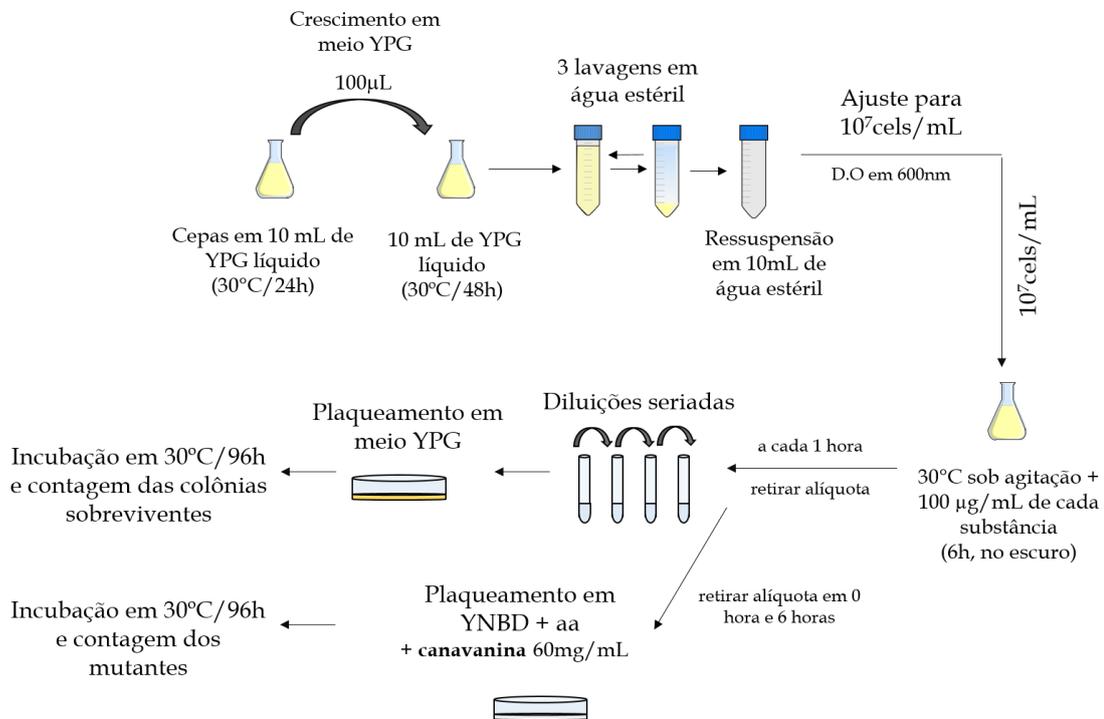
3.2.3 Fase 2: Citotoxicidade e mutagenicidade no escuro das substâncias fotoprotetoras testadas em *S. cerevisiae*

Após preparo inicial da suspensão celular descrito anteriormente (Figura 9), foi realizado o tratamento das cepas para análise da citotoxicidade no escuro na presença das substâncias, a partir de uma suspensão contendo 10^7 células/mL de cada uma das cepas com adição de 100 µg/mL de cada substância fotoprotetora no volume final de 10 mL de água estéril, a 30°C sob agitação em erlenmeyer durante 6 horas na ausência de qualquer fonte de luz. Para a determinação da sobrevivência celular, a cada 1 hora de tratamento foi retirada uma alíquota em duplicata de 100 µL da suspensão tratada com as substâncias fotoprotetoras e diluída em 900 µL de água estéril. Foram feitas três ou mais diluições seriadas em água estéril a fim de viabilizar a contagem das colônias sobreviventes e, em seguida, procedeu-se com o plaqueamento, em duplicata, em meio YPG sólido. A mutagênese foi analisada no início e ao fim das 6 horas de tratamento plaqueando-se as alíquotas em meio YNBD contendo 60 mg/L de canavanina. A contagem das colônias de sobreviventes e mutantes Can^R se deu após 96 horas de incubação a 30°C (Figura 10).

A média dos resultados (mais ou menos o erro padrão) foi representada em gráficos de fração de sobrevivência (N/N0) x dose de irradiação. Também foi calculada a média dos resultados (mais ou menos o erro padrão) de $\text{Can}^R/10^7$ células x dose (PINTO et al, 2010; PAIVA et al, 2014).

Todos os experimentos de citotoxicidade foram realizados de forma independente, por, pelo menos, cinco vezes (PINTO et al., 2010; PAIVA et al., 2014).

Figura 10 - Esquema da metodologia para avaliação da citotoxicidade em levedura das substâncias testadas



aa: aminoácidos; D.O: Densidade ótica; YNBD: meio *Yeast Nitrogen Base*; YPG: meio *Yeast Peptone Glucose*
 Fonte: (Do autor, 2019).

3.2.4 Fase 3: Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pelas fontes de radiação na presença das substâncias fotoprotetoras

Para a determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pelas fontes de radiação na presença das substâncias testadas, procedeu-se com o preparo inicial comum a todos os experimentos (Figura 9), com posterior exposição a doses crescentes de UVA, UVB ou LSS, conforme metodologia descrita no item 3.2.1, desta vez na presença de 100 µg/mL de cada substância fotoprotetora testada.

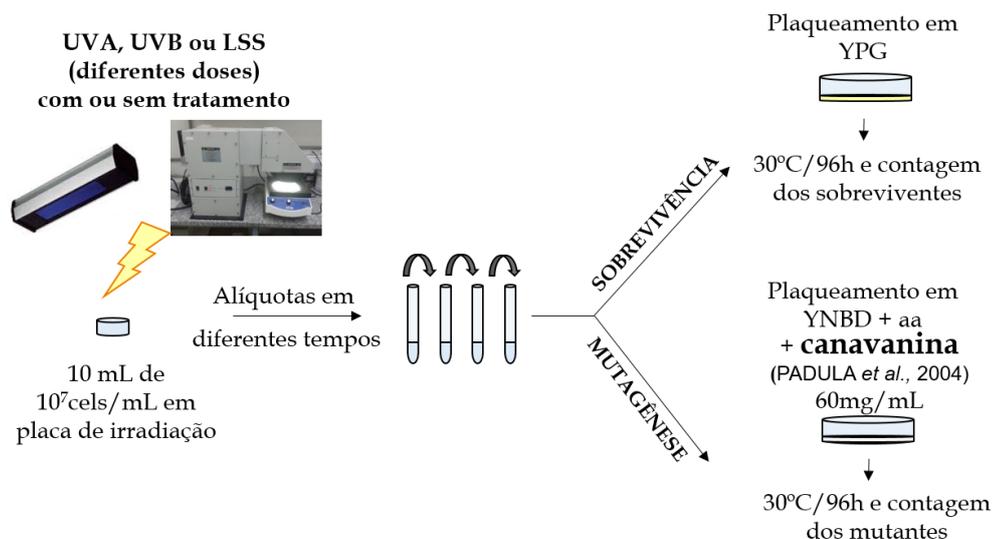
Para avaliação da sobrevivência induzida pelas fontes de irradiação na presença das substâncias testadas, após cada dose/tempo de irradiação, foi retirada uma alíquota em duplicata de 100 µL da suspensão celular tratada e procedeu-se com duas ou mais diluições em 900 µL água estéril. O plaqueamento, em duplicata, se deu, também, em meio YPG sólido. As placas foram mantidas em estufa a 30°C e a contagem das colônias e montagem de gráficos de fração de sobrevivência (N/N₀) x dose de irradiação procedeu-se da mesma forma das outras metodologias.

Assim como para os outros experimentos, para análise da mutagênese, também foi utilizado o sistema de resistência à canavanina (PADULA et al., 2004). Para tal, nas mesmas doses/tempos de irradiação foi, também, retirada uma alíquota de 200 μL da suspensão e plaqueadas, em duplicata, em meio YNBD contendo 60 mg/mL de canavanina. Tal como nos outros experimentos, a média dos resultados (mais ou menos o erro padrão) foi calculada em gráficos de $\text{Can}^{\text{R}}/10^7$ células x dose.

Os experimentos dessa fase foram realizados de forma independente, por, pelo menos, cinco vezes (PINTO et al., 2010; PAIVA et al., 2014).

A Figura 11 resume a irradiação das cepas com as diferentes fontes, com e sem tratamento com as substâncias fotoprotetoras testadas.

Figura 11 - Irradiação das cepas com diferentes fontes de radiação, com e sem tratamento com as substâncias fotoprotetoras testadas e metodologia para a avaliação da sobrevivência celular e mutagênese após irradiação



UVA: radiação ultravioleta A; UVB: radiação ultravioleta B; LSS: luz solar simulada; YNBD: meio *Yeast Nitrogen Base*; YPG: meio *Yeast Peptone Glucose*; aa: aminoácidos.

Fonte: (Do autor, 2019).

3.2.5 Tratamento estatístico

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism version 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Foram adotados os testes não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons) para demonstrar as diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação das condições de irradiação

A taxa de dose de UVA aferida na lâmpada isolada de UVA foi de 30 J/m²/s. A taxa de dose de UVB na lâmpada isolada de UVB foi de 15 J/m²/s. E, no simulador solar a taxa de dose de UVA e de UVB aferidas por meio do dosímetro foram 21 J/m²/s e 1.2 J/m²/s, respectivamente.

A Tabela 4 adaptada de Rurr-Cardoso e colaboradores (2018), que apresenta dados referentes às condições ambientais de radiação solar UVA e UVB em um dia de sol intenso no verão na cidade do Rio de Janeiro/RJ, serviu de base para escolher as doses finais acumuladas de cada irradiação.

Tabela 4 - Variações das taxas de dose de ultravioleta A e ultravioleta B da radiação solar em um dia de sol de verão na cidade do Rio de Janeiro/RJ no período de 10:00-16:00 h

Horário (h)	UVA (J/m ² /s)	UVB (J/m ² /s)
10:00	98,00	6,35
10:30	96,60	7,80
11:00	89,16	7,50
11:30	104,02	8,15
12:00	96,60	7,13
12:30	104,02	8,20
13:00	81,73	5,60
13:30	74,30	4,00
14:00	52,00	2,90
14:30	42,00	1,71
15:00	37,00	1,50
15:30	33,00	1,20
16:00	24,00	0,80

UVA: radiação ultravioleta A; UVB : radiação ultravioleta B

Fonte: (Adaptado de RURR-CARDOSO et al., 2018).

De acordo a Tabela 4, se uma pessoa se expõe diretamente ao sol às 12 h no verão, ela terá recebido uma taxa de dose de 96,60 J/m²/s de UVA e de 7,13 J/m²/s de UVB e, supondo uma exposição de 1 h e 30 minutos (ou 5400 segundos), a dose final acumulada será de, aproximadamente, 521 kJ/m² de UVA e 38 kJ/m² de UVB. Sendo assim, na irradiação com lâmpada isolada de UVA a dose final acumulada adotada foi de 500 kJ/m² de UVA e na irradiação com a lâmpada isolada de UVB optou-se por uma dose final acumulada de 30 kJ/m²

de UVB. Cabe ressaltar que tais doses finais acumuladas já foram, também, usadas em estudos descritos por Pinto e colaboradores (2010) e Kozmin e colaboradores (2005).

Por sua vez, de acordo com a Tabela 4, uma exposição de 30 minutos ao sol de 12 h no Rio de Janeiro resulta numa dose final acumulada de aproximadamente 176 kJ/m² de UVA e de 12 kJ/m² de UVB, orientando para a escolha das doses finais acumuladas de 166 kJ/m² de UVA e 10 kJ/m² de UVB contidas na irradiação com a LSS.

Uma vez tendo determinado a taxa de dose e a dose final acumulada de cada irradiação, a equação descrita no item 3.2.1 foi, então, usada para calcular o tempo de exposição ou irradiação necessário para se obter cada dose na qual serão retiradas alíquotas para análise. Após o cálculo foi possível obter os tempos de irradiação, para cada fonte, resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Doses de ultravioleta A (UVA), ultravioleta B (UVB) e de UVA+ UVB contidos na Luz Solar Simulada (LSS) e seus respectivos tempos de irradiação

Fonte de radiação ultravioleta						
UVA		UVB		LSS		
Doses de UVA (kJ/m ²)	Tempos de irradiação de UVA	Doses de UVB (kJ/m ²)	Tempos de irradiação de UVB	Doses de UVB na LSS (kJ/m ²)	Doses de UVA na LSS (kJ/m ²)	Tempos de irradiação de UVB
0	0' 00"	0	0' 00"	0	0	0' 00"
100	55' 33"	5	5' 33"	2.5	41.64	34' 42"
200	1 h 51'	10	11' 7"	3.0	49.98	41' 39"
300	2 h 46' 12"	15	16' 40"	4.0	66.70	55' 35"
350	3 h 14' 24"	20	22' 13"	5.0	83.30	1 h 9' 25"
400	3 h 42'	25	27' 46"	7.5	124.98	1 h 44' 9"
450	4 h 9' 36"	30	33' 20"	10.0	166.64	2 h 18' 52"
500	4 h 37' 12"					

UVA: radiação ultravioleta A; UVB: radiação ultravioleta B; LSS: luz solar simulada
 Fonte: (Do autor, 2018).

Uma grande crítica a respeito dos testes *in vitro* que envolvem exposição a alguma fonte de radiação é que, na maioria das vezes, devido a sensibilidade dos modelos celulares, a taxa de dose e o tempo de irradiação não são compatíveis às condições ambientais de exposição da população (GOCKE et al., 2000; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004). Nesse sentido, uma das características das cepas de *S. cerevisiae* que favorece seu uso em testes desse perfil é sua resistência (determinada neste trabalho) a doses e tempos de exposição ambientais de luz UV.

Além de ter contribuído para o embasamento da escolha das doses finais acumuladas de cada irradiação, a Tabela 4 permitiu estabelecer uma correlação entre os tempos de irradiação desse estudo com tempos de exposição reais ao sol. Pode-se dizer, então, que a irradiação com as lâmpadas isoladas de UVA e de UVB realizadas nesse estudo equivalem a uma exposição

de aproximadamente 1 hora e 30 minutos ao sol de meio-dia em um dia de verão no Rio de Janeiro e a irradiação com a LSS, a uma exposição de aproximadamente 30 minutos nas mesmas condições.

4.2 Determinação da letalidade e mutagênese induzida pelas fontes de radiação

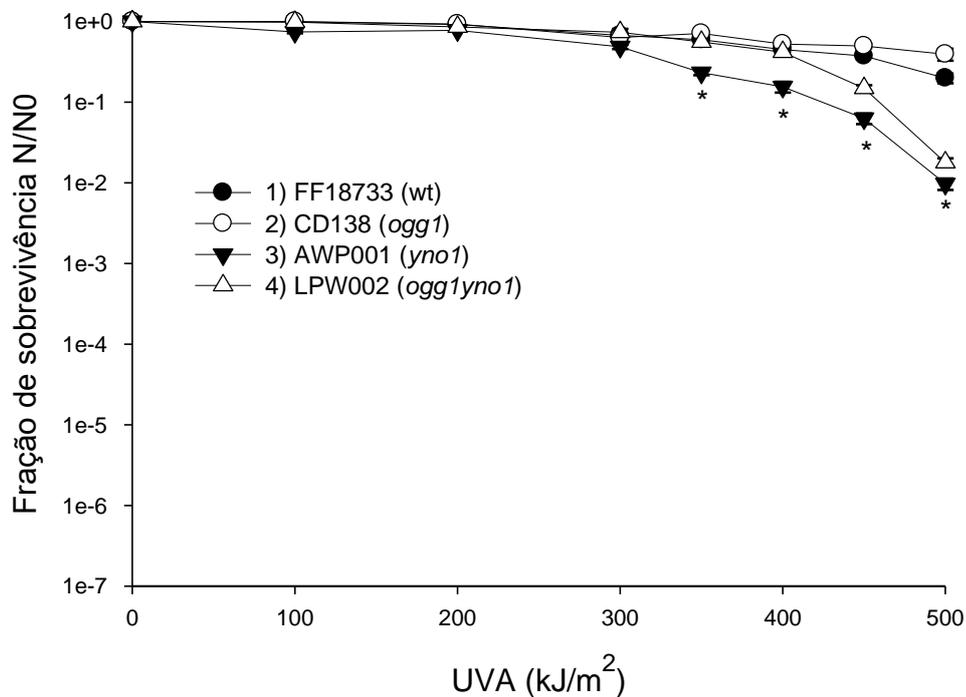
Essa etapa correspondeu à Fase 1 na qual a letalidade/sobrevivência e a mutagênese das 4 cepas de *S. cerevisiae* da coleção foram avaliadas a fim de se eleger qual delas apresentou o melhor potencial indicador de eficácia fotoprotetora e segurança em termos de foto/antifotomutagênese. Cabe ressaltar que a eficácia fotoprotetora de um fotoprotetor é evidenciada, na Fase 3, pelo incremento da sobrevivência da cepa tratada com o fotoprotetor + irradiação em comparação com a cepa não tratada com o fotoprotetor + irradiação. Dessa forma, buscou-se, então, na Fase 1, a cepa que apresentou maior sensibilidade a cada fonte de irradiação em termos de letalidade/sobrevivência a fim de que tal incremento seja melhor percebido posteriormente. O mesmo raciocínio é válido para a mutagênese.

4.2.1 Determinação da letalidade/sobrevivência e mutagênese induzida pela radiação UVA

O perfil de letalidade/sobrevivência das cepas FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*), e LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com UVA está apresentado na Figura 12 e a comparação da mutagênese espontânea e induzida (mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63}) das mesmas cepas após irradiação com UVA na DL_{63} e seus respectivos incrementos relativos de mutagênese [(mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63})/(Mutagênese espontânea/ 10^7 células)], na Tabela 6.

Todas as cepas apresentaram um perfil de sobrevivência semelhante até a dose 300 kJ/m^2 de UVA ($p > 0,05$). Por outro lado, em doses superiores a 300 kJ/m^2 de UVA, a cepa AWP001 (*yno1*) foi a mais sensível em termos de letalidade induzida pela irradiação ($p < 0,05$), sendo, portanto, a cepa com melhor potencial para indicar a eficácia de fotoproteção de substâncias fotoprotetoras para a fonte de radiação UVA (Figura 12).

Figura 12 - Perfil de letalidade/sobrevivência de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* após irradiação com ultravioleta A (UVA)



Fração de sobrevivência (N/N0) das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com ultravioleta A (UVA). Estes resultados representam a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. * estatisticamente diferentes entre as demais cepas ($p < 0,05$) – teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons. Fonte: (Do autor, 2019).

A Tabela 6 apresenta a comparação da mutagênese espontânea e induzida (mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63}) das cepas FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*), e LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com UVA na DL_{63} e seus respectivos incrementos relativos de mutagênese.

Com relação a mutagênese induzida, embora a cepa CD138 (*ogg1*) tenha apresentado o maior número absoluto de mutantes induzidos pelo tratamento com UVA, esse valor pode estar refletindo a mutagênese espontânea já elevada desta cepa (Tabela 6).

É importante destacar que a mutagênese induzida de uma determinada cepa é reflexo de sua mutagênese espontânea. De fato, sabe-se que a inativação do gene *OGG1* aumenta a incidência de transversões GC \rightarrow TA em *S. cerevisiae*, o que, por sua vez, se reflete em um fenótipo reconhecidamente mutador espontâneo da cepa CD138 (*ogg1*) (THOMAS et al., 1997; BOITEUX; GELLON; GUIBOURT, 2002; KOZMIN et al., 2005). Em contrapartida, a cepa AWP001 (*yno1*) apresenta um fenótipo espontâneo hipomutante quando comparado tanto com a cepa selvagem FF18733 quanto com as outras cepas (Tabela 6). Esse fenômeno pode ser

atribuído à atividade intrínseca de sinalização da proteína Yno1 mediada pela produção de ERO (RINNERTHALER et al., 2012), deficiente nessa cepa. Ainda nesse sentido, é importante notar que a dupla inativação dos genes *OGG1* e *YNO1* na cepa LPW002 (*ogg1yno1*) resulta numa ligeira redução da sua mutagênese espontânea quando comparada a da cepa CD138, simples mutante *ogg1*.

Tabela 6 - Mutagênese espontânea, induzida e incremento relativo de mutagênese de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na DL₆₃ após irradiação com ultravioleta A (UVA).

Cepas de <i>S. cerevisiae</i> (genótipo)	Mutagênese espontânea	Mutagênese induzida (Can ^R / 10 ⁷ células na DL ₆₃)	Incremento relativo de mutagênese
FF18733 (wt)	13 ± 2	78 ± 9	6
CD138 (<i>ogg1</i>)	138 ± 11	552 ± 71	4
AWP001 (<i>yno1</i>)	7 ± 1	154 ± 19	22 *
LPW002 (<i>ogg1yno1</i>)	113 ± 10	226 ± 29	2

Can^R: mutantes resistentes à canavanina; DL₆₃: Dose letal 63%

Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. Todas as cepas apresentaram mutagênese espontânea estatisticamente diferentes entre si (p<0,05). * estatisticamente diferente das demais (p<0,05) - teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons.

Fonte: (Do autor, 2019).

Dessa forma, já que cada cepa possui um perfil de mutagênese espontânea diferente e, que sua respectiva mutagênese induzida (Can^R/10⁷ células) é reflexo desse perfil individualizado, a melhor forma de comparar sensibilidade das cepas, nesta fase, em termos de mutagênese é pelo incremento relativo de mutagênese (PINTO et al., 2010), já que este leva em consideração os dois parâmetros citados anteriormente. Nesse sentido, um alto incremento relativo de mutagênese indica uma alta sensibilidade da cepa a danos mutagênicos induzidos por um agente físico como UVA, UVB ou LSS.

Então, de acordo com a Tabela 6, a cepa que apresentou o maior incremento relativo de mutagênese após a irradiação com UVA foi a cepa AWP001 (*yno1*) (p<0,05), que, por sua vez, foi escolhida como a cepa mais sensível para avaliar o potencial foto/antifotomutagênico de filtros UV para esta fonte de irradiação.

No que se refere a influência dos sistemas de reparo e tolerância celular, esse conjunto de resultados sugerem que a sinalização por Yno1 é relevante não só para o reparo/tolerância de lesões citotóxicas, mas também para danos mutagênicos induzidos pelo comprimento de onda da radiação UVA, diferente das demais cepas.

Embora já existam estudos na literatura científica que avaliem a resposta de cepas de *S. cerevisiae* à radiação UVA, a taxa de dose e o tempo de irradiação não são compatíveis às condições ambientais de exposição, o que, por sua vez, pode contribuir para a geração de desfechos questionáveis. Em um desses estudos, Kozmin e colaboradores (2005) avaliaram a resposta da cepa CD138 (*ogg1*), entre outras, encontrando um perfil de letalidade/sobrevivência e mutagênese mais sensível ao UVA do que o encontrado neste trabalho para a mesma cepa, adotando uma mesma dose final acumulada de 500 kJ/m² de UVA (Figura 12). Porém, enquanto em Kozmin et al., 2005, uma mesma dose acumulada de UVA foi recebida pela cepa CD138 (*ogg1*) em aproximadamente 10 minutos de irradiação (KOZMIN et al., 2005), neste trabalho, os 500 kJ/m² de UVA foram recebidos pelas cepas durante aproximadamente 4 horas de irradiação.

De acordo com a Tabela 4, apresentada no item 4.1, sob condições ambientais reais, uma dose acumulada de 500 kJ/m² de UVA pode ser alcançada após uma exposição de 1 hora e 30 minutos em um dia de sol no Rio de Janeiro (RURR-CARDOSO et al., 2018). Isso sugere que a taxa de dose usada por Kozmin (800 J/m²/s) é aproximadamente 10 vezes maior que a do sol do Rio de Janeiro. De fato, já é descrito na literatura que os danos induzidos pelo UV não estão só relacionados a dose final acumulada da irradiação, mas também, e principalmente, dependem da taxa de dose e do esquema de exposição/tempo de irradiação (CALDEIRA-DE-ARAÚJO; FAVRE, 1985; MOON; YOUN; KIM, 2000). Além disso, é válido considerar que uma grande quantidade de fótons de UVA entregues em um curto tempo de irradiação pode contribuir para uma rápida saturação dos sistemas enzimáticos de reparo ou tolerância, impactando no desfecho observado (SCHUCH et al., 2017).

Ainda nesse aspecto, enquanto o esquema de irradiação do presente estudo (~4 horas de irradiação e taxa de dose de 30 J/m²/s) é equivalente a uma exposição ambiental de 1 hora e 30 minutos ao sol do meio dia, se uma irradiação de 4 horas fosse realizada com uma taxa de dose de 800 J/m²/s (KOZMIN et al., 2005), uma dose final acumulada de 11.520 kJ/m² seria alcançada, o que, de acordo com a Tabela 4, é equivalente a uma exposição de 40 horas à luz solar ambiental.

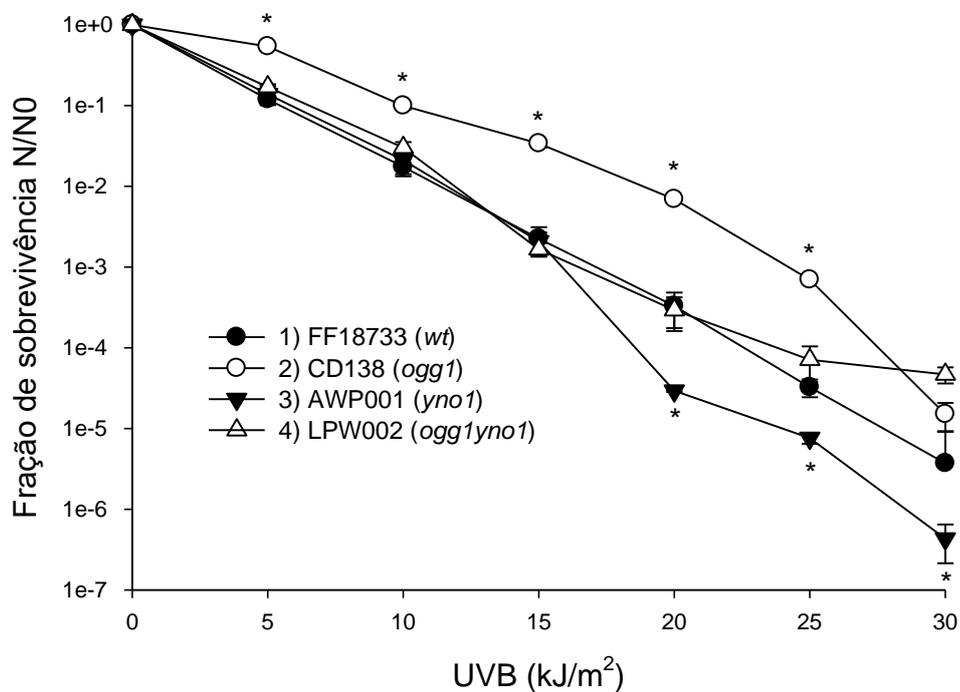
Nesse sentido, além das condições experimentais do presente estudo se aproximarem das ambientais, foi possível identificar uma cepa particularmente sensível à irradiação UVA, a cepa AWP001 (*yno1*), que mostrou melhor potencial bioindicador para avaliar tanto a eficácia fotoprotetora quanto o potencial foto/antifotomutagênico de filtros UV.

4.2.2 Determinação da letalidade/sobrevivência e mutagênese induzida pela radiação UVB

A letalidade/sobrevivência das cepas FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*), e LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com UVB está apresentada na Figura 13 e suas respectivas mutagêneses espontâneas, induzidas e incremento relativo de mutagênese, na Tabela 7.

Foi possível observar que, mais uma vez, a cepa AWP001 (*yno1*) foi a que apresentou a maior sensibilidade em termos de letalidade a altas doses de UVB ($p < 0.05$) (Figura 13).

Figura 13 - Perfil de letalidade/sobrevivência de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* após irradiação com ultravioleta B (UVB)



Fração de sobrevivência (N/N0) das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com ultravioleta B (UVB). Estes resultados representam a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. * estatisticamente diferente das demais ($p < 0,05$) - teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons.

Fonte: (Do autor, 2019).

A Tabela 7 apresenta a comparação da mutagênese espontânea e induzida (mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63}) das cepas FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*), e LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com UVB na DL_{63} e seus respectivos incrementos relativos de mutagênese.

Desta vez, com relação a mutagênese, embora a cepa LPW002 (*ogg1yno1*) tenha apresentado o maior número absoluto de mutantes induzidos por UVB, a cepa AWP001 (*yno1*) foi a que apresentou o maior incremento relativo de mutagênese para esta fonte de radiação UV

($p < 0,05$) (Tabela 7), indicando que, assim como para a radiação UVA, a sinalização de Yno1 também é importante para prevenir a letalidade e mutagênese induzida por UVB.

Tabela 7 - Mutagênese espontânea, induzida e incremento relativo de mutagênese de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na DL₆₃ após irradiação com ultravioleta B (UVB).

Cepas de <i>S. cerevisiae</i> (genótipo)	Mutagênese espontânea	Mutagênese induzida (Can ^R x 10 ⁷ células na DL ₆₃)	Incremento relativo de mutagênese
FF18733 (<i>wt</i>)	13 ± 2	1040 ± 135	80
CD138 (<i>ogg1</i>)	138 ± 11	2346 ± 304	17
AWP001 (<i>yno1</i>)	7 ± 1	1897 ± 246	271 *
LPW002 (<i>ogg1yno1</i>)	113 ± 10	7571 ± 984	67

Can^R: mutantes resistentes à canavanina; DL₆₃: Dose letal 63%

Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. Todas as cepas apresentaram mutagênese espontânea estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). *Incremento relativo de mutagênese da cepa AWP001 (*yno1*) estatisticamente diferente das demais ($p < 0,05$) - teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons.

Fonte: (Do autor, 2019).

É evidente que cada vez mais se intensificam as discussões a respeito da fidelidade dos ensaios fototóxicos com relação a aproximação às condições reais da luz do sol. Isso porque, as exigências dos testes atuais quanto ao emprego de um espectro de irradiação que se aproxime ao real não são muito rigorosas em virtude das diferentes sensibilidades dos modelos celulares ao UVB. De fato, é muito comum que os protocolos dos testes de fototoxicidade adotem uma proporção bastante reduzida ou eliminem o UVB dos espectros de irradiação através do uso de filtros que minimizem ou bloqueiem essa faixa de comprimento de onda, como é o caso do Teste de Fototoxicidade 3T3 NRU (SPIELMANN et al., 1998). Tais estratégias visam contornar a alta sensibilidade das células aos danos citotóxicos induzidos por UVB (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004).

Nesse sentido, a redução do UVB nos espectros de irradiação tem sido bastante questionada, ainda mais quando a substância a ser testada é absorvedora na faixa desse comprimento de onda (GOCKE et al., 2000). Nesse contexto, não parece sensato utilizar testes fototóxicos na presença apenas de UVA já que o efeito do UVB, maior carcinógeno ambiental (KRAEMER, 1997), seria subestimado.

Além da filtração ou bloqueio do UVB do espectro de irradiação, outra estratégia usada é a redução do tempo de irradiação para tempos de exposição incompatíveis aos usuais da população. Usando as cepas do Teste de Ames, Chételat e colaboradores (1993) demonstraram que uma exposição de 15 segundos ao sol do meio-dia em uma região da Europa já é capaz de

induzir uma duplicação do número de mutantes inicial na cepa TA100 de *S. typhimurium* adotada para o teste, mesmo sem qualquer adição de compostos potencialmente mutagênicos. Embora a cepa TA100 tenha respondido à exposição solar em termos de mutagênese, o tempo de irradiação adotado é inconsistente com a duração da exposição solar usual da população. Além disso, tal responsividade ao UV pode ser tão expressiva que pode contribuir para superestimar o potencial fotomutagênico de até mesmo um composto com fraco efeito fotoquímico (UTESCH; SPLITTGERBER, 1996).

Tendo esses fatores em vista, o uso de cepas de *S. cerevisiae* viabilizam não só uma irradiação com o espectro total da luz solar ambiental, como também suportam irradiações com o componente UVB isolado em tempos de irradiação compatíveis aos reais (item 4.1), condição impossível de ser tolerada por modelos experimentais muito sensíveis aos efeitos citotóxicos do UVB, como exposto anteriormente.

Nesse sentido, as cepas FF18733 (wt) e CD138 (*ogg1*) já foram objeto de estudo em trabalhos anteriores para avaliar o potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico de substâncias fotoprotetoras frente à irradiação UVB (PINTO et al., 2010; PAIVA et al., 2014; HOSSY et al., 2017). Porém, até aquele momento nenhuma outra cepa havia demonstrado maior sensibilidade e melhor potencial bioindicador, quando, então, as cepas AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) foram obtidas em nosso laboratório. Observando-se a Figura 13 e a Tabela 7 foi possível observar que a cepa AWP001 (*yno1*) foi a que melhor apresentou potencial bioindicador frente as outras, inclusive à CD138 (*ogg1*) que, por muito tempo, foi uma das cepas de *S. cerevisiae* mais exploradas para este fim (PINTO et al., 2010; PAIVA et al., 2014; HOSSY et al., 2017).

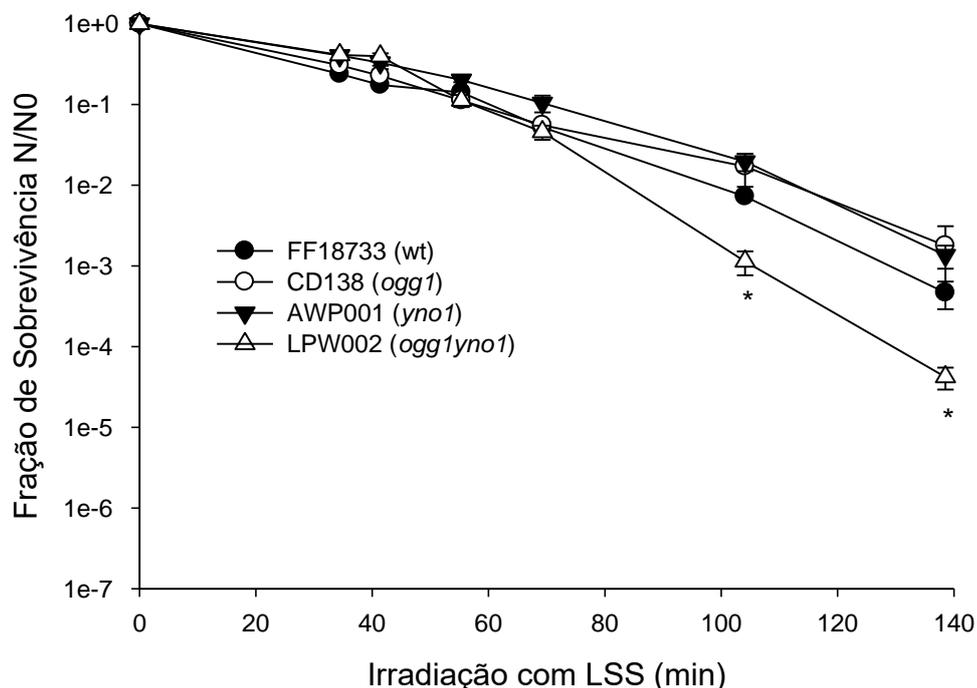
Dessa forma, mais uma vez, a cepa AWP001 (*yno1*) também foi a selecionada para avaliar tanto a eficácia fotoprotetora quanto o potencial foto/antifotomutagênico de filtros UV quando se utiliza uma lâmpada isolada de UVB como fonte de radiação.

4.2.3 Determinação da letalidade/sobrevivência e mutagênese induzida pela LSS

A Figura 14 apresenta o perfil de letalidade/sobrevivência das cepas FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) frente a exposição a LSS emitida por um simulador solar (radiação UVA+UVB). Por sua vez, a Tabela 8 compara a mutagênese espontânea, induzida e os respectivos incrementos relativos de mutagênese das cepas em questão.

A cepa LPW002 (*ogg1yno1*) foi a mais sensível à LSS em tempos de exposição superiores a 80 minutos ($p < 0,05$) (Figura 14), sugerindo que o reparo de lesões citotóxicas induzidas pela LSS depende tanto do reparo por Ogg1 quanto pela sinalização por Yno1. Sendo assim, para a LSS, a cepa LPW002 (*ogg1yno1*) foi a escolhida para avaliar o potencial fotoprotetor de filtros UV quando se utiliza um simulador solar como fonte de radiação UV.

Figura 14 - Perfil de letalidade/sobrevivência de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS) emitida por um simulador solar



Fração de sobrevivência (N/N0) das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com luz solar simulada (LSS). Estes resultados representam a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. * estatisticamente diferentes entre os outros ($p < 0,05$) - teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons
Fonte: (Do autor, 2019).

A Tabela 8 apresenta a comparação da mutagênese espontânea e induzida (mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63}) das cepas FF18733 (wt), CD138 (*ogg1*), AWP001 (*yno1*), e LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com LSS na DL_{63} e seus respectivos incrementos relativos de mutagênese.

No que se refere a avaliação da mutagênese, assim como observado para as fontes de radiação UVA e UVB, embora as cepas CD138 (*ogg1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) tenham apresentado os maiores números absolutos de mutantes induzidos pela LSS, seus respectivos incrementos relativos de mutagênese não são os maiores. Nesse sentido, levando-se em conta a comparação entre o incremento relativo de mutagênese das cepas, a mais sensível a danos

mutagênicos induzidos pela LSS foi a cepa AWP001 (*yno1*) (Tabela 8), que, portanto, foi eleita para avaliar o potencial foto/antifotomutagênico de filtros UV para esse tipo de fonte de radiação.

Tabela 8 - Mutagênese espontânea, induzida e incremento relativo de mutagênese de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na DL₆₃ após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS).

Cepas de <i>S. cerevisiae</i> (genótipo)	Mutagênese espontânea	Mutagênese induzida (Can ^R x 10 ⁷ células na DL ₆₃)	Incremento relativo de mutagênese
FF18733 (<i>wt</i>)	13 ± 2	1625 ± 211	125
CD138 (<i>ogg1</i>)	138 ± 11	2622 ± 340	19
AWP001 (<i>yno1</i>)	7 ± 1	1778 ± 234	254*
LPW002 (<i>ogg1yno1</i>)	113 ± 10	2486 ± 298	22

Can^R: mutantes resistentes à canavanina; DL₆₃: Dose letal 63%

Estes resultados representam a média de no mínimo cinco experimentos independentes. Todas as cepas apresentaram mutagênese espontânea estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). *Incremento relativo de mutagênese da cepa AWP001 (*yno1*) estatisticamente diferente das demais ($p < 0,05$).

Fonte: (Do autor, 2019).

Embora seja compreensível usar lâmpadas isoladas de UVA e UVB como fontes de radiação no desenvolvimento de novos fotoprotetores no caso de compostos que absorvem apenas uma dessas faixas de comprimento de onda, os simuladores solares ainda são as fontes mais indicadas em testes fotobiológicos em virtude de sua natureza e composição de espectro de irradiação (GOCKE et al., 2000; NODA et al., 1992). Nesse sentido, ter um teste cujo modelo celular seja responsivo não só às lâmpadas isoladas como também a um simulador solar e todo seu espectro de irradiação, como tais cepas de *S. cerevisiae*, contribui para uma avaliação mais completa e robusta da qualidade de produtos relacionados a exposição solar.

Assim, para a LSS, as cepas de *S. cerevisiae* que mostraram melhor potencial bioindicador de fotoproteção e foto/antifotomutagênese foram as cepas LPW002 (*ogg1yno1*) e AWP001 (*yno1*), respectivamente.

4.3 Citotoxicidade e mutagenicidade no escuro das substâncias fotoprotetoras testadas em *s. Cerevisiae*

Uma vez tendo-se determinado a letalidade/sobrevivência das cepas a cada fonte de irradiação, partiu-se para avaliar a citotoxicidade dos filtros UV nas cepas eleitas. Como as

cepas FF18733 (wt) e CD138 (*ogg1*) não foram escolhidas para nenhuma fonte de radiação na Fase 1, prosseguiu-se com os experimentos das Fases 2 e 3 apenas com as cepas AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*), que se mostraram mais promissoras.

A concentração dos filtros OMC, OCR e TiO₂ em todos os experimentos foi de 100 µg/ml em água estéril sob agitação. Esta concentração foi estabelecida como a máxima não-tóxica para *S. cerevisiae* em estudos anteriores, visto que nem a viabilidade celular nem a mutagênese das cepas foram alteradas (PINTO et al., 2010; PAIVA et al., 2014). Além disso, estudos anteriores reportaram que suspensões de TiO₂, por exemplo, com concentração superior a 100 µg/ml tendem a precipitar mesmo com vigorosa agitação (PINTO et al., 2010; PAIVA et al., 2014).

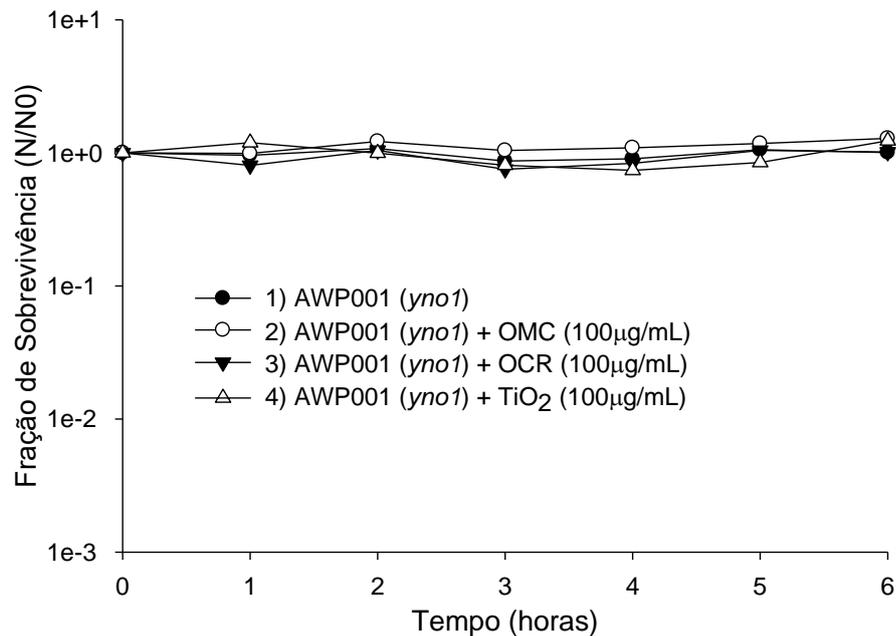
A citotoxicidade no escuro dos filtros OMC, OCR e TiO₂ na cepa AWP001 (*yno1*) está apresentada na Figura 15 e na cepa LPW002 (*ogg1yno1*), na Figura 16. Como pode ser observado nas Figuras 15 e 16 nenhum dos tratamentos com os filtros UV foram citotóxicos para as cepas AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) no escuro ($p > 0,05$).

Além disso, a mutagênese Can^R/10⁷ células da cepa AWP001 (*yno1*) ao fim do tratamento com os fotoprotetoras foi em média 8 ± 1 , sem diferenças estatísticas quando comparada com a mutagênese espontânea da mesma cepa ao início do experimento (7 ± 1) e da cepa LPW002 (*ogg1yno1*) foi de 116 ± 9 , portanto também sem diferença estatística em relação a mutagênese espontânea desta cepa (113 ± 10) ($p > 0,05$).

Sendo assim, nenhum dos tratamentos com os filtros UV foram citotóxicos ou mutagênicos para as cepas AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) no escuro ($p > 0,05$).

Tal etapa é fundamental para avaliar se as substâncias testadas possuem, por si só, na ausência de qualquer interação com radiação UV, potencial citotóxico ou mutagênico para as cepas de *S. cerevisiae*, evitando que tal propriedade seja atribuída equivocadamente a uma possível interação fotoquímica do composto com a radiação UV. Trata-se de uma etapa de controle no escuro, ou seja, etapa de exposição do modelo experimental ao composto teste na ausência de irradiação, conforme preconiza o IWGTP (GOCKE et al., 2000; BRENDLER-SCHWAAB et al., 2004).

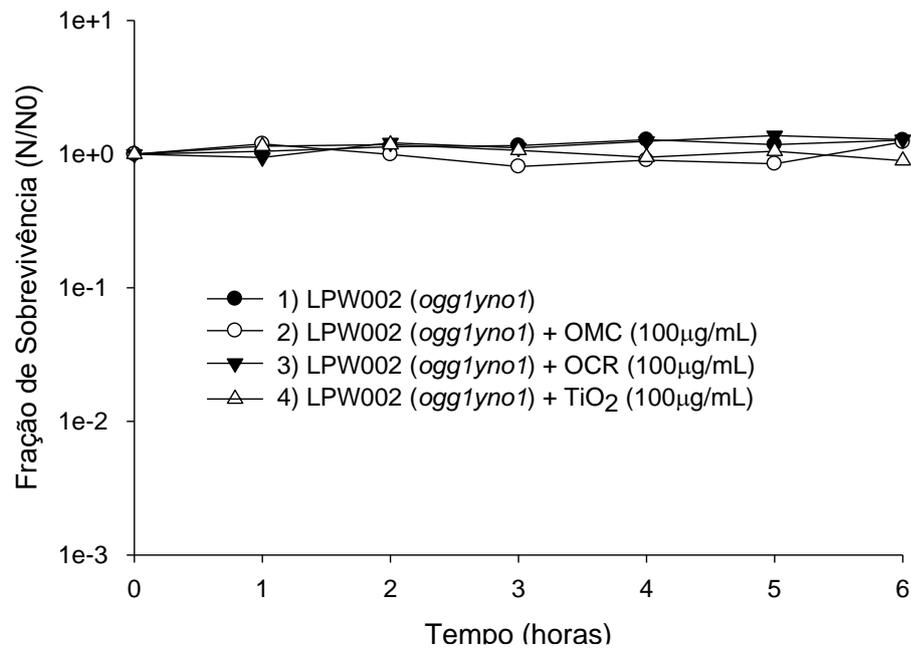
Figura 15 - Citotoxicidade no escuro das substâncias fotoprotetoras na cepa AWP001 (*yno1*)



Fração de sobrevivência (N/N0) da cepa AWP001 (*yno1*) após tratamento com 100 µg/mL dos filtros octil metoxicinamato (OMC), octocrileno (OCR) e dióxido de titânio (TiO₂) durante 6 horas no escuro. Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. Os tratamentos não apresentaram diferença estatística com relação ao controle (AWP001 (*yno1*)) ($p > 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 16 - Citotoxicidade no escuro das substâncias fotoprotetoras na cepa LPW002 (*ogg1yno1*)



Fração de sobrevivência (N/N0) da cepa LPW002 (*ogg1yno1*) após tratamento com 100 µg/mL dos filtros octil metoxicinamato (OMC), octocrileno (OCR) e dióxido de titânio (TiO₂) durante 6 horas no escuro. Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. Os tratamentos não apresentaram diferença estatística com relação ao controle (LPW002 (*ogg1yno1*)) ($p > 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Fonte: (Do autor, 2019).

4.4 Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pelas fontes de radiação na presença das substâncias fotoprotetoras

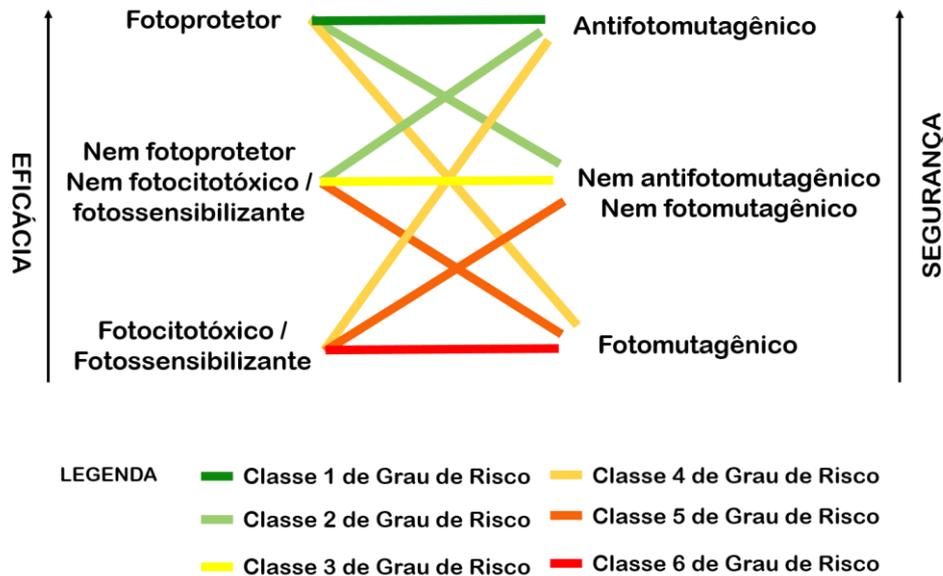
Uma vez tendo-se identificado as cepas promissoras para indicar o potencial fotoprotetor e foto/antifotomutagênico de filtros UV para cada fonte de irradiação na Fase 1 e, posteriormente, tendo-se avaliado a citotoxicidade no escuro das mesmas frente aos filtros UV escolhidos nesse estudo na Fase 2, partiu-se para a avaliação do potencial bioindicador das cepas após o tratamento com substâncias fotoprotetoras (Fase 3).

Caso a sobrevivência da cepa tratada com determinado filtro UV seja estatisticamente superior à da mesma cepa não tratada (controle), diz-se que tal substância foi fotoprotetora. Caso o tratamento com o filtro UV não favoreça o incremento da sobrevivência da cepa tratada em comparação com a não tratada, diz-se que o filtro UV não mostrou potencial fotoprotetor nem fotocitotóxico/fotosensibilizante. Por outro lado, se a sobrevivência da cepa após o tratamento com dado filtro UV for inferior estatisticamente à da cepa não tratada, diz-se que tal substância foi fotocitotóxica/fotosensibilizante.

Com relação a avaliação da mutagênese, se o número absoluto de mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63} de uma cepa tratada com o filtro UV for estatisticamente superior ao da cepa não tratada, diz-se que esse filtro UV foi fotomutagênico. Enquanto se o tratamento com dado filtro UV produzir um menor número absoluto de mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63} , diz-se que ele é antifotomutagênico. Há ainda a possibilidade do filtro UV não contribuir nem para o aumento nem para a redução do número absoluto de mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63} , sendo assim, o filtro não é nem fotomutagênico nem antifotomutagênico.

Tendo em vista essa grande variedade de desfechos, construiu-se a Figura 17 para ilustrar as diversas possibilidades de respostas quanto as propriedades dos filtros testados na Fase 3. Foi possível, ainda, propor uma avaliação qualitativa em classes de grau de risco para cada filtro UV testado ao relacionar cada combinação de desfechos com uma classe de grau de risco, representado pelas diferentes intensidades das cores verde, amarelo, laranja e vermelho. De forma que a cor verde-escuro represente uma classe 1 de grau de risco; verde-claro, uma classe 2 de grau de risco; amarela, uma classe 3 de grau de risco; laranja-claro, uma classe 4 de grau de risco; laranja-escuro, uma classe 5 de grau de risco e vermelho, uma classe 6 de grau de risco.

Figura 17 - Diversas possibilidades de desfechos das características de uma substância fotoprotetora testada na Fase 3 e suas respectivas classes de graus de risco.



Um filtro UV testado na Fase 3 pode ser: fotoprotetor e antifotomutagênico (perfil ideal de um filtro UV, cor verde escuro, classe 1 de grau de risco); fotoprotetor e inerte quanto a mutagenicidade (cor verde claro, classe 2 de grau de risco); inerte quanto a fotoproteção e antifotomutagênico (cor verde claro, classe 2 de grau de risco); inerte quanto a fotoproteção e quanto a mutagenicidade (cor amarela, classe 3 de grau de risco); fotoprotetor e fotomutagênico (cor laranja claro, classe 4 de grau de risco); fotocitotóxico/fotossensibilizante e antifotomutagênico (cor laranja claro, classe 4 de grau de risco); inerte quanto a fotoproteção e fotomutagênico (cor laranja escuro, classe 5 de grau de risco); fotocitotóxico/fotossensibilizante e inerte quanto a mutagenicidade (cor laranja escuro, classe 5 de grau de risco) e fotocitotóxico/fotossensibilizante e fotomutagênico (pior caso, cor vermelha, classe 6 de grau de risco).

Fonte: (Do autor, 2019).

Cabe ressaltar que, no caso da Fase 3, a comparação do número absoluto de mutantes é válida uma vez que nesta fase estamos lidando com a observação do efeito dos tratamentos em uma mesma cepa, que apresenta, portanto, um mesmo perfil de inicial mutagênese espontânea, dispensando a necessidade de usar o incremento relativo de mutagênese para fins de comparação, como foi necessário na Fase 1, na qual se comparou a mutagênese induzida de diferentes cepas.

4.4.1 Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pela radiação UVA na presença das substâncias fotoprotetoras

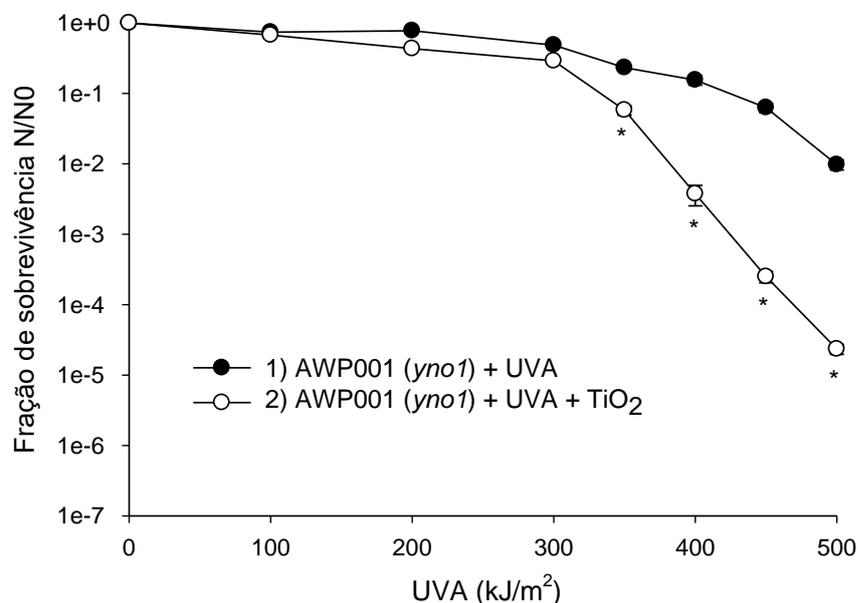
Inicialmente, antes de apresentar os resultados propriamente ditos, é importante esclarecer que dos três filtros UV usados nesse projeto, o único com propriedades de reflexão e que absorve, consideravelmente, na faixa do UVA é o TiO₂ (Tabela 1; YOUNG; CLAVEAU;

ROSSI, 2016). Sendo assim, a fim de se otimizar os experimentos para essa fonte de irradiação, apenas esse filtro foi testado.

Em doses inferiores de UVA, tanto a cepa não tratada, AWP001 (*yno1*) + UVA (controle), quanto a cepa tratada com 100 µg/mL de TiO₂ apresentaram um perfil de sobrevivência ao UVA comparável ($p > 0,05$). Entretanto, em doses acima de 350 kJ/m², o TiO₂ não foi capaz de conferir fotoproteção para a cepa contra os danos letais induzidos pela radiação UVA. De fato, em doses superiores de UVA, o TiO₂ se mostrou fotocitotóxico/fotossensibilizante para a cepa AWP001 (*yno1*) ($p < 0,05$) (Figura 18).

Esse resultado sugere que o TiO₂ em associação a radiação UVA pode gerar uma série de ERO tais como O₂⁻, H₂O₂, ¹O₂ e [•]OH via reações de Fenton e/ou reações semelhantes, como já descrito na literatura (FENOGLIO et al., 2013; GOGNIAT; DUKAN, 2007), levando a fotocitotoxicidade observada. De fato, a associação de TiO₂ e UVA já foi sugerida como estratégia de processos esterilização (KUHN et al., 2003), evidenciando essa propriedade fototóxica do TiO₂ diante do efeito fotocatalítico gerado pela irradiação com UVA.

Figura 18 - Sobrevivência da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com ultravioleta A (UVA), na presença e na ausência de TiO₂



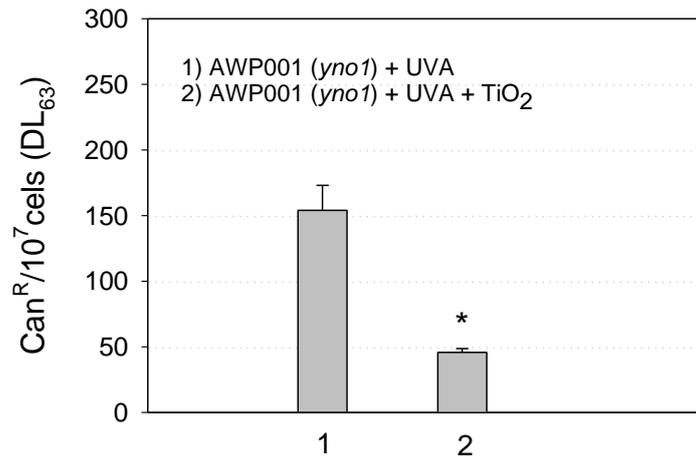
Fração de sobrevivência (N/N0) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com ultravioleta A (UVA) na presença e na ausência de 100 µg/mL de dióxido de titânio (TiO₂). Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. * estatisticamente diferentes do controle (AWP001 (*yno1*) + UVA) ($p < 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Fonte: (Do autor, 2019).

Embora, em doses inferiores de UVA (< 250 kJ/m²), o TiO₂ confira proteção contra a mutagênese induzida por UVA ($p < 0,05$) (Figura 19), mostrando-se antifotomutagênico, em

doses superiores ($< 300 \text{ kJ/m}^2$), a letalidade celular prevalece, indicando que a absorção de UVA e consequente geração de ERO são mais relevantes do que a reflexão de UVA por parte dessas partículas, a qual aconteceria prioritariamente em baixas doses.

Figura 19 - Mutagênese na dose letal 63% (DL_{63}) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com ultravioleta A (UVA), na presença e na ausência de TiO_2



Mutagênese ($Can^R/10^7$ células) na dose letal 63% (DL_{63}) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com ultravioleta A (UVA) na presença e na ausência de $100 \mu\text{g/mL}$ de TiO_2 . Estes resultados representam a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. Mutagênese espontânea da cepa AWP001 (*yno1*) foi 7 ± 1 . * estatisticamente diferente do controle (AWP001 (*yno1*) + UVA) ($p < 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Fonte: (Do autor, 2019).

Nesse sentido, a cepa AWP001 (*yno1*) permitiu evidenciar o potencial fotocitotóxico/fotossensibilizante e antifotomutagênico do TiO_2 quando se emprega uma lâmpada isolada de UVA como fonte de radiação. Sendo assim, com relação a avaliação da eficácia e segurança desse filtro UV, o teste permitiu observar que embora tenha se mostrado antifotomutagênico, o TiO_2 não se mostrou uma substância eficaz frente ao UVA, representando de fato uma classe 4 de grau de risco sob tal comprimento de onda isolado, de acordo com o esquema da Figura 17.

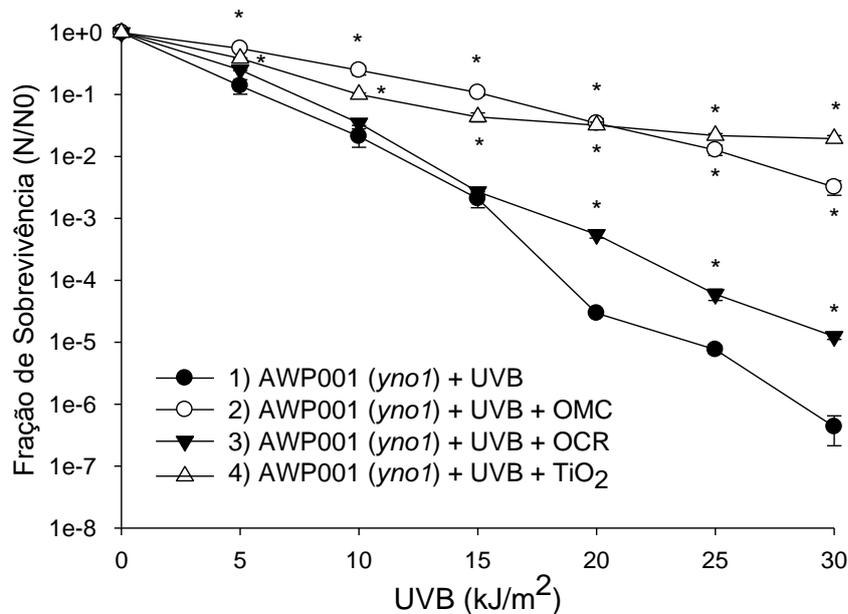
4.4.2 Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pela radiação UVB na presença das substâncias fotoprotetoras

A sobrevivência da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com UVB na presença e na ausência de $100 \mu\text{g/mL}$ dos filtros OMC, OCR e TiO_2 está representada na Figura 20 e a mutagênese $Can^R/10^7$ células na DL_{63} desses tratamentos em comparação com a cepa não tratada, na Figura 21.

De acordo com a Figura 20, foi possível observar que os filtros OMC e TiO_2 conferiram fotoproteção em todas as doses de UVB ($p < 0,05$), enquanto o OCR mostrou-se fotoprotetor apenas em doses de UVB superiores a 20 kJ/m^2 ($p < 0,05$) (teste Mann-Whitney).

A cepa AWP001 (*yno1*) além de evidenciar o potencial fotoprotetor desses filtros, foi capaz de demonstrar a intensidade da capacidade de fotoproteção dos mesmos. Do conjunto de resultados apresentado na Figura 20, pode-se afirmar que o OMC e o TiO_2 foram os filtros com maior capacidade fotoprotetora entre os três testados ($p < 0,05$), tendo eficácia comparável entre si ($p > 0,05$), enquanto o OCR apresentou a menor eficácia fotoprotetora dentre os três ($p < 0,05$) (teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons).

Figura 20 - Sobrevivência da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com ultravioleta B (UVB), na presença e na ausência de substâncias fotoprotetoras



Fração de sobrevivência (N/N0) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com ultravioleta B (UVB) na presença e na ausência de 100 $\mu\text{g/mL}$ octil metoxicinamato (OMC), octocrileno (OCR) e dióxido de titânio (TiO_2). Estes resultados representam a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. * estatisticamente diferentes do controle (AWP001 (*yno1*) + UVB) ($p < 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

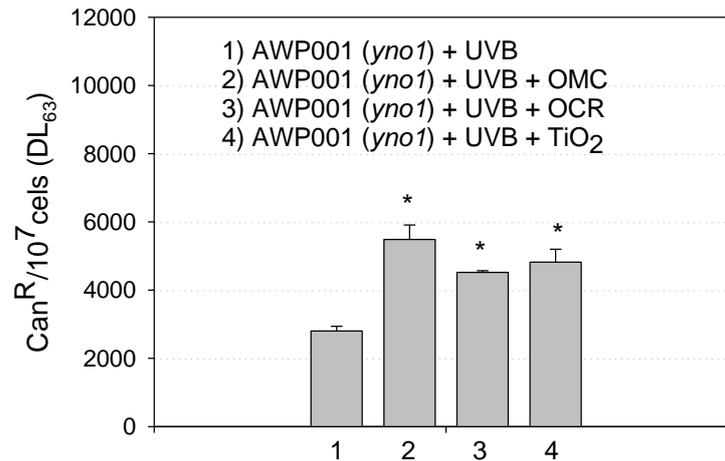
Fonte: (Do autor, 2019).

De fato, já é descrito na literatura que o OCR, por si só, não é um filtro UV muito eficaz e que, por esta razão, ele é, geralmente, combinado com outro filtro UVB a fim de aumentar o FPS da formulação fotoprotetora (GROOT; ROBERTS, 2014).

Apesar de terem se mostrado fotoprotetores, os três filtros UV favoreceram o incremento da fotomutagênese da cepa AWP001 (*yno1*) ($p < 0,05$) (teste Mann-Whitney) frente ao UVB quando comparada ao controle (Figura 21). Cabe ressaltar que não houve diferença

estatística entre os tratamentos com os filtros OMC, OCR ou TiO₂ ($p > 0,05$) (teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn's multiple comparisons). Nesse sentido, com relação a Figura 17, frente ao UVB, os filtros mostraram uma classe 4 de grau de risco.

Figura 21 - Mutagênese na dose letal 63% (DL₆₃) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com ultravioleta B (UVB), na presença e na ausência de substâncias fotoprotetoras



Mutagênese (Can^R/10⁷ células) na dose letal 63% (DL₆₃) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com ultravioleta B (UVB) na presença e na ausência de 100µg/mL de octil metoxicinamato (OMC), octocrileno (OCR) e dióxido de titânio (TiO₂). Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. Mutagênese espontânea da cepa AWP001 (*yno1*) foi 7 ± 1. * estatisticamente diferente do controle (AWP001 (*yno1*) + UVB) ($p < 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Fonte: (Do autor, 2019).

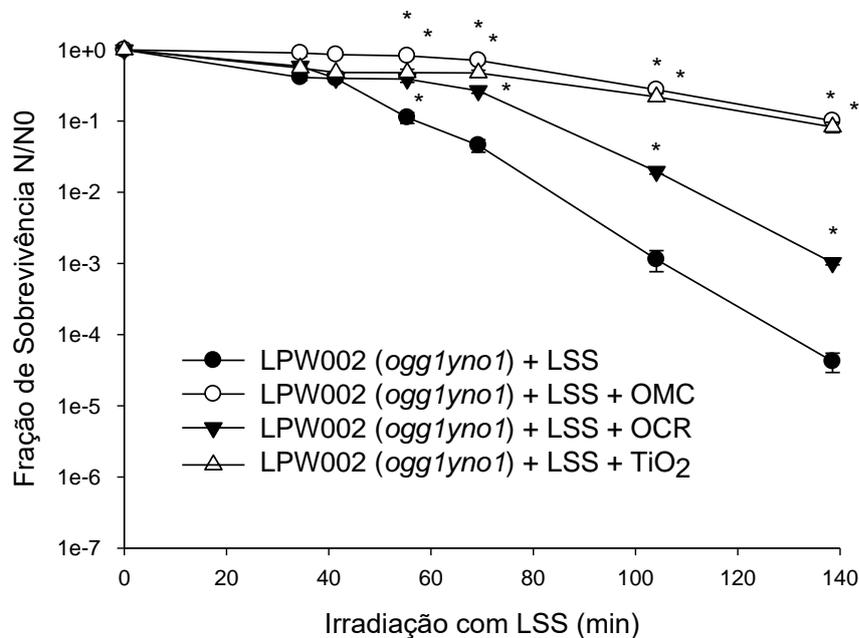
Já foi descrito que o OMC é capaz de proteger linhagens de células humanas de lesões citotóxicas como CPDs e 6,4-PPs mas não de lesões de caráter oxidativo induzidas por UVB (DUALE et al., 2010), justificando o seu perfil fotomutagênico frente a esta fonte de irradiação. De fato, diversos estudos demonstraram a geração de ERO não só pelo OMC como também pelo OCR após irradiação com UVB (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006; ALLEN et al., 1996), evidenciando seu potencial fotomutagênico frente a este comprimento de onda. O perfil fotoprotetor, porém, ao mesmo tempo, fotomutagênico do TiO₂ em associação ao UVB para a cepa AWP001 (*yno1*) corrobora o observado para a cepa CD138 (*ogg1*) por Pinto e colaboradores (2010). Nesse sentido, pode-se inferir que o TiO₂ também foi capaz de proteger as células contra os efeitos citotóxicos de lesões geradas por UVB, como CPDs e 6-4PPs, mas, em termos de mutagênese, a fotossensibilização desse composto frente ao UVB contribui para a geração de danos oxidativos ao DNA de *S. cerevisiae*, o que reflete em um aumento da mutagênese induzida por UVB observada na Figura 21.

4.4.3 Determinação da sobrevivência e mutagênese induzida pela exposição à LSS na presença das substâncias fotoprotetoras

A sobrevivência da cepa LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com LSS na presença e na ausência de 100 µg/mL dos filtros OMC, OCR e TiO₂ está representada na Figura 22 e a mutagênese Can^R/10⁷ células da cepa AWP001 (*yno1*) na DL₆₃ desses tratamentos em comparação com a cepa não tratada, na Figura 23.

Os filtros OMC, OCR e TiO₂ foram fotoprotetores para a cepa LPW002 (*ogg1yno1*) ($p < 0,05$) em doses superiores a 66,70 kJ/m² de UVA e 4 kJ/m² de UVB, contidos na LSS (teste Mann-Whitney).

Figura 22 - Sobrevivência da cepa LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com Luz Solar Simulada (LSS), presença e ausência de substâncias fotoprotetoras



Fração de sobrevivência (N/N0) da cepa LPW002 (*ogg1yno1*) após irradiação com luz solar simulada (LSS) na presença e na ausência de 100 µg/mL octil metoxicinamato (OMC), octocrileno (OCR) e dióxido de titânio (TiO₂). Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. * estatisticamente diferentes do controle (LPW002 (*ogg1yno1*) + LSS) ($p < 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

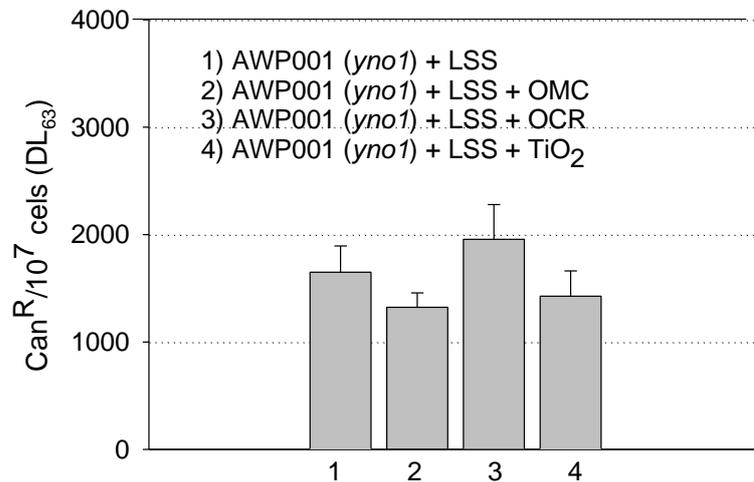
Fonte: (Do autor, 2019).

Mais uma vez, o OMC e o TiO₂ foram, dentre os demais, os que apresentaram melhor eficácia fotoprotetora ($p < 0,05$), apresentando um perfil de eficácia semelhante entre si ($p > 0,05$), enquanto o OCR apresentou uma intensidade de fotoproteção inferior aos anteriores ($p < 0,05$) frente a irradiação com LSS (teste Kruskal-Wallis seguindo pelo teste Dunn's multiple comparisons).

Com relação a mutagênese, foi possível observar que nenhum dos filtros UV testados apresentou potencial fotomutagênico ou antifotomutagênico, uma vez que não houve diferença

estatística entre o número de mutantes $\text{Can}^R/10^7$ células na DL_{63} da cepa tratada e a cepa não tratada com nenhum filtro (controle) ($p > 0,05$) (teste Mann-Whitney).

Figura 23 - Mutagênese na dose letal 63% (DL_{63}) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com luz solar simulada, na presença e na ausência de substâncias fotoprotetoras



Mutagênese ($\text{Can}^R/10^7$ células) na dose letal 63% (DL_{63}) da cepa AWP001 (*yno1*) após irradiação com luz solar simulada (LSS) na presença e na ausência de $100\mu\text{g/mL}$ de OMC, OCR e TiO_2 . Estes resultados representam a média \pm erro padrão de no mínimo cinco experimentos independentes. Mutagênese espontânea da cepa AWP001 (*yno1*) foi 7 ± 1 . Não houve diferença estatística entre os tratamentos e o controle (AWP001 (*yno1*) + LSS) ($p > 0,05$) – teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Fonte: (Do autor, 2019).

Nesse sentido, as cepas LPW002 (*ogg1yno1*) e AWP001 (*yno1*), adotadas para LSS, permitiram indicar que os filtros UV testados nesse sistema apresentaram um perfil fotoprotetor, porém inerte quanto a mutagenicidade, o qual, de acordo com a Figura 17, representa uma classe 2 de grau de risco.

Quando se compara os resultados obtidos para LSS com os obtidos para as lâmpadas isoladas de UVA e UVB percebem-se diferenças nas respostas das cepas frente a um mesmo tratamento fotoprotetor. Esses resultados, por vezes discrepantes, refletem a resposta fotobiológica diferencial a cada espectro de radiação ultravioleta e suas particularidades e/ou sinergismo. Além disso, é evidente que as doses finais acumuladas nas irradiações com as lâmpadas isoladas foram superiores as doses finais de cada espectro UVA e UVB contidas na LSS, o que também contribui para essa variedade de resultados.

Enquanto que, para a irradiação com UVA isolado, o TiO_2 foi fotocitotóxico em doses superiores a 350 kJ/m^2 (Figura 18), em doses de UVA equivalentes as encontradas para a LSS, ou seja, inferiores a 166 kJ/m^2 , o mesmo tratamento não o foi (Figura 22). Nesse sentido, parece pouco razoável o uso de doses finais acumuladas diferentes para cada fonte de irradiação, porém

tal estratégia é importante para que a comparação em termos de mutagênese seja feita adequadamente e sem vieses.

Apesar das doses finais acumuladas das irradiações de UVA e de UVB serem superiores as das mesmas contidas na LSS, esse prolongamento da exposição a doses cada vez maiores nas lâmpadas isoladas é necessário a fim de se obter um mesmo nível de sobrevivência para fins de comparação da mutagênese na dose letal de 63% de sobreviventes, a DL_{63} .

Caso fosse adotada uma dose final acumulada de 166 kJ/m^2 de UVA na irradiação com a lâmpada de UVA isolado, o número de sobreviventes, frente ao tratamento com TiO_2 , por exemplo, seria superior a 63%, o que favoreceria a sobrevivência celular (danos induzidos no $\text{DNA} < 1 \text{ GLC}$), quando as lesões tendem a ser geridas por sistemas de reparo que levam a baixo ou sequer qualquer nível de mutagênese induzida. Dessa forma, foi necessário alcançar uma dose final acumulada de 500 kJ/m^2 de UVA na irradiação isolada a fim de se alcançar a DL_{63} da cepa e, então, viabilizar uma adequada comparação da mutagênese da cepa nesse tratamento a das cepas nos outros tratamentos, todas em um mesmo nível de população celular viável. Enquanto isso, para a irradiação com LSS, uma dose final acumulada de 166 kJ/m^2 de UVA contida na LSS já é suficiente para atingir a DL_{63} , visto que ainda há a contribuição do UVB nessa fonte de irradiação.

O mesmo raciocínio é aplicável ao UVB. Se uma dose final acumulada de 10 kJ/m^2 de UVB (dose final de UVB alcançada na LSS) fosse adotada para a irradiação com a lâmpada isolada de UVB, a DL_{63} de cada tratamento não seria alcançada e, então, a comparação da mutagênese dos diversos tratamentos, sejam físicos (radiação UV) ou químicos (filtros UV) ou, ainda, suas associações, em um mesmo nível de células viáveis, não seria possível.

Nesse sentido, uma vez que a mutagênese na DL_{63} da cepa AWP001 (*yno1*) induzida pelos filtros frente ao LSS e ao UVB isolado partem de um mesmo nível de células viáveis, percebe-se que, para a LSS, os filtros mostraram-se inertes quanto a esse parâmetro, enquanto que, para o UVB isolado, os mesmos tiveram potencial fotomutagênico. Esse diferente desfecho encontrado para a LSS pode ser atribuído a um possível sinergismo dos diferentes comprimentos de onda de UVA, UVB e, inclusive da radiação Vis presentes na LSS.

Além disso, tais diferenças observadas podem estar relacionadas não só as naturezas diferenciais de cada comprimento de onda UVA e UVB, mas também estão relacionadas a interação, no que se refere a propriedade de absorção e/ou reflexão, dos filtros UV a cada comprimento de onda isolado ou em associação na LSS, o que resulta em um produto qualitativo de lesões diferente para cada fonte.

Dessa forma, os resultados que mais se aproximaram aos resultados da literatura que garantem o uso atual desses filtros já consagrados comercialmente foram os com a LSS como fonte de irradiação, enquanto os resultados com as fontes isoladas podem ser artefatuais justamente pelas implicações de se usar apenas um comprimento de onda na irradiação. Apesar do uso de fontes de irradiação isoladas ser útil no desenvolvimento de novos filtros UV, o conjunto de resultados da Fase 3 contribuíram para apoiar o uso de simuladores solares como fontes de irradiação de primeira escolha para compor testes finais de controle de qualidade de filtros UV, uma vez que, no caso desse estudo, o uso de uma lâmpada isolada de UVB no teste de fotomutagênese “condenou” os três filtros avaliados como fotomutagênicos enquanto os mesmos foram inertes quanto a esse parâmetro frente ao simulador solar, fonte de irradiação que mimetiza as condições reais de exposição solar.

4.5 Eleição do (s) melhor (es) sistema (s) cepa-fonte para se avaliar eficácia e segurança de substâncias fotoprotetoras em *s. Cerevisiae*.

A partir da análise do conjunto de resultados das Fases 1, 2 e 3 foi possível eleger os melhores sistemas cepa-fonte para avaliar a eficácia e segurança de filtros UV, para cada fonte de irradiação. Quando se utiliza uma lâmpada isolada de UVA ou de UVB, a cepa indicada para predizer tanto o potencial fotoprotetor, quanto foto/antifotomutagênico de filtros UV é a cepa AWP001 (*yno1*). Por sua vez, quando se utiliza um simulador solar (LSS), duas cepas do *set* mostraram melhor potencial bioindicador: a cepa LPW002 (*ogg1yno1*), para predizer o potencial fotoprotetor de um filtro e a cepa AWP001 (*yno1*), para predizer o potencial foto/antifotomutagênico.

Além de indicar quais cepas são as melhores bioindicadoras para cada fonte, este trabalho evidenciou as diferentes implicações fotobiológicas de cada filtro (OMC, OCR e TiO₂), ao se usar fontes de irradiação isoladas (lâmpadas UVA e UVB) e fontes de irradiação completas (simulador solar). É importante reforçar a ideia de que as três fontes encontram sua aplicabilidade, seja no desenvolvimento ou no controle de qualidade de filtros que absorvam em apenas uma faixa de comprimento de onda (lâmpadas isoladas) ou para avaliar a resposta dos mesmos ou de filtros UV de amplo espectro frente a um espectro fiel a luz solar natural (simulador solar). Entretanto, no caso desse trabalho, o uso das três fontes foi particularmente interessante para demonstrar a importância, à luz da Vigilância Sanitária, de se ter um teste cujo modelo celular seja responsivo não só às lâmpadas isoladas como também a um simulador solar

e todo seu espectro de irradiação, como as cepas de *S. cerevisiae*, contribuindo para uma avaliação mais completa e robusta da qualidade de produtos relacionados a exposição solar.

5 CONCLUSÃO

Apesar de todo o conhecimento genético acerca da similaridade de reparo de DNA das leveduras com os das células humanas, o potencial preditivo e bioindicador de *S. cerevisiae* não tem sido usado, até o momento, por indústrias e agências regulatórias como um modelo experimental para ensaios fotobiológicos que avaliem fotoproteção e fotogenotoxicidade. Todavia, o conjunto de resultados desse trabalho evidenciou um conjunto de cepas de *S. cerevisiae* particularmente útil para avaliar a eficácia, em termos de fotoproteção, e a segurança, em termos de foto/antifotomutagenicidade, de filtros UV, quer seja usando um sistema de simulação solar, como também, usando fontes isoladas de UVA e UVB, dependendo do perfil de absorção do composto testado.

As cepas AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) testadas no desenvolvimento desse teste indicativo mostraram-se promissoras para uma validação desse ensaio. Esse conjunto de cepas é, não apenas útil para o controle de qualidade de substâncias fotoprotetoras já exploradas comercialmente, como também de grande potencial para compor um teste robusto, do ponto de vista de Vigilância Sanitária, para testar novas substâncias que cheguem ao mercado nacional e que precisem, portanto, de um controle de qualidade do ponto de vista de eficácia e segurança, a fim de garantir que o mesmo não ofereça risco à saúde de seu consumidor.

A natureza desse trabalho tende, portanto, a fornecer ferramentas para atender a demanda por testes *in vitro* de *screening* robustos que dispensam a necessidade de alterar/bloquear parte do espectro de irradiação devido à sensibilidade das células, tal como é geralmente feito, já que todos os protocolos de irradiação aqui apresentados refletem condições reais de exposição à luz solar ambiental.

6 PERSPECTIVAS

Deseja-se desafiar as cepas AWP001 (*yno1*) e LPW002 (*ogg1yno1*) com outras substâncias fotoprotetoras e ativos antioxidantes para avaliar a capacidade bioindicadora das mesmas frente a uma variedade maior de compostos. Além disso, avaliação da geração de ERO pelos filtros UV e a caracterização das lesões no DNA de *S. cerevisiae* induzidas pela associação da radiação UV com tais ativos fotoprotetores por meio de técnicas de biologia molecular contribuiria para um melhor entendimento acerca da contribuição dos sistemas de reparo celular e do mecanismo de geração dessas lesões e/ou mutações. Finalmente, deseja-se firmar colaborações com laboratórios nacionais e internacionais a fim de validar o ensaio e preconizar o uso dessas cepas de *S. cerevisiae* como ferramenta de avaliação pré-clínica de fotoprotetores para agências regulatórias e indústrias.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, J.; LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1342-1353, 2010.
- ALLEN, J. M.; GOSSET, C. J. Photochemical formation of singlet molecular oxygen in illuminated aqueous solutions of several commercially available sunscreen active ingredients. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, p. 605-609, 1996.
- ALMEIDA, V. L. D.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- AMAR, S. K.; GOYAL, S.; DUBEY, D.; SRIVASTAV, A. K.; CHOPRA, D. SINGH, J.; SHANKAR, J.; CHATURVEDI, R. K.; RAY, R. S. Benzophenone 1 induced photogenotoxicity and apoptosis via release cytochrome C and Smac/DIABLO at environmental UV radiation. **Toxicology Letters**, v. 239, n. 3, p. 182-93, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.024>, 2015.
- BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 732-742, 2011.
- BARR, M. M. Super models. **Physiology Genomics**, v. 13, p.15-24, 2003.
- BATYCKA-BARAN, A.; BESGEN, P.; WOLF, R.; SZEPIETOWSKI, J. C.; PRINZ, J. C. The effect of phototherapy on systemic inflammatory process in patients with plaque psoriasis. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 161, p. 396-401, 2016.
- BELANGER, K. K.; AMEREDES, B. T.; BOLDOGH, I.; AGUILERA-AGUIRRE, L. The Potential Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-Driven DNA Base Excision Repair in Exercise-Induced Asthma. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1-15, 2016.
- BHUTANI, V. K.; WONG, R. J.; STEVENSON, D. K. Hyperbilirubinemia in Preterm Neonates. **Clinics in Perinatology**, v. 43, n. 2, p. 215-232, 2016.
- BISSONNETTE, R.; NIGEN S.; BOLDUC, C. Influence of the quantity of sunscreen applied on the ability to protect against ultraviolet-induced polymorphous light eruption. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 28, p. 240-243, 2012.
- BOITEUX, S.; GELLON, L.; GUIBOURT, N. Repair of 8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 12, p. 1244-1253, 2002.
- BOITEUX, S.; ROBERTSON, J. DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 193, p. 1025-1064, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 30, de 1 de junho de 2012**. Aprova o Regulamento Técnico para Mercosul sobre protetores solares em cosméticos e dá outras providências. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 6 ago. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 69, de 23 de março de 2016**. Dispõe sobre o “Regulamento Técnico Mercosul sobre lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes”. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 6 ago. 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 07, de 10 de fevereiro de 2015**. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 6 ago. 2016.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 24 set. 1976.

BRASIL. Decreto nº 8077, de 14 de agosto de 2013. Regulamenta as condições para o funcionamento de empresas sujeitas ao licenciamento sanitário, e o registro, controle e monitoramento, no âmbito da vigilância sanitária, dos produtos de que trata a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 15 agosto de 2013. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2013/decreto/d8077.htm. Acesso em: 11 ago. 2017.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; CZICH, A.; EPE, B.; GOCKE, E.; KAINA, B.; MULLER, L.; POLLET, D.; UTESCH, D. Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force. **Mutation Research**, v. 566, p. 65-91, 2004.

BUTT, S. T.; CHRISTENSEN, T. Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 91, n. 1-3, p. 283-286, 2000

CALDEIRA DE ARAUJO, A.; FAVRE, A. Induction of size reduction in *Escherichia coli* by near-ultraviolet light. **European Journal of Biochemistry**, v. 146, p. 605-610, 1985.

CHÉTELAT, A.; ALBERTINI, S.; DRESP, J. H.; STROBEL, R.; GOCKE, E. Photomutagenesis test development: I. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and suscreen compounds in bacterial and yeast assays. **Mutation Research**, v. 292, p. 241-250, 1993.

CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M.T.; ROOS, W.P.; KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, p. 3-34, 2003.

COELHO, S. G.; HEARING, V. J. UVA tanning is involved in the increased incidence of skin cancers in fair-skinned young women. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 23, p. 57-63, 2009.

DARLINGTON, S.; WILIAMS, G.; NEALE, R.; FROST, C.; GREEN, A. A randomized controlled trial to assess sunscreen application and beta carotene supplementation in the prevention of solar keratosis. **Achieves of Dermatology**, v. 139, p. 451-455, 2003

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, p. 941-950, 2007.

DIFFEY, B. L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Review in Medicine and Biology**, v. 36, n. 3, p. 299-328, 1991.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 223-229, 2015.

DOUKI, T.; REYNAUD-ANGELIN, A.; CADET, J.; SAGE, E. Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation. **Biochemistry**, v. 42, p. 9221-9226, 2003.

DUALE, N.; OLSEN, A.; CHRISTENSEN, T.; BUTT, S. T. BRUNBORG, G. Octyl methoxycinnamate modulates gene expression. and prevents cyclobutane pyrimidine dimer formation but not oxidative DNA damage in UV-exposed human cell lines. **Toxicological Sciences**, v. 114, n. 2, p. 272-284, 2010.

DZIERZBICKI, P.; KOPROWSKI, P.; FIKUS, M. U.; MALC, E.; CIESLA, Z. Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the MSH1-dependent pathway. **DNA Repair**, v. 3, p. 403-411, 2004.

ESMAT, S.; HEGAZY, R. A.; SHALABY, S.; HU, S. C.; LAN, C. E. Phototherapy and combination therapies for vitiligo. **Dermatologic Clinics**, v. 35, p. 171-192, 2017.

FENOGLIO, I.; PONTI, J.; ALLOA, E.; GHIAZZA, M.; CORAZZARI, I.; CAPOMACCIO, R.; REMBGES, D.; OLIARO-BOSSOC, S.; ROSSI, F. Singlet oxygen plays a key role in the toxicity and DNA damage caused by nanometric TiO₂ in human keratinocytes. **Nanoscale**, v. 5, p. 6567-6576, 2013.

FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Achieves of Dermatology**, v. 124, p.869-871, 1988.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORRÊA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007

FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W.; WOOD, R. D.; SCHULTZ, R. A.; ELLENBERGER, T. **DNA Repair and Mutagenesis**, ed. 2, American Society for Microbiology Press. Washington, 2006.

GANTWERKER, E. A.; HOM D. B. Skin: Histology and physiology of wound healing. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 441-453, 2011

GARCÍA-CELA, M. E.; MARÍN, S.; REYES, M.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Conidia survival of *Aspergillus* section *Nigri*, *Flavi* and *Circumdati* under UV-A and UV-B radiation with cycling temperature/light regime. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 96, p. 2249-2256, 2015.

GOCKE, E.; MULLER, L.; GUZZIE, P. J.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BULERA, S.; CHIGNELL, C. F.; HENDERSON, L. M.; JACOBS, A.; MURLI, H.; SNYDER, R. D.; TANAKA, N. Considerations on a Photochemical Genotoxicity: Report of the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures Working Group. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 173-184, 2000.

GOCKE, E.; CHÉTELAT, A. A.; CSATO, M.; McGARVEY, D. J.; JAKOB-ROETNE, R.; KIRCHNER, S.; MUSTER, W.; POTTHAST M.; WIDMER, U. Phototoxicity and photogenotoxicity of nine pyridine derivatives. **Mutation Research**, v. 535, p. 43-54, 2003.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 546, p. 563-567, 1996.

GOGNIAT, G.; DUKAN, S. TiO₂ photocatalysis causes DNA damage via fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7740-7743, 2007.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 614-626, 2008.

GREEN, A. C.; WILLIAMS, G. M.; LOGAN, V.; STRUTTON, G. M. Reduced melanoma after sunscreen use: randomized trial follow-up. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 3, p. 257-263, 2011.

GROOT, A. C.; ROBERTS, D. W. Contact and photocontact allergy to octocrylene: a review. **Contact Dermatitis**, v. 70, p. 193-204, 2014.

HAN, A.; CHIEN A. L.; KANG, S. Photoaging. **Dermatologic Clinics**, v. 32, p. 291-299, 2014.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical & Biology Medicine**, v. 41, p. 1205-1212, 2006.

HANSON, K. M.; NARAYANAN, S.; NICHOLS, V. M.; BARDEEN, C. J. Photochemical degradation of the UV filter Octyl Methoxycinnamate in solution and in aggregates. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 9, p. 1607-16, 2015. DOI: 10.1039/C5PP00074B, 2015

HAURI, U.; LUTOLF, B.; SCHLEGEL, U.; HOHL, C. Determination of photodegradation of UV filters in sunscreen by HPLC/DAD and HPLC/MS. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 95, p. 147-161, 2004.

- HOLICK, M. F. Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. **Anticancer Research**, v. 36, p. 1345-1356, 2016
- HOSSY, B. H.; LEITÃO, A. A. C.; SANTOS, E. P.; MATSUDA, M.; REZENDE, L. B., RURR, J. S. C.; PINTO, A. V.; RAMOS-E-SILVA, M.; PÁDULA, M.; MIGUEL, N. C. O. Phototoxic assessment of a sunscreen formulation and its excipients: An *in vivo* and *in vitro* study. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 1173, p. 545-550, 2017.
- HUGHES, M. C. B.; WILLIAMS, G. M.; BAKER, P.; GREEN, A. C. Sunscreen and prevention of skin aging. **Annals of Internal Medicine**, v. 158, p. 781-790, 2013.
- JANSEN, R.; OSTERWALDER, U.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; LIM, H. W. Photoprotection. Part II. Sunscreen: Development, efficacy, and controversies. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 6, p. 1-14, 2013.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica, texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 558 p.
- JUSSILA, A.; HUOTARI-ORAVA, R.; YLIANTTILA, L.; PARTONEN, T.; SNELLMAN, E. Narrow-band ultraviolet B radiation induces the expression of beta-endorphin in human skin *in vivo*. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 155, p. 104-108, 2016.
- KASEMETS, K.; IVASK, A.; DUBOURGUIER, H.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1116-1122, 2009.
- KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, p. 229-234, 2011.
- KIRKLAND, D. J.; HAYASHI, M.; MacGREGOR, J. T.; MULLER, L.; SCHECHTMAN, L.; SOFUNI, T. Summary of Major Conclusions from the International Workshop on Genotoxicity Test Procedures. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 162-166, 2000.
- KIRKLAND, D. J.; HAYASHI, M.; JACOBSON-KRAM, D.; KASPER, P.; MacGREGOR, J. T.; MULLER, L.; UNO, Y. The International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT): History and achievements. **Mutation Research**, v. 627, p. 1-4, 2007.
- KLIMOVA, Z.; HOJEROVÁ, J.; PAZOUREKOVA, S. Current problems in the use of organic UV filters to protect skin from excessive sun exposure. **Acta Chimica Slovaca**, v. 6, n. 1, p. 82-88, 2013.
- KRAEMER, K. H. Sunlight and skin cancer: Another link revealed. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 11-14, 1997.
- KRAUSE, M.; KLIT, A.; JENSEN, M. B.; SOEBORG, T.; FREDERIKSEN, H.; SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.; SKAKKEBAEK, N. E.; DRZEWIECKI, K. T. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. **International Journal of Andrology**, v. 35, p. 424-436, 2012.

KOCH-PAIZ, C. A.; AMUNDSONA, S. A.; BITTNER, M. L.; MELTZER, P. S.; FORNACE, A. J. Functional genomics of UV radiation responses in human cells. **Mutation Research**, v. 549, p. 65-78, 2004

KOZMIN, S.; SLEZAK, G.; REYNAUD-ANGELIN, A.; ELIE, C.; RYCKE, Y.; BOITEUX, S.; SAGE, E. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 38, p. 13538-13543, 2005.

KUHN, K. P.; CHABERNY, I. F.; MASSHOLDER, K.; STICKLER, M.; BENZ, V. W.; SONNTAG, H.; ERDINGER, L. Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. **Chemosphere**, v. 53, p. 71-77, 2003.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Basic Science - Medicine**, v. 37, n. 5, p. 223-226, 2009.

LAURENT, J. M.; YOUNG, J. H.; KACHROO, A. H.; MARCOTTE, E. M. Efforts to make and apply humanized yeast. **Briefings in Functional Genomics**, p. 1-9, 2015.

LEWIS, G. N. The conservation of photons. **Nature**, v. 118, n. 2981, p. 874-875, 1926.

LIU, K.; LIN, X.; ZHAO, J. Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2509-2520, 2013.

LÓDEN, M.; BEITNER, H.; GONZALEZ, H.; EDSTROM, D. W.; AKERSTROM, U.; AUSTAD, J.; BURACZEWSKA-NORIN, I.; MATSSON, M.; WULF, H. C. Sunscreen use: Controversies, challenges and regulatory aspects. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 2, p. 255-262, 2011.

MA, R.; COTTON, B.; LICHTENSTEIGER, W.; SCHLUMPF, M. UV Filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. **Toxicological Sciences**, v. 74, p. 43-50, 2003.

MacMANUS-SPENCER, L. A.; TSE, M. L.; KLEIN, J. L.; KRACUNAS, A. E. Aqueous photolysis of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 3931-3937, 2011.

MANCEBO, S. E.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. Sunscreen: a review of health benefits, regulations and controversies. **Dermatologic Clinics**, v. 32, p. 427-438, 2014.

MARIONNET, C.; TRICAUD, C.; BERNERD, F. Exposure to Non-Extreme Solar UV Daylight: Spectral Characterization, Effects on Skin and Photoprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 68-90, 2015.

MARROT, L.; LABARUSSIAT, A.; PEREZ, P.; MEUNIER, J. R. Use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a pre-screening approach for assessment of chemical-induced phototoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 1040-1050, 2006.

- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 298–308, 2004.
- McHUGH, P. J.; KNOWLAND, J. Characterization of DNA damage inflicted by free radicals from a mutagenic sunscreen ingrediente and its location using an *in vitro* genetic reversion assay. **Photochemistry and Photobiology**, v. 66, n. 2, p. 276-281, 1997.
- MONDON, P.; SHAHIN, M. M. Protective effect of two sunscreens against lethal and genotoxic effects of UVB in V79 Chinese hamster cells and *Saccharomyces cerevisiae* strains XV185-14C and D5. **Mutation Research**, v. 279, p. 121-128, 1992.
- MOON, S. E.; YOUN, J. I.; KIM, J. A. The effect of ultraviolet-B exposure scheduling on the photodamage of hairless mouse skin. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 6, p. 74-77, 2000.
- MOURET, S.; PHILIPPE, C.; GRACIA-CHANTEGREL, J.; BANYASZ, A.; KARPATI, S.; MARKOVITSI, D.; DOUKI, T. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct photochemical mechanism? **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 8, p. 1706-1711, 2010.
- NAKAGAWA, Y.; WARUKI, S.; SAKAMOTO, K.; TANAKA, N. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. **Mutation Research**, v. 394, p. 125-132, 1997.
- NESSLANY, F. The current limitations of *in vitro* genotoxicity testing and their relevance to the *in vivo* situation. **Food and Chemical Toxicology**, p.1-7, 2016.
- NEWMAN, M.; STOTLAND, M.; ELLIS, J. The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 4, p. 685-692, 2009.
- NODA, T; KAWADA, A.; HIRUMA, M.; ISHIBASHI, A; ARAI, S. The comparison of sun protection factor values with different light sources. **The Journal of Dermatology**, v. 19, p. 465-469, 1992.
- NOONAN, F. P.; ZAIDI, M. R.; WOLNICKA-GLUBISZ, A.; ANVER, M. R.; BAHN, J.; WIELGUS, A.; CADET, J.; DOUKI, T.; MOURET, S.; TUCKER, M. A.; POPRATILOFF, A.; MERLINO, G.; DE FABO, E. C. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melamine pigment. **Nature Communications**, v. 3, p. 884, 2012. DOI: 10.1038/ncomms1893.
- OECD Test Guideline, Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, **OECD Publishing**, Paris, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071162-en>. Acessado em: 8 ago. 2017.
- OECD Test Guideline, Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, **OECD Publishing**, Paris, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071247-en>. Acessado em: 8 ago. 2017.

OECD Test Guideline, Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, **OECD Publishing**, Paris, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264649-en>. Acessado em: 8 ago. 2017.

OECD Test Guideline, Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, **OECD Publishing**, Paris, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264861-en>. Acessado em: 8 ago. 2017.

OECD Test Guideline, Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, **OECD Publishing**, Paris, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264885-en>. Acessado em: 8 ago. 2017.

OECD Test Guideline, Test No. 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene, **OECD Publishing**, Paris, 2016. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264908-en>. Acessado em: 8 ago. 2017.

OSTERWALDER, U.; SOHN, M.; HERZOG, B. Global state of sunscreens. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 30, p. 62-80, 2014.

PADULA, M.; SLEZAK, G.; van der KEMP, P. A.; BOITEUX, S. The post-replication repair RAD18 and RAD6 genes are involved in the prevention of spontaneous mutations caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 5003-5010, 2004.

PAIVA, J. P., SANTOS, B. A. M., KIBWILA, D. M., GONÇALVES, T. C. W., PINTO, A. V., RODRIGUES, C. R., LEITÃO, A. C., CABRAL, L. M., PÁDULA, M. Titanium Dioxide-Montmorillonite Nanocomposite as Photoprotective Agent Against Ultraviolet B Radiation-Induced Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Candidate for Safer Sunscreens. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 2539–2545, 2014.

PANICH, U.; SITTIHUMCHAREE, G.; RATHYIBOON, N.; JIRAWATNOTAI, S. Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1-14, 2016.

PAWELEK, J. M.; CHAKRABORTY, A. K.; OSBER, M. P.; ORLOW, S. J.; MIN, K. K.; ROSENZWEIG, K. E.; BOLOQONIA, J. L. Molecular cascades in UV-induced melanogenesis: a central role for melanotropins? **Pigment Cell Research**, v. 5, p. 348-356, 1992.

PINTO, A. V.; DEODATO, E. L.; CARDOSO, J. S.; OLIVEIRA, E. F.; MACHADO, S. L.; TOMA, H. K.; LEITÃO, A. C.; PÁDULA, M. Enzymatic recognition of DNA damage induced by UVB-photosensitized titanium dioxide and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for oxidatively DNA damage generation. **Mutation Research**, v. 688, p. 3-11, 2010.

PFUHLER, S.; KIRST, A.; AARDEMA, M.; BANDUHN, N.; GOEBEL, C.; ARAKI, D.; COSTABEL-FARKAS, M.; DUFOUR, E.; FAUTZ, R.; HARVEY, J.; HEWITT, N. J.; HIBATALLAH, J.; CARMICHAEL, P.; MacFARLANE, M.; REISINGER, K.; ROWLAND, J.; SCHELLAUF, F.; SCHEPKY, A.; SCHEEL, J. A tiered approach to the use of alternative

to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Genotoxicity. A COLIPA analyses. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 57, p. 315-324, 2010.

RINNERTHALER, M.; BUTTNER, S.; LAUN, P.; HEEREN, G.; FELDER, T. K.; KLINGER, H.; WEINBERGER, M.; STOLZE, K.; GROUSL, T.; HASEK, J.; BENADA, O.; FRYDLOVA, I.; KLOCKER, A.; SIMON-NOBBE, B.; JANSKO, B.; BREINBACH-KOLLER, H.; EISENBERG, T.; GOURLAY, C. W.; MABEO, F.; BURHANS, W. C.; BREINTENBACH, M. Yno1/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 22, p. 8658-8663, 2012.

ROWAN, A. N.; ANDRUTIS, K. A. Alternatives: A socio-politics commentary from the USA. **Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)**, v. 18, p. 3-10, 1990.

RURR-CARDOSO, J. S.; PAIVA, J. P.; PAULINO-LIMA, I. G.; ALENCAR, A. M.; LAGE, C. A. S.; LEITÃO, A. C. Microbiological decontamination of water: improving the solar disinfection technique (SODIS) with the use of non-toxic vital dye methylene blue. **Photochemistry and Photobiology B**, v. 95, n. 2, p. 618-626, 2019. DOI: 10.1111/php.12999.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London, UK, 1959.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 39–85, 2004.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation**. 9 th rev. 2016. (SCCS/1564/15).

SCHLUMPF, M.; SCHMID, P.; DURRER, S.; CONSCIENCE, M.; MAERKEL, K.; HENSELER, M.; GRUETTER, M.; HERZOG, I.; REOLON, S.; CECCATELLI, R.; FAASS, O.; STUTZ, E.; JARRY, H.; WUTTKE, W.; LICHTENSTEIGER, W. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update. **Toxicology**, v. 205, p. 113-122, 2004.

SCHOLZ, S.; SELA, E.; BLAHA, L.; BRAUNBECK, T.; GALAY-BURGOS, M.; GARCIA-FRANCO, M.; GUINEA, J.; KLUVER, N.; SCHIRMER, K.; TANNEBERGER, K.; TOBOR-KAPLON, M.; WITTERS, H.; BELANGER, S.; BENFENATI, E.; CRETON, S.; CRONIN, M. T. D.; EGGEN, R. I. L.; EMBRY, M.; EKMAN, D.; GOURMELON, A.; HALDER, M.; HARDY, B.; HARTUNG, T.; HUBESCH, B.; JUNGSMANN, D.; LAMPI, M. A.; LEE, L.; LEONARD, M.; KUSTER, B.; LILICRAP, A.; LUCKENBACH, T.; MURK, A. J.; NAVAS, J. M.; PEIJNENBURG, W.; REPETTO, G.; SALINAS, E.; SCHUURMANN, G.; SPIELMANN, H.; TOLLEFSEN, K. E.; WALTER-ROHDE, S.; WHALE, G.; WHEELER, J. R.; WINTER, M. J. A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, p. 506-530, 2013.

SCHUCH, A. P.; MORENO, N. C.; SCHUCH, N. J.; MENCK, C. F. M.; GARCIA, C. C. M. Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 107, p. 110-124, 2017.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, p. 794-802, 2007.

SHERMAN, F; HICKS, J. Micromanipulation and Dissection of Asci, **Methods in Enzymology**, v. 194, p. 21-37, 1991.

SHOCKLEY, A. H.; DOO, D. W. RODRIGUEZ, G. P.; CROUSE, G. F. Oxidative Damage and Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic Studies of Pathways Affecting Replication Fidelity of 8-Oxoguanine. **Genetics**, v. 195, p. 359–367, 2013.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 3, n. 3, p. 125-131, 2010.

SOUZA, L. L. **Estudo do reparo das lesões induzidas pela radiação ultravioleta B (UVB) no DNA de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae***. 130 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SPIELMANN, H.; BALLS, M.; DUPUIS, J.; PAPE, W. J.; PECHOVITCH, G.; SILVA, O.; HOLZHUTTER, H. G.; CLOTHIER, R.; DESOLLE, P.; GERBERICK, F.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W. W.; MAURER, T.; PFANNENBECKER, U.; POTTHAST, J. M.; CSATO, M.; SLADOWSKI, D.; STEILING, W.; BRANTOM, P. The International EU/COLIPA *In vitro* Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test. **Toxicology in vitro**, v. 12, p. 305-327, 1998.

STEIN, H. V.; BERG, C. J.; MAUNG, J. N.; O'CONNOR, L. E.; PAGANO, A. E.; MacMANUS-SPENCER, L. A.; PAULICK, M. G. Photolysis and cellular toxicities of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate and its photoproducts. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 19, p. 851-860, 2017.

THOMAS, D.; SCOTT, A. D.; BARBEY, R.; PADULA, M.; BOITEUX, S. Inactivation of OGG1 increases the incidence of GC→TA transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. **Molecular Genomics and Genetics**, v. 254, p. 171–178, 1997.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In vitro and In vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TYRREL, R. M. Induction of pyrimidine dimers in bacterial DNA by 365 nm radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 17, p. 69-73, 1973.

UTESCH, D.; SPLITTGERBER, J. Bacterial photomutagenicity testing: Distinction between direct, enzyme-mediated and light-induced events. **Mutation Research**, v. 361, p. 41-48, 1996.

VAN DER POLS, J. C.; WILLIAMS, G. M. PANDEYA, N.; LOGAN, V.; GREEN, A. C. Prolonged prevention of squamous cell carcinoma of the skin by regular sunscreen use. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 15, n. 12, 2006.

WAMER, W. G.; YIN, J. J.; WEI, R. R. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 6, p. 851-858, 1997.

WANG, L.; YAN, J.; FU, P. P. PAREKH, K. A.; YU, H. Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. **Mutation Research**, v. 530, p. 19-26, 2003.

WELLER, R. B. Sunlight has cardiovascular benefits independently of vitamin D. **Blood Purification**, v. 41, p. 130-134, 2016.

WIRZ-JUSTICE, A. Seasonality in affective disorders. **General and Comparative Endocrinology**, v. 258, p. 244-249, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.010>.

WONDRAK, G. T.; JACOBSON, M. K.; JACOBSON, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 5, p. 215-237, 2006.

YOUNG, A. R. Chromophores in human skin. **Physics in Medicine and Biology**, v. 42, n. 5, 1997.

YOUNG, A. R.; CLAVEAU, J.; ROSSI, A. B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 3, 2016.

ZHANG, W.; BAO, S.; FANG, T. The neglected nano-specific toxicity of ZnO nanoparticles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports, Nature**, v. 6, p. 24839, 2016. DOI: 10.1038/srep24839.

ZHAO, H.; WEI, D.; LI, M.; DU, Y. Substituent contribution to the genotoxicity of benzophenone-type UV filters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 95, p. 241-6, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.036i>.

APÊNDICE A – DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DO TiO₂ EUSOLEX T AVALIADO A PARTIR DA TÉCNICA DE DLS (DLS) USANDO O EQUIPAMENTO ZETASIZER NANO S90 (MALVERN INSTRUMENTS, MALVERN, UK).

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 618.3	Peak 1: 448.1	62.5	111.9
Pdl: 0.407	Peak 2: 2881	37.5	930.7
Intercept: 0.877	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			

