



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Andréia da Silva Fernandes Campos

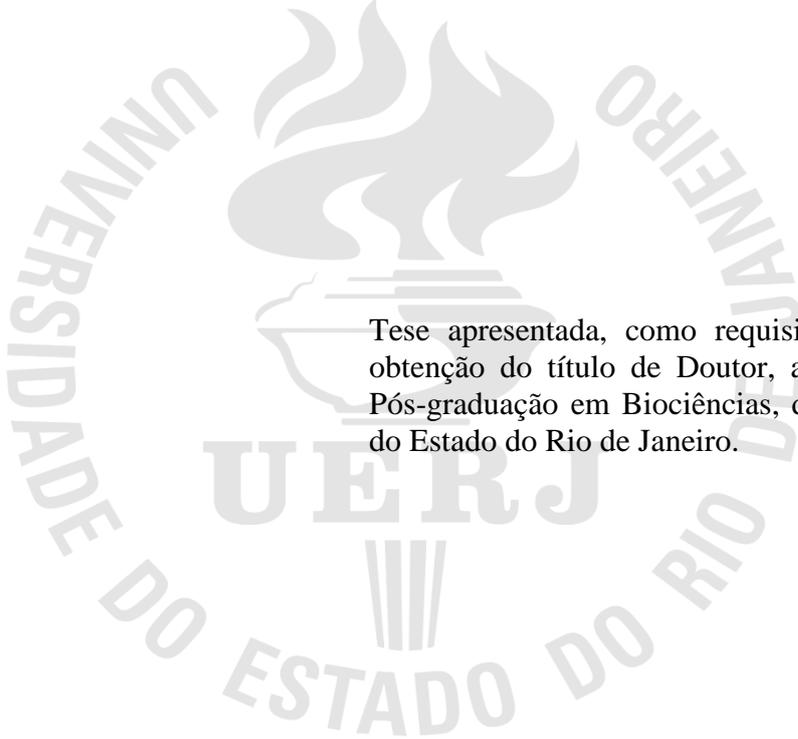
Avaliação do potencial fotoprotetor de extratos de musgos e investigação de seus riscos toxicológicos

Rio de Janeiro

2015

Andréia da Silva Fernandes Campos

Avaliação do potencial fotoprotetor de extratos de musgos e investigação de seus riscos toxicológicos



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Coorientador: Dr. José Luiz Mazzei da Costa

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C198 Campos, Andréia da Silva Fernandes.
Avaliação do potencial fotoprotetor de extratos de musgos e
investigação de seus riscos toxicológicos / Andréia da Silva
Fernandes Campos. – 2015.
173 f.

Orientador: Israel Felzenszwalb.
Coorientador: José Luiz Mazzei da Costa.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-
graduação em Biociências.

1. Briófito - Teses. 2. Musgo - Teses. 3. Testes de
mutagenicidade - Teses. 4. Toxicologia genética - Teses. 5.
Radiação ultravioleta - Teses. I. Felzenszwalb, Israel. II. Costa,
José Luiz Mazzei da. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV.
Título.

CDU 582.32

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Andréia da Silva Fernandes Campos

Avaliação do potencial fotoprotetor de extratos de musgos e investigação de seus riscos toxicológicos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 04 de março de 2015.

Coorientador:

Dr. José Luiz Mazzei da Costa
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Mônica Freiman de Souza Ramos
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marcelo de Pádula
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe Jaciléa pelo amor, carinho, confiança, fé e incentivo para progredir em meus estudos.

Ao meu amado marido Rodrigo, por todo amor, carinho, paciência, compreensão e incentivo absoluto.

À minha amada avó Doriléia (*in memoriam*) meu eterno anjo e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me ilumina e me guia para o caminho do bem.

À minha mãe Jacilea que sempre torce e tem orgulho de cada novo passo dado por mim. Te amo muito!

Ao meu marido Rodrigo pelo amor inabalado, ternura, fidelidade e fé que tudo dará certo. Meu amor e porto seguro!

Ao orientador Prof. Dr. Israel Felzenszwalb. Agradeço por me aceitar em seu laboratório propiciando a execução deste trabalho. Obrigada pela abertura de portas na área da pesquisa para que pudesse iniciar minha jornada rumo ao aperfeiçoamento e maturidade profissional.

Ao Dr. José Luiz Mazzei, meu orientador. Muito obrigada pelo aprendizado que você me proporcionou, tanto na vida acadêmica quanto pessoal. Agradeço imensamente a sua receptividade na chegada ao laboratório, de quem tinha medo até de falar. Obrigada por acreditar em mim e de sempre me incentivar a progressão dos estudos. A sua inestimável contribuição para a execução deste trabalho foi fator fundamental para a concretização do mesmo. Sinto-me privilegiada pela sua amizade, destreza e apoio desde a iniciação científica. Meus próximos passos serão reflexos de seus ensinamentos. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Heitor Evangelista, pela grande colaboração neste trabalho, me proporcionado uma viagem fantástica e absolutamente inesquecível, a um lugar magnífico e lapidado por Deus: Antártica. Sem a sua participação não seria possível a execução deste projeto. Obrigada pela confiança da minha participação na Operação Antártica XXX. Esta operação contribuiu não apenas realizar a coleta do material vegetal (de grande valia acadêmica), mas também contribuiu para meu enriquecimento pessoal (muitos amigos queridos eu fiz) e profissional. Foi uma viagem extraordinária! Obrigada também pela parceria na coleta dos materiais vegetais do Amazonas.

Ao Prof. André Mencialha por sua nobre simpatia, disponibilidade e ajuda nos momentos que se fizeram necessários.

Aos membros examinadores por aceitarem participar desta banca, pela disponibilidade e possibilidade de, com suas sugestões e críticas, enriquecerem ainda mais este trabalho.

À minha amiga Claudinha por todo seu carinho e incentivo. A primeira amizade no laboratório não dá para esquecer jamais. Levarei no coração a pessoa mais carinhosa que conheci até hoje.

À Andrea Kaezer pela amizade, pelo apoio e carinho. Eis uma pessoa de caráter imensurável.

À uma amiga que conheci no início do doutorado, mas a qual tenho profunda admiração pela sua postura profissional e pessoal, pelo seu carisma, pelo seu caráter e ética inabalável. Uma pessoa nobre, como poucas que conheço, com coração de ouro. Tenho que agradecer, imensamente, toda sua cumplicidade, amizade e companheirismo. Desejo que nossa amizade seja permanente. Todo o meu carinho para você, Elisa.

À vocês meninas, Betinha e Jaque. Pessoas queridas que vou levar com muito apreço no coração. Obrigada por nossos bate-papos nos almoços, pelas trocas de experiências e companheirismos. Vocês são muito queridas.

À vocês meninos: Chico, pela sua gentileza ácida (quase um *Gentleman*, às avessas, é claro) e Rapha (este sim um *Gentleman* autêntico), pelas nossas longas conversas no laboratório (principalmente para quem ficava até tarde no lab, não é Rapha?). Agradeço profundamente por estarem sempre “a postos” para encorajar-me nos momentos tristes, quando minha vontade era chorar (como muitas vezes o fiz), permitindo prosseguir, mas também pelos muitos momentos de alegrias e distrações. Muito obrigada pela amizade de vocês.

Ao Carlos, pessoa de gênio forte (parece um pouquinho comigo neste quesito [risos]), mas com coração enorme e muita competência profissional. Obrigada por suas sugestões, dicas e ensinamentos, foram de grande valia.

As meninas, Erika e Juliana, pelo agradável convívio e por me ajudarem na bancada quando eram solicitadas. Meninas do bem.

A todos os ICs que passaram por mim...em especial a Alessandra Quirino, minha IC mais aplicada. Obrigada pela sua disponibilidade e competência. Você terá um futuro brilhante.

Aos queridos Felipe, Vanessa, Ana Maria, Alessandra e Izaura, que apesar de não me acompanharem diretamente na jornada do doutorado, sempre estiveram torcendo por mim. Obrigada pelo carinho de vocês.

À minha amiga Erica Pagel. Amizade Antártica é aquela que dura para sempre não é? Só tenho a agradecer pela sua amizade e companheirismo, não somente sobre solos congelantes, mas também no regresso ao nosso lar. Obrigada por nossa troca de experiências tanto profissional quanto pessoal. Guardo você no lado esquerdo do peito. Obrigada por tudo!

As minhas amigas pessoais (Luana, Bianka e Fernanda) que, embora não façam parte deste ambiente de trabalho, sempre compartilharam de minhas alegrias, tristezas, sonhos e, acima de tudo, souberam entender minha ausência quando o “dever me chamava”.

Não se faz ciência sozinho, as colaborações são imprescindíveis e contribuem com nosso crescimento e aprendizado.... Assim queria agradecer fortemente:

À Prof.^a Marcia Paes, do Departamento de Bioquímica da UERJ por ter gentilmente doado a linhagem celular RAW264.7.

À Prof.^a Danielle Palma de Oliveira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por ter gentilmente doado a linhagem HepG2.

À Prof.^a Monica Regina da Costa Marques, do Instituto de Química da UERJ, pela caracterização química na análise por CLAE.

À Prof.^a Mônica Freiman, da UFRJ, por fornecer as substâncias usadas como controles positivos na determinação do FPS.

A todos do Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (Lia-bppn), do Departamento de Bioquímica, em especial ao Paulinho, Gustavo, Maurício, Jéssica e Francis, pela paciência, disponibilidade, tolerância, profissionalismo e amizade construída durante este período. Obrigada por me ajudarem a construir este trabalho.

Ao Programa Antártico Brasileiro, pela condução de pesquisas na Antártica de forma competente e profissional, levando e trazendo da Antártica os pesquisadores brasileiros em segurança.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, seus docentes, discentes e funcionários.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos e grata estima a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho. Agradeço a cada um de vocês pela paciência, pois sei bem que tenho um temperamento danado de forte, e pela oportunidade de conviver, aprender e crescer. Tenho, neste momento, um sentimento de incontido orgulho. Sei que há uma caminhada longa pela frente, mas acredito que o fim desta etapa irá contribuir muito na concretização de meus sonhos.

Toda a nossa ciência comparada com a realidade, é primitiva e infantil -
e, no entanto, é coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein

Nunca nada grandioso no mundo foi feito sem uma grande dose de paixão.

Georg Wilhelm Friedrich Hegel

RESUMO

CAMPOS, Andréia da Silva Fernandes. *Avaliação do potencial fotoprotetor de extratos de musgos e investigação de seus riscos toxicológicos*. 2015. 173 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A radiação ultravioleta (UV) induz diversos efeitos nocivos nos organismos e a quantidade desta radiação que atinge a biosfera é afetada pela concentração de ozônio, latitude, altitude, clima e reflexão especular. As respostas de briófitas em relação aos efeitos da radiação UV e a presença de compostos que absorvem esta radiação têm sido estudadas. *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* são espécies de musgos encontrados em locais expostos a alta incidência de radiação UV e com habitats distintos. Considerando que as respostas de musgos contra os efeitos da radiação UV e seus mecanismos de proteção ainda são pouco caracterizados, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial fotoprotetor e possíveis riscos toxicológicos associados aos extratos dos musgos *S. uncinata*, proveniente da Antártica e *H. laevifolia* e *L. laevifolium*, proveniente do Amazonas. Seus extratos metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE) foram estudados com a caracterização química por absorção ao UV e visível e pela cromatografia líquida de alta eficiência; quantificação do índice total de compostos fenólicos; determinação da capacidade captadora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila a fim de avaliar as atividades antioxidantes; avaliação do potencial de fotoproteção cutânea pela determinação do fator de proteção solar; avaliações do potencial mutagênico e citotóxico, através do ensaio de *Salmonella*/microsoma, utilizando as cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104; do potencial fotomutagênico através do ensaio de fotomutagenicidade, usando as cepas TA102 e TA104; e investigação dos efeitos genotóxicos e fotogenotóxicos, pelo ensaio de micronúcleo e fotomicronúcleo, respectivamente, usando diferentes linhagens celulares estabelecidas. Foram encontradas atividades fotoprotetoras e antioxidantes e observou-se que os extratos se apresentaram singulares devido a sua composição química. Os resultados fotoprotetores, além dos mutagênicos/fotomutagênicos, genotóxicos/fotogenotóxicos e suas respectivas avaliações citotóxicas também permitiram selecionar extratos e suas concentrações, como promissores candidatos em fotoproteção. Assim, os EA e EH de *H. laevifolia* e *L. laevifolium* apresentam, no geral, os resultados mais significativos, tornando-se potenciais para avaliações refinadas em fotoproteção e na separação de componentes que possam levar a futuras aplicações como antioxidantes e protetores solares ou como adjuvantes.

Palavras-chave: Musgos. Fotoproteção. Mutagenicidade. Genotoxicidade.

ABSTRACT

CAMPOS, Andréia da Silva Fernandes. *Evaluation of potential photoprotective of moss extracts and investigation of their toxicological risks*. 2015. 173 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The ultraviolet radiation (UV) induces many harmful effects in all living organisms and the amount of this radiation that reaching the ground is affected by many factors including ozone concentration, latitude, altitude, climate and specular reflection. The responses of bryophytes against the effects of UV radiation and the presence of compounds that absorb the UV region have been studied. Mosses *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* and *Leucobryum laevifolium* are found in locations exposed to UV at high levels of radiation and in different habitats. Whereas that the responses of mosses against the effects of UV radiation and their protection systems are poorly characterized yet, the aim of this study was to investigate photoprotective potential and possible toxicological risks associated with extracts of mosses *S. uncinata* (from Antarctica) and *H. laevifolia* and *L. laevifolium* (from Amazônia). Methanol (ME), aqueous (AE), hydroalcoholic (HE) and ethanolic (EE) were studied by: chemical characterization by UV/visible spectrophotometry and by High performance liquid chromatography; phenolic content estimation; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging activity; potential of skin photoprotection by *in vitro* determination of sun protection factor; the mutagenic potential, and cytotoxic by *Salmonella*/microsome assay, using the TA97, TA98, TA100, TA102 and TA104 strains; photomutagenic potential by photomutagenicity test, using TA102 and TA104 strains and; investigation of genotoxic and photogenotoxic effects by micronucleus test and photo-micronucleous assay, respectively, using different established cell lines. Photoprotective and antioxidant activities were found and it was observed that the extracts showed strong uniqueness due to its chemical composition. From the photoprotective, mutagenic/photomutagenic and genotoxic/photogenotoxic results and their cytotoxic evaluations it was possible to select extracts and their concentrations as promising candidates for photoprotection. Thus, the EA and EH of *H. laevifolia* and *L. laevifolium* demonstrated the most significant results, becoming potential for refined evaluations in photoprotection and separating components that can lead to future applications such as sunscreens and antioxidants or as adjuvants.

Keywords: Mosses. Photoprotection. Mutagenicity. Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Formação de dímeros de pirimidina ciclobutano a partir de bases pirimidínicas expostas à radiação ultravioleta B.....	28
Figura 2 –	Geração de espécies reativas do oxigênio pela redução univalente do oxigênio molecula.....	29
Figura 3 –	Reação do radical hidroxil com a base guanina.....	31
Figura 4 –	Formação de produtos a partir do radical aduto C8-OH da guanina.....	31
Figura 5 –	Estágios do câncer de pele induzido pela radiação ultravioleta solar....	33
Figura 6 –	Agentes naturais com capacidade de reduzir ou inibir os efeitos biológicos adversos da radiação ultravioleta.....	35
Figura 7 –	Coleta do musgo <i>Sanionia uncinata</i> na Antártica.....	52
Figura 8 –	Locais de coleta do musgo <i>Sanionia uncinata</i>	53
Figura 9 –	Musgos coletados no Morro Seis Lagos (Amazonas).....	54
Figura 10 –	Mapa do local de coleta dos musgos <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i>	55
Figura 11 –	Fluoxograma da obtenção dos extratos secos a partir dos musgos <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i>	57
Figura 12 –	Imagens representativas de células com as alterações avaliadas pelo ensaio do micronúcleo.....	126

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Faixas de comprimento de onda de absorção espectrofotométrica dos principais flavonóides.....	39
Gráfico 2 –	Espectros de absorção na região do UV e do visível dos extratos do musgo <i>Sanionia uncinata</i>	71
Gráfico 3 –	Espectros de absorção na região do UV e do visível dos extratos do musgo <i>Holomitriopsis laevifolia</i>	71
Gráfico 4 –	Espectros de absorção na região do UV e do visível dos extratos musgo <i>Leucobryum laevifolium</i>	72
Gráfico 5 –	Curva de calibração do catecol.....	73
Gráfico 6 –	Atividade dos extratos dos musgos <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> e do padrão quanto à captura de radicais livres, determinada pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila.....	77
Gráfico 7 –	Perfil cromatográfico por CLAE dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i>	78
Gráfico 8 –	Perfil cromatográfico por CLAE dos extratos de <i>Holomitriopsis laevifolia</i>	79
Gráfico 9 –	Perfil cromatográfico por CLAE dos extratos de <i>Leucobryum laevifolia</i>	80
Gráfico 10 –	Gráfico comparativo mostrando diferenças entre efeitos hipercrômicos (extrato hidroalcoólico de <i>Leucobryum laevifolia</i>) hipocrômicos (extrato aquoso de <i>Holomitriopsis laevifolia</i>) e isocrômico (extrato metanólico de <i>Sanionia uncinata</i>)	87
Gráfico 11 –	Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso, hidroalcoólico e etanólico de <i>Sanionia uncinata</i> no ensaio de <i>Salmonella</i> /microsoma na ausência de ativação metabólica, seguindo o protocolo de Pré-incubação.....	89
Gráfico 12 –	Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso, hidroalcoólico e etanólico de <i>Holomitriopsis laevifolia</i> no ensaio de <i>Salmonella</i> /microsoma na ausência de ativação metabólica, seguindo o protocolo de Pré-incubação.....	94

Gráfico 13 –	Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso, hidroalcoólico e etanólico de <i>Leucobryum laevifolium</i> no ensaio de <i>Salmonella</i> /microsoma na ausência de ativação metabólica, seguindo o protocolo de Pré-incubação.....	99
Gráfico 14 –	Relações doses-respostas dos extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico de <i>Sanionia uncinata</i> no ensaio de <i>Salmonella</i> /microsoma na presença de ativação metabólica por S9 mix, seguindo o protocolo de Pré-incubação.....	105
Gráfico 15 –	Relações doses-respostas dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de <i>Holomitriopsis laevifolia</i> no ensaio de <i>Salmonella</i> /microsoma na presença de ativação metabólica por S9 mix, seguindo o protocolo de Pré-incubação.....	108
Gráfico 16 –	Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico, de <i>Leucobryum laevifolium</i> no ensaio de <i>Salmonella</i> /microsoma na presença de ativação metabólica por S9 mix, seguindo o protocolo de Pré-incubação.....	111
Gráfico 17 –	Relações doses-respostas dos extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico de <i>Sanionia uncinata</i> sobre a fotomutagenicidade das cepas TA102 (Dose: 6,5 J/cm ² UVA) e TA104 (Dose: 0,24 J/cm ² UVA)	115
Gráfico 18 –	Relações doses-respostas dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de <i>Holomitriopsis laevifolia</i> sobre a fotomutagenicidade das cepas TA102 (Dose: 6,5 J/cm ² UVA) e TA104 (Dose: 0,24 J/cm ² UVA)	116
Gráfico 19 –	Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico de <i>Leucobryum laevifolium</i> sobre a fotomutagenicidade das cepas TA102 (Dose: 6,5 J/cm ² UVA) e TA104 (Dose: 0,24 J/cm ² UVA)	117
Gráfico 20 –	Anti-fotomutagenicidade dos extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico de <i>Sanionia uncinata</i> utilizando as cepas TA102 (Dose: 1,3 J/cm ² UVA) e TA104 (Dose: 0,04 J/cm ² UVA).....	119

Gráfico 21 –	Anti-fotomutagenicidade dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de <i>Holomitriopsis laevifolia</i> utilizando as cepas TA102 (Dose: 1,3 J/cm ² UVA) e TA104 (Dose: 0,04 J/cm ² UVA)	120
Gráfico 22 –	Anti-fotomutagenicidade dos extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico de <i>Leucobryum laevifolium</i> utilizando as cepas TA102 (Dose: 1,3 J/cm ² UVA) e TA104 (Dose: 0,04 J/cm ² UVA)	121
Gráfico 23 –	Anti-fotomutagenicidade dos extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico de <i>Sanionia uncinata</i> na presença de benzofenona-3 (BZE, 400 µg/placa) utilizando a cepa TA104 (Dose UVA: 0,04 J/cm ²).....	122
Gráfico 24 –	Anti-fotomutagenicidade dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de <i>Holomitriopsis laevifolia</i> na presença de benzofenona-3 (BZE, 400 µg/placa) utilizando a cepa TA104 (Dose UVA: 0,04 J/cm ²)	123
Gráfico 25 –	Anti-fotomutagenicidade dos extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico de <i>Leucobryum laevifolium</i> na presença de benzofenona-3 (BZE, 400 µg/placa) utilizando a cepa TA104 (Dose UVA: 0,04 J/cm ²)	124
Gráfico 26 –	Viabilidade celular da linhagem celular RAW264.7, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> após 3 horas de incubação.....	132
Gráfico 27 –	Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> após 3 horas de incubação.....	137
Gráfico 28 –	Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> após 24 horas de incubação.....	138
Gráfico 29 –	Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> após 48 horas de incubação.....	140

Gráfico 30 –	Viabilidade celular da linhagem celular HaCat, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> após 3 horas de incubação.....	144
Gráfico 31 –	Viabilidade celular da linhagem celular HaCat, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> após 24 horas de incubação.....	145
Gráfico 32 –	Viabilidade celular da linhagem celular HaCat, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> após 48 horas de incubação.....	146
Gráfico 33 –	Viabilidade celular de diferentes concentrações dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> pelo método de exclusão por azul de tripan, usando a célula HaCat, após irradiação por UVA.....	155
Gráfico 34 –	Viabilidade celular de diferentes concentrações dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> pelo método de exclusão por azul de tripan, usando a célula HaCat, após irradiação por UVB.....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Mistura de polifenóis e suas características analíticas usada como padrão na cromatografia líquida de alta eficiência.....	60
Tabela 2 –	Ponderação empregada no cálculo do fator de proteção solar por espectrofotometria.....	62
Tabela 3 –	Rendimentos (% g/g) da extração dos musgos aplicados neste estudo.....	70
Tabela 4 –	Teores de polifenóis totais (expressos em mg equivalente de catecol)/g de extratos dos musgos <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i>	74
Tabela 5 -	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) obtidas pelos extratos para <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> para alcançar a concentração efetiva 50.....	76
Tabela 6 –	Prováveis classes de ácidos fenólicos e substâncias caracterizadas dos extratos de <i>Sanionia uncinata</i>	81
Tabela 7 –	Prováveis classes de ácidos fenólicos e substâncias caracterizadas dos extratos de <i>Holomitriopsis laevifolia</i>	82
Tabela 8 -	Prováveis classes de ácidos fenólicos e substâncias identificadas dos extratos de <i>Leucobryum laevifolium</i>	83
Tabela 9 -	Fator de proteção solar <i>in vitro</i> dos extratos individuais dos musgos <i>Sanionia uncinata</i> , <i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i> e destes extratos associados ao filtro solar benzofenona-3	85
Tabela 10 -	Compilação dos resultados obtidos em fotoproteção.....	104
Tabela 11 –	Avaliação genotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de macrófago da linhagem RAW 264.7.....	130
Tabela 12 -	Avaliação citotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de macrófago da linhagem RAW 264.7.....	131

Tabela 13 -	Avaliação genotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de macrófago da linhagem HepG2.....	135
Tabela 14 -	Avaliação citotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de macrófago da linhagem HepG2.....	136
Tabela 15 –	Avaliação genotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de queratinócito da linhagem HaCat.....	142
Tabela 16 –	Avaliação citotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de queratinócito da linhagem HaCat.....	143
Tabela 17 –	Fotomicronúcleo após exposição UVA (320 a 400 nm) em células de queratinócito da linhagem HaCat com extratos de três espécies de musgos.....	150
Tabela 18 –	Avaliação citotóxica após exposição UVA (320 a 400 nm) em células de queratinócito da linhagem HaCat com extratos de três espécies de musgos.....	151
Tabela 19 –	Fotomicronúcleo após exposição UVB (280 a 320 nm) em células de queratinócito da linhagem HaCat com extratos de três espécies de musgos.....	152
Tabela 20 -	Avaliação citotóxica após exposição UVB (280 a 320 nm) em células de queratinócito da linhagem HaCat com extratos de três espécies de musgos.....	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs (λ)	Absorvância da solução de preparação no comprimento de onda
Abs _A	Absorvância da amostra
Abs _B	Absorvância do branco
Abs _N	Absorvância do controle negativo
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANOVA	Anova de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
AS	Azida sódica
ATCP	<i>Antarctic Treaty Consultative Party</i>
B α P	Benzo(α)pireno
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BHT	Hidróxi-tolueno butilado
BZE	Benzofenona-3
BZC	3-(4'-metil-benzilideno) cânfora
CE50	Concentração efetiva 50
COLIPA	<i>Comité de Liason des Associations Européenes de Industrie et de la Parfumerie</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPDs	<i>Cyclobutane pyrimidine dimers</i>
DAD	<i>Diode array detection</i>
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DME	Dose mínima eritematosa
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DSB	<i>Double stranded breaks</i>
EA	Extrato aquoso
EAc	Extrato Acetônico
EE	Extrato etanólico

EE (λ)	Efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda
EH	Extrato hidroalcoólico
EM	Extrato metanólico
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de proteção solar
FC	Fator de correção
<i>His</i> ⁺	Número de colônias revertentes
HSD	Honestly significant difference
H-RJ	Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
I (λ)	Intensidade da luz solar no comprimento de onda
I.M.	Índice mitótico
INCA	Instituto nacional do câncer
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
LB	Lysogenic broth
MAX	Máximo
MCO	<i>p</i> -Metoxicinamato de octila
MMC	Mitomicina C
MN	Micronúcleo
MNNG	1-metil-2-nitro-1-nitrosoguanidina
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
NADP	<i>β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
OCT	Octocrileno
OECD	<i>Organisation for Economic Co-Operation and Development</i>
REN	Reparo por excisão de nucleotídeos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PSC	<i>Polar Stratospheric Clouds</i>
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i>
SCC	<i>Scientific Committee of Cosmetology</i>
SSB	<i>Single stranded breaks</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

UFC	Unidades formadoras de colônias
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VB	<i>Vogel-Bonner</i>
VLF	<i>Very low frequency</i>
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WST	<i>Water Soluble Tetrazolium</i>
2-AA	2-Aminoantraceno
4NQO	4-nitro-1-óxido-quinolina
8-MOP	8-metoxipsoraleno

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetro
%	Porcentagem
O_2^-	radical ânion superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
OH	Radical hidroxil
1O_2	Oxigênio singleto
O_2	Oxigênio molecular
H_2O	Molécula de água
h ν	Energia luminosa
H	Átomo de hidrogênio
e $^-$	Elétron
+	Soma
G	Guanina
C	Citosina
T	Timina
A	Adenina
π	pi
ZnO	Óxido de zinco
TiO $_2$	Dióxido de titânio
°	Grau
S	<i>South</i>
W	<i>West</i>
L	Litro
mL	Mililitro
rpm	Rotações por minuto
μ m	Micrômetro
°C	Grau Celsius
μ g	Micrograma
μ M	Micromolar
μ L	Microlitro

λ	Comprimento de onda
M	Molar
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Fosfato de sódio monobásico
$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	Fosfato de sódio dibásico
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico anidro
q.s.p	Quantidade suficiente para
D	Dextrógira
L	Levógira
$MgSO_4 \cdot H_2O$	Sulfato de magnésio
$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Ácido cítrico monoidratado
K_2HPO_4	Fosfato de potássio dibásico anidro
$Na_2NH_2PO_4 \cdot 4H_2O$	Fosfato de sódio e amônio dibásico tetrahidratado
KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
x	Multiplicação
h	Horas
α	Alfa
J/cm^2	Joules por centímetros quadrados
CO_2	Dióxido de carbono
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio dibásico
nM	Nanomolar
μ	Micro
ng	Nanogramas
g/g	Grama por grama
A	Absorvância
β	Beta
r	Coefficiente de correlação linear ou de Pearson
mAU	Miliunidades arbitrárias
min	Minutos
t_R	Tempo de retenção
\pm	Mais ou menos

t	t de <i>student</i>
v/v	Volume por volume
-	Subtração

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	25
1	EFEITOS DIRETOS DA RADIAÇÃO UV	28
2	EFEITOS INDIRETOS DA RADIAÇÃO UV	29
3	MUTAGÊNESE E CARCINOGÊNESE	32
3.1	Câncer de pele	34
4	FOTOPROTETORES	36
5	MUSGOS E SEUS MECANISMOS DE PROTEÇÃO À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	38
6	ATIVIDADES FOTOPROTETORAS EM <i>SANIONIA UNGINATA</i>, <i>HOLOMITRIOPSIS LAEVIFOLIA</i> E <i>LEUCOBRYUM LAEVIFOLIUM</i>	44
7	JUSTIFICATIVA	49
8	OBJETIVOS	50
8.1	Geral	50
8.2	Específicos	50
9	MATERIAL E MÉTODOS	51
9.1	Coletas	51
9.1.1	<u><i>Sanionia uncinata</i></u>	51
9.1.2	<u><i>Holomitriopsis laevifolia</i> e <i>Leucobryum laevifolium</i></u>	54
9.2	Preparo dos extratos	55
9.3	Espectros de absorção ao ultravioleta-visível	56
9.4	Quantificação dos polifenóis totais	58
9.5	Capacidade captadora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	58
9.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	59
9.7	Fator de proteção solar por método <i>in vitro</i>	61
9.8	Teste de <i>Salmonella</i>/microsoma	62
9.8.1	<u>Preparo de metabolização exógena</u>	64
9.9	Fotomutagenicidade	64
9.10	Ensaio de Micronúcleo	65
9.10.1	<u>Viabilidade celular por WST-1</u>	67

9.11	Ensaio de Fotomicronúcleo.....	68
9.11.1	<u>Viabilidade celular de HaCat pelo método de exclusão por azul de tripan.....</u>	69
9.12	Análise estatística.....	69
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
	CONCLUSÕES	157
	REFERÊNCIAS	158
	APÊNDICE - Artigo Publicado na Revista Pharmacognosy Magazine em Janeiro de 2015.....	172

INTRODUÇÃO

A radiação solar é composta de um espectro contínuo de radiações eletromagnéticas dividida em três principais regiões de comprimento de onda: ultravioleta (UV), visível e infravermelho. A radiação UV possui o comprimento de 100 a 400 nm e corresponde a 5% do total da energia incidente. Pode ser dividida em: ultravioleta C - UVC (100-280 nm), completamente absorvida pelo oxigênio e pelo ozônio na estratosfera; ultravioleta B - UVB (280-320 nm) a qual tem boa parte absorvida pela camada de ozônio e pouco se chega à superfície terrestre; e ultravioleta A - UVA (320-400 nm) que não é absorvida pelo ozônio e chega à superfície terrestre. A luz visível (400-800 nm) corresponde a aproximadamente 45% do total da energia incidente; a radiação infravermelha (próximo: 800-2500 nm; intermédio: 2500-50000 nm; longo: 50000 nm-1 mm) também conhecida por radiação calórica, corresponde a aproximadamente 50% do total de energia incidente (MERWALD *et al.*, 2005; GUARATINI *et al.*, 2009).

A quantidade de UV que atinge a biosfera é afetada pela radiação solar, expressa em energia total incidente, e pelas condições atmosféricas, sendo as principais (ENGELSEN *et al.*, 2005; GODAR, 2005):

(1) Concentração de ozônio e latitude. O ozônio é o principal responsável pela absorção de radiação UV e sua concentração é distribuída verticalmente de acordo com perfis atmosféricos teóricos relativos à posição geográfica, sendo menor nas regiões de baixa latitude.

(2) Altitude. Quanto mais alta é a localidade, menor é o conteúdo de ozônio integrado na coluna atmosférica e, conseqüentemente, maior a quantidade de energia UV incidente na superfície. De acordo com perfis teóricos de distribuição vertical, a quantidade de ozônio decresce em torno de 1% para cada quilômetro; o que provoca aumento de cerca de 6 a 8% na quantidade de energia UV incidente;

(3) Clima. A cobertura de nuvens reduz a incidência da radiação UV na superfície terrestre;

(4) Reflexão especular. Superfícies como a neve, a areia, a grama e a água refletem a radiação, havendo intensidade mesmo em áreas sombreadas.

A radiação luminosa é não ionizante, ou seja, não tem energia suficiente para provocar ionização de átomos de moléculas biologicamente importantes, mas induzem os elétrons a níveis energéticos superiores, deixando as moléculas em estado ativado (excitação) (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

De modo geral, a radiação UV pode ser danosa a várias biomoléculas, tais como o ácido desoxirribonucleico (ADN, ou *deoxyribonucleic acid* - DNA), proteínas e lipídeos, causando disfunções estruturais e funcionais. A molécula de DNA absorve intensamente a energia do comprimento de onda do UV, principalmente nos menores, como parte da UVB, devido à natureza das ligações químicas que possui. Assim as bases nitrogenadas, sendo cromóforos da radiação UV, tornam-se importante alvos aos efeitos nocivos desta radiação (GABRIELSKA *et al.*, 2005).

Em resposta aos danos de DNA induzidos por UV, muitos processos de defesa celular são iniciados, dentre eles, reparo de DNA, acúmulo de proteína p53 e superexpressão de alguns genes regulados por p53 que podem levar ao bloqueio do ciclo celular ou à apoptose (LJUNGMAN e ZHANG, 1996; MUKHTAR e ELMETS, 1996).

Por ser a radiação UV altamente genotóxica, o reparo do DNA é essencial na inibição de efeitos prejudiciais como a mutagênese e morte celular (DE GRUIJL, 1999). O reparo por excisão de nucleotídeos (REN) é uma via de reparo universal, capaz de remover uma grande variedade de lesões de DNA, incluindo lesões induzidas por UV, adutos químicos e algumas formas de danos oxidativos (ADIMOOLAM *et al.*, 2002). O processo REN envolve a ação de cerca de 30 proteínas num mecanismo que consiste no reconhecimento da lesão no DNA; incisão da fita lesada em ambos os lados da lesão e a alguma distância desta; excisão do oligonucleotídeo contendo a lesão; síntese de um novo segmento de DNA utilizando a fita não-danificada como molde e por fim, ligação da fita (HOEIJMAKERS, 1993). Um defeito em uma dessas proteínas envolvidas nesse reparo pode gerar três diferentes síndromes recessivas e raras denominadas *Xeroderma pigmentosum* (XP), síndrome de Cockayne e Tricotiodistrofia (LEHMANN, 2003). A XP, por exemplo, caracteriza-se pela pele seca (*xeroderma*), pigmentação anormal nas áreas de pele expostas ao sol (*pigmentosum*), fotossensibilidade e elevada predisposição ao câncer de pele. Comparados com indivíduos não portadores, pacientes XP têm um risco aumentado de mais de mil vezes de desenvolver câncer de pele nas áreas expostas ao sol (KRAEMER *et al.*, 2007).

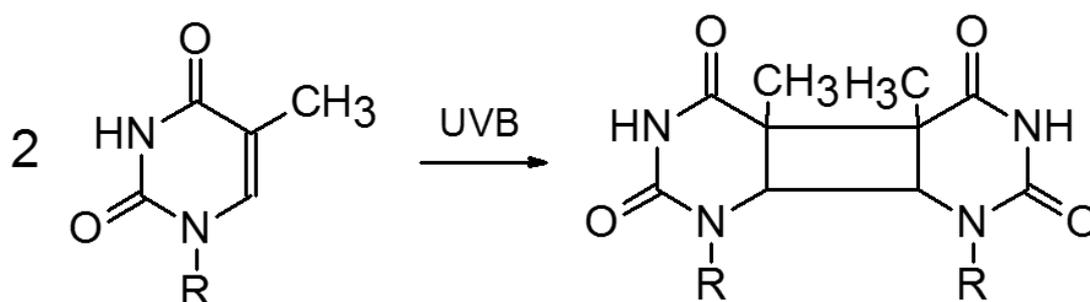
Os danos causados pela radiação UV ao DNA são produzidos através de efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos resultam da transferência da energia da radiação para o DNA, modificando sua estrutura, podendo levar a lesões como hidratos de pirimidina, adutos de pirimidina, e principalmente, dímeros de pirimidina ciclobutano (*cyclobutane pyrimidine dimers*, CPDs) (FRIEDBERG *et al.*, 2006; MATSUMURA *et al.*, 2004). Os efeitos indiretos resultam da interação da energia da radiação com moléculas intermediárias, incluindo a água

e aminoácidos, levando à geração de espécies reativas do oxigênio (EROs), dependente da presença de O₂ no meio (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

1 EFEITOS DIRETOS DA RADIAÇÃO UV

Os dímeros de pirimidina se caracterizam por ligações covalentes entre pirimidinas adjacentes formando anéis nas posições C-5 e C-6 (CPDs) ou C-4 e C-6 (6-4 timina-citosina). A formação de dímeros de pirimidina corresponde a 98% dos danos diretos da radiação UVB. Destes dímeros, 75% são produzidos na forma de CPDs (Figura 4) e 25% na forma de outros fotoprodutos a exemplo 6-4 fotoprodutos (SINHA E HADER, 2002). Ambas as lesões ocorrem mais frequentemente em áreas de repetições de resíduos de pirimidina, que são conhecidas como *hotspot* de mutações induzidas por UV. Os CPDs podem ser os maiores contribuintes para mutações em células de mamíferos (TORNALETTI E PFEIFER, 1996).

Figura 1 - Formação de dímeros de pirimidina ciclobutano a partir de bases pirimidínicas expostas à radiação ultravioleta B.



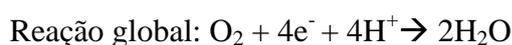
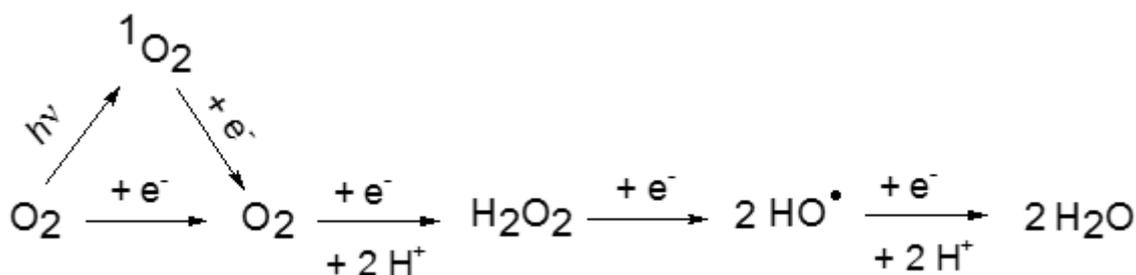
Fonte: SVOBODOVA *et al.* (2006).

Os dímeros desestabilizam a estrutura em dupla-hélice da cadeia de DNA resultante e, assim, a replicação e a expressão gênica são bloqueadas até que a lesão seja reparada. Portanto, estes fotoprodutos podem levar à mutagenese e carcinogênese (DE GRUIJL, 1999; TAYLOR *et al.*, 1997).

2 EFEITOS INDIRETOS DA RADIAÇÃO UV

EROs são intermediários gerados por reações sequenciais de redução univalente da molécula de oxigênio, produzidos pela adição de elétrons, livres ou não pareados (SCANDALIOS, 2002; Halliwell e Gutteridge, 1999). São consideradas EROs o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) (SCANDALIOS, 2002; SHARMA e DUBEY, 2004). O oxigênio singlete (1O_2) também é uma ERO, sendo produto de reações de fotossensibilização, por exemplo, onde cromóforos são expostos à luz visível ou UVA e absorvem energia ficando em estado excitado. EROs têm instabilidade eletrônica grande e, por esta razão, apresentam alta capacidade reativa e meia vida curta (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) (Figura 2).

Figura 2 - Geração de espécies reativas do oxigênio pela redução univalente do oxigênio molecular.



Fonte: CARVEZAN, 2008.

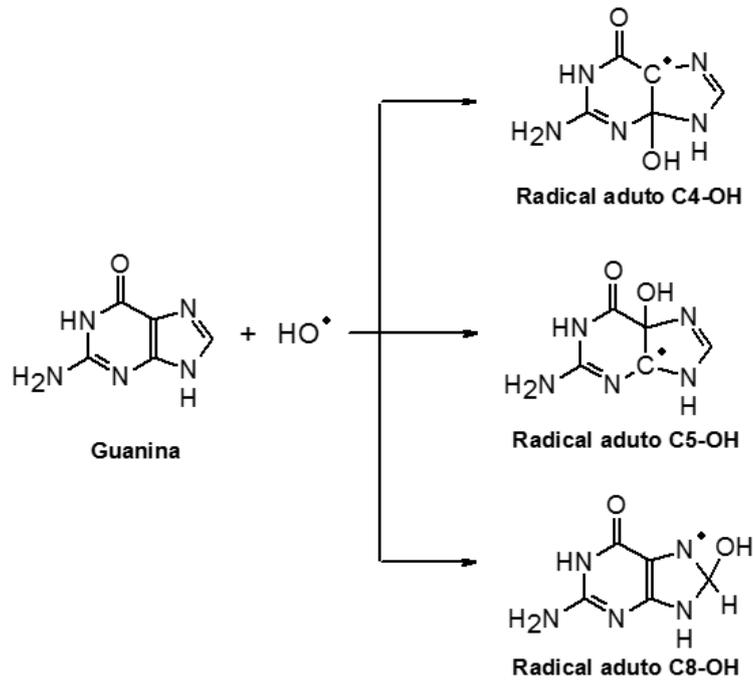
O acúmulo de EROs leva a danos nas moléculas de DNA, proteínas e lipídeos podendo levar à morte celular (APEL E HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2002). A geração excessiva de ERO ou a diminuição da capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes pode culminar no comprometimento de biomoléculas celulares, conhecido como dano oxidativo (HALLIWELL, 2006). As formações de ERO durante a exposição solar e a consequente indução de estresse oxidativo estão associadas a vários processos de carcinogênese. Durante estes processos destacam-se a indução de alterações estruturais do DNA resultando em mutações, alterações genéticas, tais como na expressão dos proto-oncogenes e genes supressores de tumor (por exemplo, p53) e na progressão destes levando à transformação de tumores benignos em malignos (ATHAR, 2002; YAAR e GILCHREST, 2007).

A radiação UVA gera EROs e o estresse oxidativo que é reconhecido como um mediador de lesões no DNA e de apoptose, assim como um biomarcador importante para indução ao câncer (MERWALD *et al.*, 2005; LECCIA *et al.*, 1999). O oxigênio singlete está particularmente envolvido nos efeitos biológicos de UVA (BASU-MODAK e TYRRELL, 1993). Além disso, a radiação UVA é capaz de penetrar nas camadas dérmicas em doses significativas, afetando não apenas fibroblastos dérmicos, células dendríticas dérmicas e células endoteliais, como também células inflamatórias infiltradas na pele, como linfócitos T, mastócitos e granulócitos (KRUTMANN, 1998). Estudos em culturas de células humanas mostraram que lesões no DNA induzidas por UVA incluíram quebras de fitas simples e formação de ligações cruzadas; e um baixo nível de fotoprodutos como dímeros de pirimidina. Para tratamentos com UVB a indução de fotoprodutos foi maior (STARY *et al.*, 1997).

Um dos exemplos de danos indiretos gerados na interação do UV com o DNA são as roturas de cadeias polinucleotídicas. Estas roturas ou quebras requerem a presença do oxigênio molecular e são mediadas por fotooxidações que conduzem à formação de ERO (LECCIA *et al.*, 1999). Podem ocorrer em apenas uma das cadeias em quebra de fita simples (*single stranded breaks*, SSB) ou, ainda, em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA formando, assim, a quebra de dupla fita (*double stranded breaks*, DSB). Além disso, SSB podem levar à DSB durante a replicação celular (BERRA, 2008).

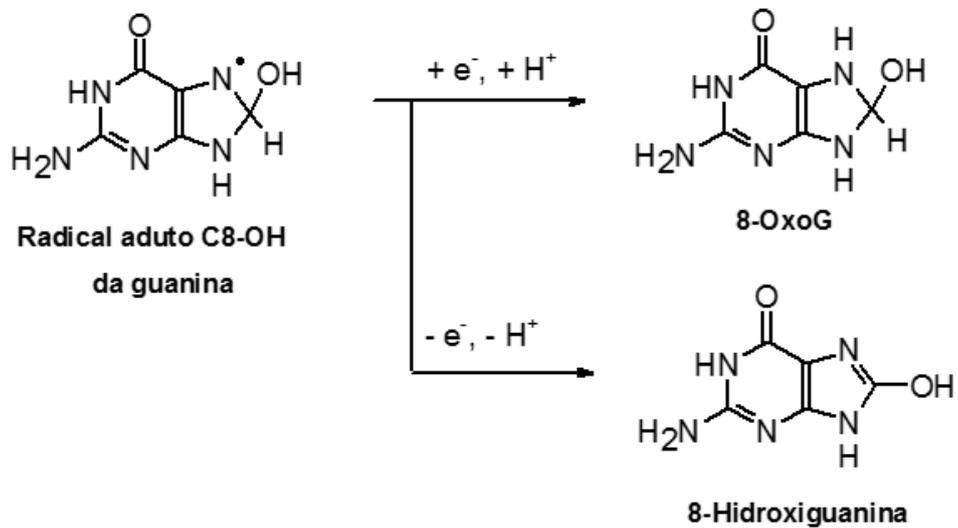
A reação do DNA com EROs também pode levar à formação de bases oxidadas. Por exemplo o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) pode gerar uma multiplicidade de danos, uma vez que pode atacar purinas, pirimidinas e pentoses. Este radical é bastante estudado na geração de reações radiculares com a guanina presente tanto em nucleosídeos (2-desoxiguanosina) formando 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), quanto na sua forma nucleotídica formando 8-oxoG (Cadet *et al.*, 2003). Esse radical pode atacar as posições 4, 5 ou 8 do anel purínico da guanina (Figura 3), sendo que a adição de $\cdot\text{OH}$ na posição 8 produz radical aduto C8-OH que por sua vez, pode ser reduzido a 8-oxoG e/ou oxidado a 8-hidroxi-guanina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999) (Figura 4). A base modificada pode se ligar tanto à citosina quanto à adenina durante a replicação do DNA, levando à mutagênese. Esta lesão é a maior geradora de danos mutagênicos via EROs, por aumentar a transversão GC:TA (LE PAGE *et al.*, 1995; FRIEDBERG *et al.*, 2006). 8-OxodG tem sido proposto como um biomarcador chave em danos oxidativos no DNA relevantes para estudos de carcinogênese (COOKE *et al.*, 2010). Assim, o controle da formação de EROs pela radiação UV é de suma importância para a prevenção dos efeitos deletérios da exposição solar (GUARATINI *et al.*, 2009).

Figura 3 - Reação do radical hidroxil com a base guanina.



Fonte: BERRA, 2008.

Figura 4 - Formação de produtos a partir do radical aduto C8-OH da guanina.



Fonte: BERRA, 2008.

3 MUTAGÊNESE E CARCINOGENESE

Uma mutação é definida como uma mudança na sequência do DNA, que leva a uma alteração herdável de função genética. Deste modo, os agentes físicos, químicos ou biológicos que mudam a sequência do DNA são genotóxicos. Uma vez que as mutações são frequentemente associadas à iniciação de cânceres e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de agentes químicos ou naturalmente presentes no ambiente é uma informação essencial, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem (RIBEIRO, 2003).

A carcinogênese é um processo multifatorial de conversão de uma célula normal em uma célula maligna, no qual os agentes indutores são denominados carcinógenos. É necessária a exposição repetida aos carcinógenos para que haja o desenvolvimento de tumores malignos. Esse desenvolvimento tem duração variável devido à natureza complexa da carcinogênese, a qual pode ser dividida em três estágios: a iniciação, a promoção e a progressão (BALMAIN e HARRIS, 2000).

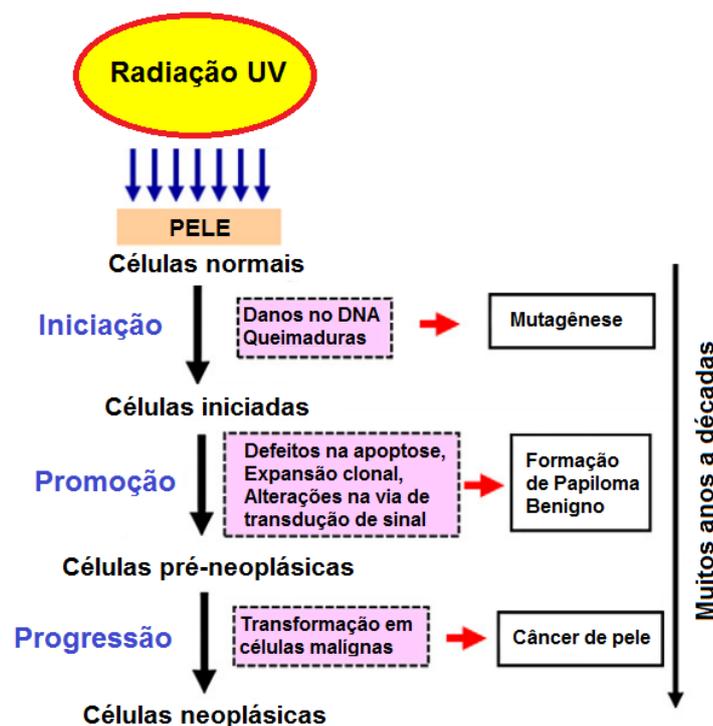
A iniciação, é o primeiro estágio da carcinogênese, no qual as células sofrem o efeito do agente carcinogênico, que provoca modificações em alguns genes. É causada por uma alteração irreversível do DNA, como a reação dessa molécula com substâncias carcinogênicas. A iniciação é seguida pela promoção, a qual envolve a seleção e expansão das células iniciadas (geneticamente alteradas), podendo levar ao desenvolvimento de um tumor. Durante a promoção do tumor, o material genético alterado da célula iniciada altera a expressão dos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. A promoção é reversível. O estágio final da carcinogênese consiste na multiplicação descontrolada, invasão de tecidos, metástase e instabilidade genética aumentada. Este processo é também irreversível (SPENCE, 2001; LOUREIRO *et al.*, 2002).

A maioria dos carcinógenos genotóxicos é considerada pré-carcinógeno, ou seja, são compostos estáveis no pH fisiológico e, portanto, incapazes de reagir com o DNA. Esses carcinógenos podem ser biotransformados por enzimas como citocromos P450 (CYP) e glutatona-S-transferases (GST), em compostos mais hidrossolúveis. Os produtos gerados são eletrofílicos e irão reagir com centros nucleofílicos das células, dentre eles regiões do DNA, levando a formação de adutos. Esses adutos podem ser reparados por enzimas de reparo, mas caso a célula se divida antes que o reparo ocorra, esse aduto pode levar ao aparecimento de uma alteração permanente do DNA (PINTO E FELZENSZWALB, 2003).

A base do DNA mais suscetível a esse tipo de ataque é a guanina, como dito no item 2, mas já foram relatados adutos formados com todas as bases (DIPPLE, 1995). Sendo formados no DNA através de mecanismos químicos específicos, tais adutos podem levar a mutações em proto-oncogenes ou em genes supressores de tumor e iniciar o processo de carcinogênese. Os proto-oncogenes funcionam enviando estímulos para a proliferação celular, os genes supressores de tumor atuam na regulação desse processo. Proto-oncogenes são genes ligados a processos de proliferação e diferenciação que ocorrem nas células normais. Porém, quando ocorrem alterações nesses proto-oncogenes eles podem tornar-se oncogenes (PINTO e FELZENSZWALB, 2003).

A radiação solar é um potente agente mutagênico e tanto evidências epidemiológicas quanto moleculares têm estabelecido este agente como o principal causador de câncer de pele (LEFFEL AND BRASH 1996). De fato, a radiação UV está associada ao desenvolvimento de alterações cutâneas agudas e crônicas, como queimadura, imunossupressão, alterações de pigmentação, fotoenvelhecimento e o câncer de pele (TEIXEIRA, 2010). O desenvolvimento de câncer de pele é dado por um processo multifatorial envolvendo as três distintas fases da carcinogênese, exemplificadas por iniciação, promoção e progressão, conforme descrito anteriormente (Figura 5).

Figura 5. Estágios do câncer de pele induzido pela radiação ultravioleta solar.



Fonte: adaptado de AFAQ, 2011.

O câncer de pele leva muitos anos para se desenvolver. E, aparentemente, as melhores fases de intervenções podem estar na promoção e progressão da carcinogênese, pois são etapas mais lentas. Este fato aumentou a credibilidade dos estudos de fotoproteção no controle do câncer de pele (AFAQ, 2011).

3.1 Câncer de pele

O câncer de pele é o câncer mais frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país (Instituto Nacional do Câncer [INCA], 2014). Este câncer é comumente dividido em não melanoma (carcinoma basocelular ou carcinoma epidermóide) e melanoma. O câncer de pele não melanoma é o mais incidente no país, sendo responsável por, aproximadamente, 1/5 dos casos novos de câncer. Porém, por apresentar altos índices de cura, sua taxa de mortalidade é uma das mais baixas. A maior incidência deste tipo de câncer de pele se dá na região da cabeça e do pescoço que são justamente os locais de exposição direta aos raios solares. Por outro lado, o melanoma, responsável por aproximadamente 5% dos casos de câncer da pele, apresenta alta letalidade, principalmente pela sua alta capacidade de desenvolvimento de metástases (INCA, 2014).

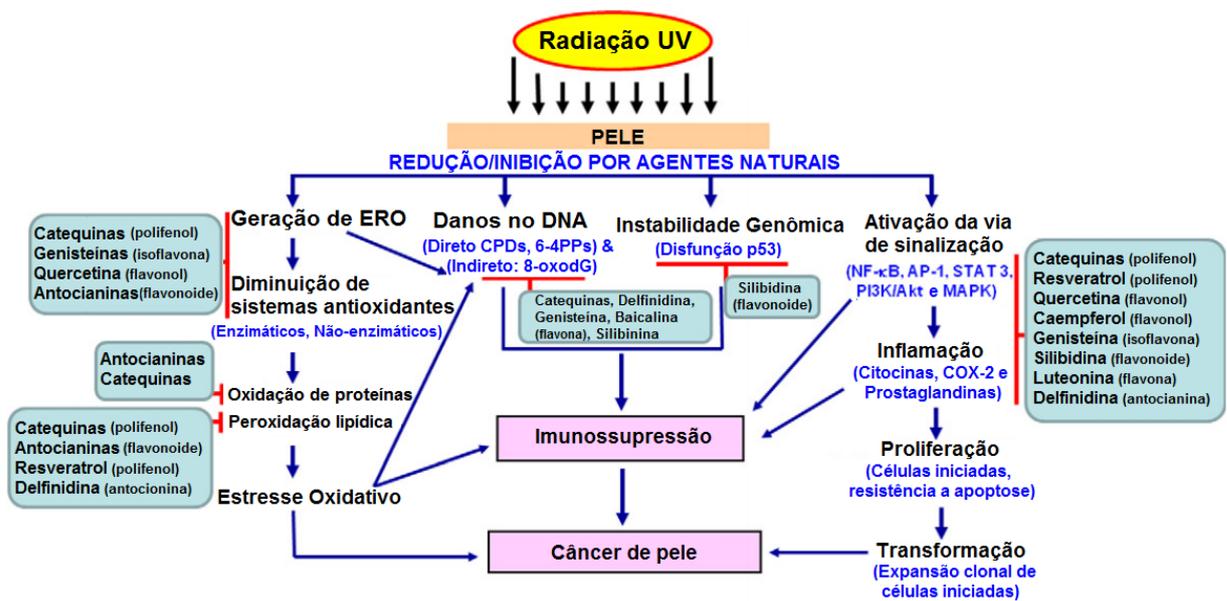
O principal fator de risco associado aos cânceres da pele é a exposição excessiva aos raios solares (raios UV). Outros fatores como irritações crônicas (úlceras angiodérmica e cicatriz de queimadura) e exposição a fatores químicos, como o arsênico, também podem levar ao desenvolvimento do câncer da pele. Com relação ao melanoma, além dos fatores já citados, associam-se a história prévia de câncer de pele, história familiar de melanoma, nevo congênito (pinta escura), XP e o nevo displásico (lesões escuras da pele com alterações celulares pré-cancerosas) (INCA, 2014).

Caucasianos que vivem em locais de alta incidência são os que apresentam maior risco de desenvolvimento do câncer de pele. A incidência de câncer para esses indivíduos tem aumentado em 44% a cada ano (GODAR, 2005). A alta ocorrência deste tipo de câncer no Brasil deve-se à posição geográfica do país, situando-se numa zona de alta incidência de raios UV e também por apresentar 50% da população se expondo muito ao sol e de maneira descuidada, seja por trabalho ou por lazer (POPIM *et al.*, 2008).

A principal medida para minimizar os danos causados pelo UV é a fotoproteção. Agentes naturais com potencial antioxidante, anti-inflamatório, anti-mutagênico, anti-carcinogênico e propriedades imunomodulatórias e que têm a capacidade de exercer efeitos inibitórios notáveis em diversos eventos celulares e moleculares estão ganhando considerável

atenção para a prevenção dos danos na pele induzidos por UV (BOWDEN, 2004; NICHOLS e KATIYAR, 2010; AFAQ, 2011) (Figura 6). Devido a estas propriedades, os agentes naturais, incluindo os produtos contendo ingredientes que sejam componentes botânicos, estão ganhando popularidade e conquistando, cada vez mais, espaço no mercado (AFAQ, 2011).

Figura 6 – Agentes naturais com capacidade de reduzir ou inibir os efeitos biológicos adversos da radiação ultravioleta.



Fonte: adaptado de AFAQ, 2011.

4 FOTOPROTETORES

Os fotoprotetores atuam de maneira preventiva no tecido cutâneo. Estes podem ser classificados como químicos, ou orgânicos, e físicos. Geralmente, os compostos orgânicos protegem a pele pela absorção da radiação e os inorgânicos, pela reflexão da radiação (FLOR *et al.*, 2007).

Os filtros químicos são moléculas fotoestáveis formadas essencialmente por compostos aromáticos, com grupos cromóforos que absorvem a radiação (GUARATINI *et al.*, 2009). No geral, os cromóforos possuem um substituinte doador de elétrons, como uma amina ou uma metoxila, na posição *orto* ou *para* do anel aromático. 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). Este processo não é permanente e ao retornarem para o estado fundamental, o excesso de energia absorvida é liberado em forma de calor (FLOR *et al.*, 2007).

Os filtros físicos atuam como uma barreira mecânica e impedindo assim a penetração da radiação na pele. A radiação UV que incide sobre eles é refletida não ocorrendo reações químicas ou excitações eletrônicas (GUARATINI *et al.*, 2009). Os filtros solares físicos são representados por dois óxidos, óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂) que são materiais semicondutores. Os mecanismos de absorção e de desativação envolvem transições entre bandas de valência e de condução do sólido. São constituídos de partículas, de preferência com tamanhos da ordem da radiação que se quer espalhar (FLOR *et al.*, 2007).

Os fotoprotetores estão inseridos na classe terapêutica dos emoliente-protetores dérmicos (WHO – *World Health Organization*). No Brasil, os filtros solares são classificados como cosméticos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica os protetores solares, bem como outros cosméticos que possuem também esta função (como, por exemplo, algumas maquiagens) como produtos de grau II. Para esta classificação, os critérios são definidos em função da probabilidade de ocorrência de efeitos não desejados, sua formulação, finalidade de uso, áreas do corpo a serem utilizados e cuidados na sua utilização (GUARATINI *et al.*, 2009).

A Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 47 de março de 2006 da ANVISA (Brasil, 2006) define a “lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes” que contempla 38 compostos. Sendo assim, o uso e a concentração de substâncias para a formulação de fotoprotetores no Brasil são restritos a esta lista. Entre os compostos utilizados nas principais associações de fotoprotetores

comercializados no Brasil estão benzofenona-3 (BZE), metoxicinamato de octila, padimato, octacrileno, oxibenzona e avobenzona. Além das substâncias desta lista, as formulações fotoprotetoras podem também conter outros compostos que atuam na pele, como é o caso de antioxidantes como a vitamina E. Esta, ao ser utilizada em produtos para a proteção solar e dependendo da sua formulação, pode aumentar o fator de proteção solar *in vivo* (GASPAR *et al.*, 2007). Assim como a vitamina E, outras substâncias e mistura delas, sintéticas ou de origem natural, vêm sendo amplamente estudadas, na busca da otimização dos protetores solares, ou visando ainda à busca de novas moléculas para a ampliação da lista de substâncias fotoprotetoras aprovadas (LIN *et al.*, 2008).

Portanto, as pesquisas destas moléculas fotoestáveis para a utilização em protetores solares estão em expansão, sendo que atualmente se destaca um interesse crescente para o desenvolvimento de filtros baseados em produtos naturais. A escolha de novos ativos envolve principalmente a capacidade de absorção da luz UV pelos cromóforos de cada molécula, associada à possível atividade antioxidante (VESSECCHI *et al.*, 2007; GUARANITI *et al.*, 2004).

Existe uma grande quantidade de produtos naturais que poderiam atuar como filtros químicos. A literatura científica tem relatado uma série de atividades antioxidantes sobre estruturas contendo anéis aromáticos como, por exemplo, os compostos fenólicos (VILA *et al.*, 2008; KANASHIRO *et al.*, 2004).

5 MUSGOS E SEUS MECANISMOS DE PROTEÇÃO À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Os musgos seriam seres bastante sensíveis à radiação UV devido a sua simplicidade estrutural e falta de defesas comumente encontradas em plantas superiores (cutícula espessa, ceras e epiderme), mas adquiriram defesas químicas e metabólicas através, por exemplo, de mecanismos antioxidantes, sistemas de reparo como o REN e da produção de metabólitos secundários que absorvem UV (GWYNN-JONES *et al.*, 1999; GEHRKE, 1998).

Musgos têm a capacidade de responder à exposição da radiação UVB produzindo alguns metabólitos secundários específicos (HUTTUNEN *et al.*, 1998; 2005a,b). Metabólitos secundários em briófitas são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, incluindo flavonóides (MARKHAM *et al.*, 1990), flavonas, flavonóis (STAFFORD, 1991) e carotenóides (ROBINSON *et al.*, 2001; LOVELOCK e ROBINSON, 2002).

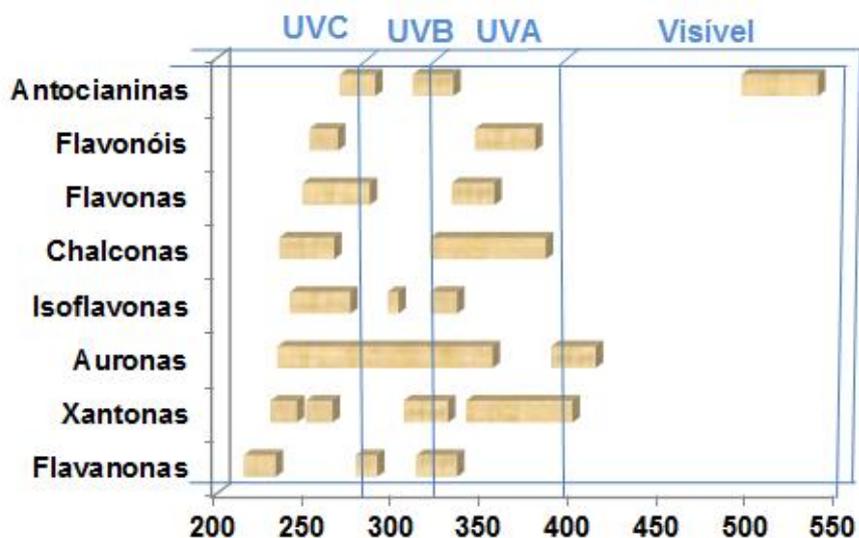
De modo geral, os flavonóides possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituídos de dois anéis benzeno, anéis A e B, ligados por um grupo pirano (com heteroátomo de oxigênio), anel C, cuja representação da fórmula é C6-C3-O2-C6. A única exceção para ausência de um anel pirânico é a chalcona (ANGELO *et al.*, 2007). Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro da classe dos flavonóides. Essas substituições incluem oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (HOLLMAN *et al.*, 1999). Os flavonóides apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com glicosídeo. Esta forma é conhecida como heterosídeos. São denominados de *O*-heterosídeos quando a ligação se dá por intermediário de uma hidroxila e de *C*-heterosídeo quando a ligação ocorre com um átomo de carbono. Quando o metabólito encontra-se sem o glicosídeo é chamado de aglicona ou genina sendo, frequentemente, denominada de forma livre (SIMÕES *et al.*, 2004).

As agliconas apresentam variedade de solubilidade e estabilidade. Poliglicosídeos são muito solúveis em água e pouco solúveis em solventes orgânicos apolares. A posição do carboidrato, como glicosídeo, na estrutura fenólica influi na solubilidade e em outras propriedades físico-químicas (AHERNE e O'BRIEN, 2002; ANTOLOVICH *et al.*, 2000). Por isso, a capacidade antioxidante dos polifenóis é influenciada pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação (SUN *et al.*, 2002; MCKAY e BLUMBERG, 2002).

Dentre as principais classes de flavonóides podem-se citar: flavonas, flavonóis e seus *O*-derivados, *C*-heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas, di-hidro-flavonóis, flavanonas, di-hidro-chalconas, flavanas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonóides, neoflavonóides, biflavonóides e catequinas (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilas adjacentes, localizadas em várias posições dos anéis A, B e C, além das duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo ($-C=O$) em algumas moléculas de flavonóides tornam esses compostos com significativa atividade antioxidante (ROESLER *et al.*, 2008). Além disso, essas moléculas possuem propriedades de absorção de luz em comprimentos de onda seletivos a radiação UVB, que apesar de atingir a superfície terrestre em menor proporção, esta radiação é considerada mais deletéria que a UVA, pois tem a capacidade de penetrar em camadas mais profundas da pele (REGO *et al.*, 2010).

Gráfico 1 - Faixas de comprimento de onda de absorção espectrofotométrica dos principais flavonoides.



Fonte: adaptado de Fontana *et al.* (2004).

Em musgos os flavonóides (Gráfico 1) são os mais abundantes, entre os quais flavonas, flavonol, antocianinas e seus derivados - biflavonóides, diflavonóides, triflavonóides e isoflavonóides - apresentam importante função de proteção, prevenindo, por exemplo, a indução de danos oxidativos (MARKHAM *et al.*, 1990). É conhecido que musgos podem acumular flavonóides rapidamente em resposta a altos níveis da radiação UVB (CALDWELL *et al.*, 1983), por um mecanismo dito aclimatização. Tal acumulação se dá

principalmente na epiderme, onde ocorre a triagem para evitar danos dentro da célula (DUNN *et al.*, 2006).

Além disso, estudos *in vitro* indicam que polifenóis, como os flavonóides encontrados em plantas, podem participar efetivamente de processos que possam ter implicações anticarcinogênicas. Entre estes processos, o mais evidente é a capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, sobre radicais livres reativos, levando ao radical fenoxil estabilizado por ressonância (SUN *et al.*, 2002; MCKAY e BLUMBERG, 2002).

O acúmulo dos metabólitos secundários que podem absorver radiação UVB torna-se particularmente importante na Antártica, pois protegeria as células vegetais dos danos induzidos por esta radiação. Os mecanismos de reparo podem tornar-se indisponíveis por motivos de dessecação ou congelamento (COCKELL e KNOWLAND, 1999; LOVELOCK e ROBINSON, 2002). Visto isso, a sobrevivência de musgos na Antártica, sendo esta uma região que sofre com a depleção da camada de ozônio, depende da capacidade de aclimatizar-se, ou seja, desenvolver mecanismos de fotoproteção através do aumento de substâncias que absorvem UV com o objetivo de evitar os danos induzidos por radiação UVB (ROBINSON *et al.*, 2003).

As espécies de musgo na Antártica que apresentam baixos níveis de substâncias que absorvem radiação UVB, como os flavonóides, acumulam maiores níveis de pigmentos carotenóides sugerindo a possibilidade de que os musgos possam utilizar mecanismos de proteção à radiação UV alternativos à síntese dos flavonóides (LOVELOCK e ROBINSON, 2002; ROBINSON *et al.*, 2001). Estes mecanismos alternativos seriam uma adaptação dessas espécies de musgos, pois os carotenóides, além de serem pigmentos importantes para fotossíntese, por absorverem luz e transferirem esta energia para a clorofila, podem também proteger a clorofila de situações de excesso de luz, agindo, portanto, como filtro de radiação UV e evitando a fotooxidação dos musgos (TEVINI e TERAMURA, 1989).

Os carotenóides são isoprenóides lipofílicos sintetizados por todos os organismos fotossintéticos. São encontrados na natureza em duas classes: carotenos e xantofilas. Os carotenos caracterizam-se por serem hidrocarbonetos lineares que podem ser ciclizados em uma ou ambas as extremidades da molécula como, por exemplo, o β -caroteno. Xantofilas são derivados oxigenados de carotenos, como luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina. Nos carotenóides a estrutura responsável pela absorção da luz é o grupamento cromóforo que se caracteriza pelas duplas ligações conjugadas (BOTELLA-PAVIA e RODRIGUEZ-CONCEPCION, 2006).

As propriedades antioxidantes dos carotenóides fundamentam-se na estrutura destes compostos, principalmente no sistema de duplas ligações conjugadas, tornando possível a captação de radicais livres (YOUNG e LOWE, 2001). O carotenóide excitado resultante libera energia baixa e, portanto, inofensiva ao meio celular (DI MASCIO *et al.*, 1989). Assim, se compostos de absorção da radiação presentes na membrana epidérmica, como os flavonóides, não impedem completamente a penetração da radiação UV, os carotenóides podem ser capazes de minimizar os danos às macromoléculas.

Estudos com musgos *in situ* na Antártica durante o verão demonstraram aumento nas concentrações de flavonóides e carotenóides, sugerindo que alguns musgos produzam esses pigmentos de proteção para radiação UV (DUNN e ROBINSON, 2000; LOVELOCK e ROBINSON, 2002).

Diversos estudos na literatura apontam mostram que musgos da região Antártica apresentam compostos capazes de proteger contra radiação UV. POST (1990) apontou que o musgo *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. aumenta a produção de pigmentos fotoprotetores, como antocianinas e carotenóides, principalmente violaxantina, como estratégia de adaptação ao ambiente Antártico. GREEN *et al.* (2005) mostraram que os musgos *C. purpureus* e *Bryum subrotundifolium* são resistentes à radiação UVA porque possuem substâncias fotoprotetoras e que estão bem adaptados a altos níveis da incidência da radiação UVA.

Os musgos *C. purpureus*, *Bryum pseudotriquetrum* e *Grimmia antarctici* apresentam altas concentrações de pigmentos fotoprotetores como a xantofila, indicando que esses musgos podem suportar estresses fotoquímicos (LOVELOCK e ROBINSON, 2002). Além disso, *G. antarctici* também apresentou alta concentração de carotenóides, especialmente, β -caroteno e zeaxantina (ROBINSON *et al.*, 2005).

DUNN *et al.* (2006) mediram as concentrações de pigmentos que absorvem UVB em três espécies de musgos da Antártica. Estas concentrações foram comparadas para determinar se os pigmentos foram induzidos pela radiação UVB ou por outro parâmetro ambiental. Foi avaliado também se existiam diferenças entre as espécies quanto às respostas na produção de pigmentos. Os autores observaram significativas diferenças sazonais no potencial de UVB e isto refletiu na produção de pigmentos. *B. pseudotriquetrum* e *C. purpureus* apresentaram os melhores resultados de proteção em relação aos potenciais danos causados pela depleção da camada de ozônio quando comparado à espécie *Schistidium antarctici*. Os autores apontaram também que a espécie *B. pseudotriquetrum* acumulou altas concentrações de pigmentos que absorvem UVB e mostrou associação entre esta radiação e tais pigmentos. Uma vez que esses pigmentos podem agir como fotoprotetores ou como antioxidantes, os resultados sugerem que

B. pseudotriquetrum é mais bem adaptada aos efeitos negativos causados pelo aumento da exposição ao UVB. O musgo *C. purpureus* apresentou alta concentração de antocianinas que poderiam proporcionar proteção antioxidante durante a exposição ao UVB. O musgo *S. antarctici* apresentou baixo efeito fotoprotetor sugerindo que esta espécie é mais vulnerável as alterações climáticas (DUNN *et al.*, 2006).

MARKHAM *et al.* (1990) mostraram que flavonóides do musgo *Bryum argenteum* da Antártica foram correlacionados com os históricos níveis de ozônio, sugerindo a possibilidade de que estes compostos foram ativamente induzidos por UVB.

PEREIRA *et al.* (2009) investigaram o efeito fotoprotetor de extratos metanólicos de três espécies de plantas da Antártica, *Deschampsia Antarctica* Desv.; *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. e *Polytrichum juniperinum* Hedw. contra os danos induzidos pela radiação UV usando diversos modelos biológicos. Os autores concluíram que essas espécies apresentam propriedades fotoprotetoras que podem ser atribuídas a cromóforos, como flavonas e carotenóides, que agem absorvendo UV e como antioxidantes, bem como estimulando processos de reparo no DNA.

Sanionia uncinata (Hedw) Loeske é uma espécie de musgo (filo Bryophyta, ordem Hypnales família Amblystegiaceae) que habita diversas regiões do globo terrestre, entre as quais a Antártica (HEDENÄS, 1989), a qual compreende todas as terras localizadas abaixo do paralelo 60° Sul. Seus ecossistemas são caracterizados por baixas temperaturas, aridez e altitude (LUD *et al.*, 2002). As vegetações desse continente habitam em poucas áreas de degelo, que constituem menos de 2% do continente (ROBINSON *et al.*, 2003). A Ilha Rei George, localizada no Arquipélago das Ilhas *Shetland* do Sul, na Antártica, contém diversos tipos de formações de briófitas, entre os quais os tapetes de musgos de *S. uncinata* (Hedw) Loeske (OCHYRA, 1998).

O continente Antártico apresenta evidências a respeito da depleção da camada de ozônio desde 1970 (FREDERICK *et al.*, 1998). Entre 1998 e 2001 esta depleção intensificou-se e, com isso, houve um aumento significativo nos níveis da radiação UVB (NASA, 2010).

Este continente possui duas estações bem definidas, o verão, com aproximadamente 20 horas/luz por dia, e inverno, com apenas duas horas/dia de luz, com duração de seis meses cada (VICTORIA, 2005). Como citado acima é a região mais afetada pela destruição da camada de ozônio, principalmente no mês de setembro, devido a uma combinação de temperaturas extremamente baixas na estratosfera da região, presença de luz solar e o aumento dos níveis de componentes de cloro na atmosfera. Esses compostos são, principalmente, de origem antropogênica, liberados pelos clorofluorocarbonetos. Uma vez

que o composto de cloro é liberado por reações heterogêneas, a luz solar inicia e, mantém a perda fotoquímica do ozônio por catálise. Essas reações fotoquímicas ocorrem na superfície de partículas minúsculas presentes em nuvens polares estratosféricas (PSC – do inglês *Polar Stratospheric Clouds*), as quais são formadas sob condições extremamente frias do inverno polar. Em dezembro as temperaturas sobem e impedem a formação de PSCs (SOLOMON, 1986; 1999; LEE *et al.*, 2001).

Outros dois musgos estudados neste trabalho, *Holomitriopsis laevifolia* (Broth) H. Rob. e *Leucobryum laevifolium* (Broth) são pertencentes ao filo Bryophyta, ordem Dicranales, família Leucobriaceae. A primeira espécie tem distribuição geográfica na Venezuela, Guiana e Amazonas, Brasil. A segunda tem ampla habitação em diversas regiões do globo terrestre, entre as quais o Amazonas, Brasil (Instituto Jardim Botânico do Rio de Janeiro - JBRJ, 2014 e NEWTON e ROBINSON, 1994).

Cortado pela linha do Equador, o Amazonas é o maior estado brasileiro em área, com mais de 1,5 milhões de km². É dominado pelo clima equatorial caracterizado por elevadas temperaturas e altos índices pluviométricos, decorrente principalmente pela proximidade do Estado com a linha do Equador (PORTAL BRASIL, 2014). Esta linha cruza, na região do Amazonas, o ponto mais ocidental do Município de São Gabriel da Cachoeira, local onde está grande parte do território do Parque Nacional do Pico da Neblina. O Pico da Neblina situa-se num dos pontos mais elevados do Brasil com 3014 metros de altitude, local próximo ao Morro Seis Lagos, na região mais ao Norte do Estado (IBGE, 2014). Nessa região é possível observar grande biodiversidade vegetal, com diversos tipos de briófitas, entre as quais musgos como *H. laevifolia* e *L. laevifolium* (JBRJ, 2014).

Na região Equatorial não ocorre o fenômeno da depleção da camada de ozônio. Entretanto, esta região é marcada por índices elevados de radiação UVB durante todo o ano (KIRCHHOFF e ECHER, 2001). KIRCHHOFF *et al.* (2001) apontam que os maiores índices de radiação UVB, observados esporadicamente durante o período de depleção da camada de ozônio na Península Antártica, são comparáveis aos valores típicos de índice de UVB na região equatorial. Dados semelhantes já haviam sido observados por DAHLBACK *et al.* (1989).

6 ATIVIDADES FOTOPROTETORAS EM *SANIONIA UNCINATA*, *HOLOMITRIOPSIS LAEVIFOLIA* E *LEUCOBRYUM LAEVIFOLIUM*

NEWSHAM *et al.* (2002) apontaram aumento da síntese dos carotenóides violaxantina, neoxantina, luteína, zeaxantina e β -caroteno em *S. uncinata* no mesmo período em que ocorre aumento da incidência de radiações UVB na Antártica. Este aumento pode estar relacionado ao processo de aclimatização desenvolvido pelo musgo devido à alta incidência de radiação UVB.

LUD *et al.* (2002) indicaram que a exposição natural da radiação UVB no verão não aumentou de forma significativa os valores de CPDs no genoma de *S. uncinata* na região Antártica. Os mesmos autores afirmaram ainda que a concentração constitutiva basal dos compostos que absorvem UVB não se altera em função da redução de radiação UVB natural. Eles concluíram isto através de experimentos utilizando filtros que impedem a passagem da luz UV ao longo de dois anos, sugerindo que flavonóides e carotenóides são constitutivos em *S. uncinata*. Concluíram também que este musgo parece tolerar bem altos níveis de radiação UVB. Esta tolerância pode estar relacionada à capacidade de adaptação ao ambiente estressado.

BHATTARAI *et al.* (2008) determinaram o conteúdo fenólico pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*. Também avaliaram a atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico do musgo *S. uncinata* coletado na Ilha Rei George, Antártica, através de ensaios químicos *in vitro* de determinação do poder redutor e da atividade captadora de radical superóxido, de cátion ABTS⁺ [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] e do radical livre DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Os autores observaram que os teores de polifenóis totais do extrato hidroalcoólico expressos em mg equivalente de catecol foi de $12,7 \pm 2,7$ mg/g. O mesmo extrato apresentou propriedades redutoras que podem estar relacionadas à sua atividade antioxidante (PIN-DER-DUH *et al.*, 1999). Este mesmo extrato também foi capaz de inibir a produção do cátion ABTS⁺ (BHATTARAI *et al.*, 2008).

Além disso, extrato hidroalcoólico de *S. uncinata* apresentou atividade captadora para o radical DPPH, indicando que este musgo pode ser uma fonte importante de componentes antioxidantes. O extrato também apresentou atividade captadora para radical superóxido (BHATTARAI *et al.*, 2008).

Os resultados de Bhattarai *et al.* (2008) sugerem que o extrato hidroalcoólico de *S. uncinata* poderia ser uma importante fonte de agentes antioxidantes para aplicações na

medicina e cosméticos. Esta propriedade é importante uma vez que antioxidantes protegem as células vegetais dos danos induzidos pelas EROs.

O nosso grupo de pesquisa avaliou o potencial protetor de extratos aquoso e hidroalcoólico do musgo *S. uncinata* na quebra do DNA plasmidial, estudando modificações topológicas, após eletroforese em gel de agarose. Foi avaliado também o conteúdo fenólico (expresso em catecol) pelo método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*. Nossos dados demonstraram que os extratos apresentaram atividades antioxidantes ao protegerem o DNA contra quebras induzidas pelos radicais $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$. Nós sugerimos que tais efeitos possam ser devido a presença de compostos fenólicos. Os teores de polifenóis totais expressos em mg/g equivalente de catecol foram $1,04 \pm 0,27$ and $5,89 \pm 2,05$ mg/g para extrato aquoso e hidroalcoólico, respectivamente. Entretanto, os extratos intensificaram a quebra induzida por reação tipo-fenton. Neste caso, foram observadas diferenças entre os extratos ao se utilizar um capturador de radicais $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$ na presença dos extratos. A intensificação da quebra induzida pelo extrato aquoso foi inibida, mas não para o extrato hidroalcoólico. Nós sugerimos que este efeito distinto possa estar associado a maior quantidade de compostos fenólicos, comparativamente ao extrato aquoso, levando a um efeito pró-oxidante (FERNANDES, 2010; FERNANDES *et al.*, 2011a; 2010; 2009a).

Em outro trabalho do nosso grupo foram investigadas as atividades de fotocitotoxicidade ou fotoproteção dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *S. uncinata* em sistemas biológicos através de curvas de sobrevivência à radiação UVC, utilizando cepas de *Escherichia coli* deficientes e proficiente no sistema de REN. Também foi analisada a ação fotoquímica da radiação UVC em solução aquosa de timina (dimerização) na presença e ausência dos extratos, através da fotometria. Observou-se que ambos os extratos induziram efeito fotoprotetor contra a radiação UVC em cepas de *E. coli*. Os dois extratos preveniram a ciclização de timina (dimerização de pirimidina), mas o extrato aquoso mostrou maior eficiência de inibição comparativamente ao extrato hidroalcoólico. Ademais, não foi observada indução mutagênica ou citotóxica por ambos os extratos no ensaio de *Salmonella*/microsoma, nas concentrações de 1 a 40 μg /placa, usando as cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 (FERNANDES, 2010; 2011b, 2010, 2009b,c).

Os dados acima mostram que há poucos dados na literatura em relação à atividade fotoprotetora, antioxidante, mutagênica e tóxica de diferentes extratos de musgos *S. uncinata* e não há dados sobre os musgos *H. laevifolia* e *L. laevifolium*. Assim, estudos mais aprofundados com essas três espécies tornam-se relevantes.

O ensaio de *Salmomella*/microsossoma aplicado nesse estudo é a metodologia de triagem mais utilizada atualmente como indicadora de possíveis mutágenos para mamíferos, selecionada para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003; MORTELMANS e ZEIGER, 2000). Além disso, este ensaio faz parte dos exigidos pela OECD (1997). É usado como teste inicial para determinar mutagenicidade de novas drogas e substâncias químicas, pois há um alto valor preditivo para carcinogenicidade em roedores e resposta positiva para mutagenicidade (MORTELMANS e ZEIGER, 2000). O teste emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (*his⁻*), apresentando diferentes mutações pontuais no *operon* desse aminoácido. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram mutações que restaurem a sua capacidade de síntese. Essas bactérias foram construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. O número de revertentes a auxotrofia para histidina (*His⁺*) é representado, pela contagem de colônias que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população de células à substância a ser testada. Há várias linhagens, com sensibilidade específica a determinadas classes de substâncias. Nesse estudo foram utilizadas as cinco cepas *standard* preconizadas pela OECD (TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104).

A cepa TA97 apresenta mutação locus *hisD6610* detectando mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura do RNA mensageiro (*frameshift mutation*) por deleção de pares de bases GC, tendo uma citosina adicional em sequência de seis citosinas. A cepa TA98 possui mutação no locus *hisD3052* detectando mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura do RNA mensageiro (*frameshift mutation*) por adição de pares de bases GC. A cepa TA100 apresenta mutação no locus *hisG46* detectando mutações por substituição de par de bases que resultam na substituição de uma sequência de síntese de prolina (GGG/CCC) por uma de leucina (GAG/CTC). As linhagens TA102 e TA104 contêm AT no sítio de mutação *hisG428*. Na TA102 este sítio está inserido no plasmídeo multicópia pAQ1 e na TA104 no cromossomo bacteriano. A *hisG428* é uma mutação *ochre*, TAA, que pode ser revertida por todas as seis possíveis modificações de pares de base levando a transições e transversões. Esta mutação confere sensibilidade a agentes oxidativos. A TA102, por ser proficiente em mecanismos de reparo, ainda detecta agentes que induzem ligações cruzadas (MORTELMANS E ZEIGER, 2000).

As linhagens citadas apresentam características genéticas adicionais que lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos tipos de agentes mutagênicos (MARON E AMES, 1983):

- (a) Mutação *rfa* causa perda parcial da barreira de lipossacarídeo da parede bacteriana, facilitando a difusão de moléculas grandes para a célula;
- (b) Deleção *uvrB* – a maioria das linhagens apresenta deleção do gene *uvrB*, um dos responsáveis pelo reparo de excisão de base, levando a um maior número de lesões reparadas por mecanismos sujeitos a erro, o que eleva a sensibilidade da detecção de mutágenos. A deleção deste gene se estendeu através do gene responsável pela síntese de biotina tornando as linhagens dependentes de biotina, com exceção da TA102, na qual o mecanismo de reparo livre de erro (*uvrB*) foi mantido;
- (c) Plasmídeo pKM101- contém o gene *mucAB*, responsável pelo sistema de reparo do tipo *error prone* (passível de erro) aumentando tanto a mutagênese espontânea como a induzida, elevando a sensibilidade das linhagens a uma variedade de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos. A linhagem TA102 contém também o plasmídeo multicópia pAQ1, que ao carregar a mutação *hisG428*, amplifica o número de sítios para mutagênese.

Alguns produtos químicos necessitam ser metabolizados *in vivo* para que seus derivados apresentem atividade mutagênica. Bactérias não possuem o sistema de oxidação via citocromo P450 encontradas em eucariotos na biotransformação de xenobióticos. Por isso, é necessário realizar os testes na presença e ausência de um sistema de ativação metabólica *in vitro*. O mais comumente utilizado é a fração microssomal S9, composta por um homogenato de células de fígado de ratos Sprague-Dawley, pré-tratados com a mistura bifenil policlorinada (Aroclor 1254), que induz um aumento de enzimas (P450), principalmente a síntese de CYP2B e CYP1A, que são envolvidas na biotransformação de vários compostos neste órgão (MORTELMANS E ZEIGER, 2000)

Nesse trabalho também foi realizada a determinação do Fator de Proteção solar (FPS) por método *in vitro*, desenvolvido por MANSUR *et al.* (1986) sendo recomendada principalmente para a análise de produtos fotoprotetores em fase de desenvolvimento (Garcia *et al.*, 1991). FPS é definido pela razão entre a dose mínima eritematosa (DME) na pele protegida dividida pela dose mínima eritematosa na pele não protegida. A DME é definida como a dose mínima de radiação UV requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível (BRASIL, 2012). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução RDC número 30, estabelece as normas para teste de FPS e rotulagem de produtos protetores solares. A ANVISA adotou como procedimentos válidos para medidas de FPS, as normas *Food and Drug Administration* (FDA), 1999 ou *Comité de*

Liason des Associations Européenes de l'industrie et de la Parfumerie (COLIPA), 2006 (BRASIL, 2012). Os dois métodos requerem o estudo com humanos. Assim, o método de FPS *in vitro* desenvolvido por MANSUR *et al.* (1986) demonstrou ser eficaz e rápido, além de apresentar uma boa correlação com os resultados *in vivo* (RAMOS *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 1999; VIOLANTE *et al.*, 2009; VELASCO *et al.*, 2011).

7 JUSTIFICATIVA

A radiação luminosa solar, especialmente a presente na faixa do UV, pode interagir com o DNA e levar à formação de produtos danosos que possuem efeitos diretos e indiretos. É conhecido também que as radiações UV podem levar a formação de diversos danos, dentre os quais queimaduras, fotoenvelhecimento e câncer de pele. A melhor medida para minimizar esses danos é a fotoproteção. Produtos naturais são importantes fontes de pesquisas para se investigar substâncias que possuam propriedades contra os efeitos induzidos pela radiação UV no DNA. Musgos expostos a altas incidências de radiação UV têm respondido à exposição da radiação UVB, produzindo alguns metabólitos secundários específicos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes. *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* são musgos que habitam regiões com alta exposição ao UV e, por isso, aclimatizam-se, ou seja, desenvolvem mecanismos de fotoproteção através do aumento de substâncias que absorvem UV com o objetivo de evitar os danos induzidos por radiação UVB, principalmente. Por conseguinte, no presente trabalho foram realizadas avaliações fitoquímicas, fotoprotetoras e antioxidantes de diversos extratos dessas espécies de musgos. Estas avaliações foram realizadas por métodos *in vitro*, pois fornecem informações preliminares significativas, anteriores aos estudos *in vivo*, evitando, portanto, a exposição à humanos ou animais. Esses ensaios foram preferencialmente realizados em microplacas (por vezes envolvendo adaptações experimentais), devido a maior rapidez e reprodutibilidade, além de ter a vantagem de testar concomitantemente vários extratos provenientes de diferentes espécies de musgos, a diversas doses e, principalmente, utilizando menor volume de material vegetal. Além disso, uma análise de possíveis riscos toxicológicos também foi investigada com os extratos das três espécies de musgos, a partir de diversos modelos biológicos, priorizando testes de atividade indutora e protetora sobre mutagenicidade e genotoxicidade e destes testes na presença do UV (fotomutagenicidade e fotogenotoxicidade).

8 OBJETIVOS

8.1 Geral

Investigar potencial fotoprotetor e possíveis riscos toxicológicos associados aos extratos dos musgos *Sanionia uncinata*, proveniente da Antártica, e *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium*, provenientes do Amazonas, com propósito de prospectar extratos promissores em fotoproteção.

8.2 Específicos

- a) Proceder coleta, classificação e depósito dos materiais botânicos para a confirmação e certificação.
- b) Realizar processos extrativos com metanol, água, etanol 70% ou absoluto e acetona para obtenção de extratos ricos em componentes polares e de baixa polaridade.
- c) Caracterizar a composição química pela absorção ao ultravioleta e visível, por teste fitoquímico de polifenóis totais e pela cromatografia líquida de alta eficiência.
- d) Avaliar o potencial de fotoproteção cutânea pela determinação do fator de proteção solar, comparando a agente regulamentado.
- e) Determinar a capacidade captadora de radicais livres aplicando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.
- f) Avaliar o potencial mutagênico e citotóxico aplicando o ensaio de *Salmonella*/microsoma.
- g) Investigar o potencial fotomutagênico através do teste de fotomutagenicidade.
- h) Avaliar a atividade fotoprotetora pela determinação da fotomutagenicidade sobre células bacterianas.
- i) Investigar os efeitos genotóxicos e citotóxicos através do ensaio de micronúcleo e viabilidade celular por WST-1.
- j) Investigar os efeitos fotogenotóxicos e fotocitotóxicos por meio do ensaio de fotomicronúcleo e pelo método de exclusão azul de tripan.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Coletas

9.1.1 Sanionia uncinata

A coleta de espécimes de *S. uncinata* (Figura 6) foi realizada nas áreas de degelo na Península de Henningin e na Península Keller, na Baía Almirantado, Ilha Rei George (~ 62°10'S, 58°25'W) localizada no Arquipélago de *South Shetland*, durante a Operação Antártica 30, na segunda fase do verão austral em Janeiro de 2012.

A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Antônio Batista Pereira, da Universidade Federal do Pampa, no Rio Grande do Sul. Esta espécie foi depositada no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (H-RJ) sob o número H-RJ 11.811.

Seguem os locais e as imagens da coleta (Figura 7 e Figura 8).

- Península Henningin (Figura 8A).
- Nas proximidades da Estação Antártica Comandante Ferraz (em destaque no retângulo azul no mapa da Figura 8B);
- Trilha Punta Plaza (Pontos 01 a 03 da Figura 8B);
- Trilha Ipanema/Refúgio 2 (Pontos 04 a 05 da Figura 8B);
- Trilha da Baleia (Pontos 06 a 09 da Figura 8B);
- Trilha da Casa do Cachorro/Trilha das Cruzes/Capela/VLF (Pontos 10 a 13 da Figura 8B).

Figura 7 - Coleta do musgo *Sanionia uncinata* na Antártica.



(A)



(B)

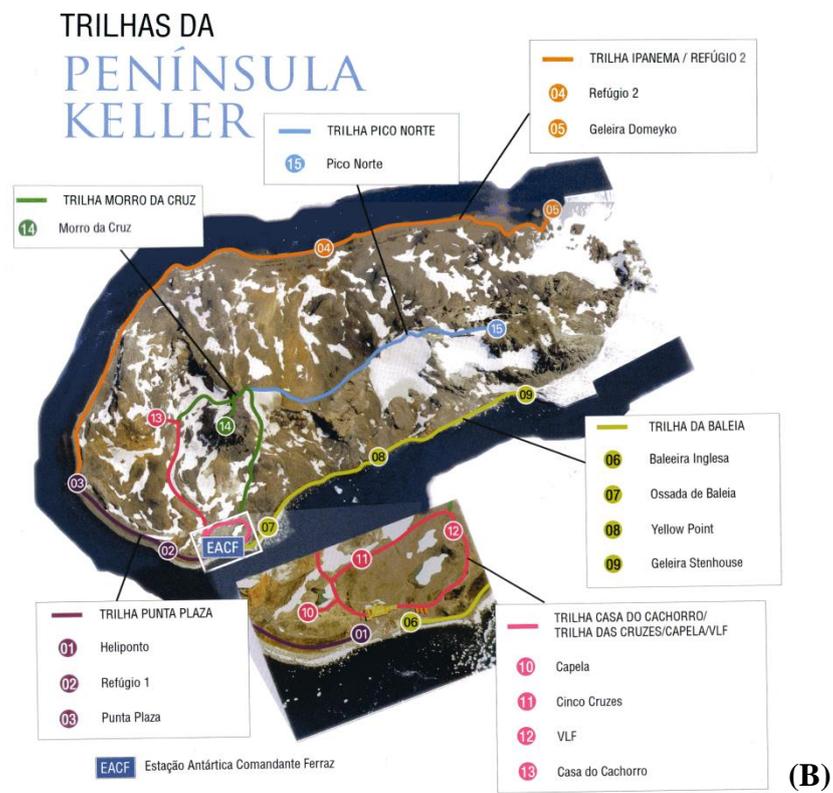
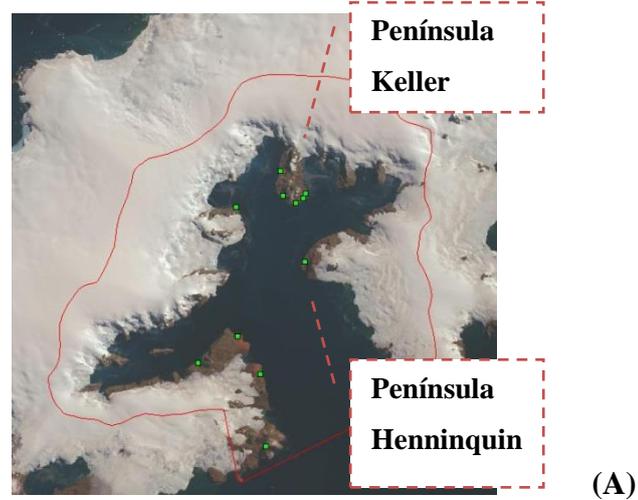


(C)

Legenda: (A) Tapete de musgo *Sanionia uncinata* na Trilha da Baleia; (B) Coleta;
(D) *Sanionia uncinata*.

Fonte: A autora, 2015.

Figura 8 – Locais de coleta do musgo *Sanionia uncinata*.



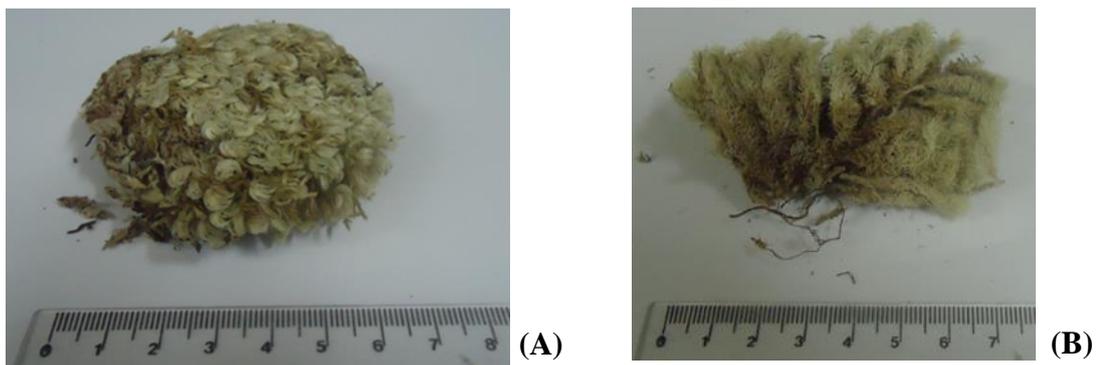
Legenda: (A) - Península Henninguin e Península Keller. A linha vermelha tracejada representa área da Antártica Especialmente Gerenciada da Baía do Almirantado. Círculos verdes representam pontos de ocupação; (B) - Pontos de coleta na Península Keller, exceto a Trilha Pico Norte.

Fonte: Souza, 2008.

9.1.2 Holomitriopsis laevifolia e Leucobryum laevifolium

As coletas das espécies *H. laevifolia* e *L. laevifolium* (Figura 9) foram realizadas no Morro dos Seis Lagos, localizado no Parque Nacional do Pico da Neblina no Amazonas (0°9'56''N; 66°24'45,4''W) (Figura 10), em Junho de 2011, pelo prof. Dr. Heitor Evangelista da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A identificação de *H. laevifolia* foi realizada pelo mestre Botânico Caio Amitrano de Alencar Imbassahy, pesquisador da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e foi depositada no H-RJ sob o número H-RJ 11.812. A espécie *L. laevifolium* foi identificada pela mestre Botânica Maria Sulamita Dias, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e está depositada no H-RJ sob o número H-RJ 12.287.

Figura 9 - Musgos coletados no Morro Seis Lagos (Amazonas).



Legenda: (A) - *Holomitriopsis laevifolia*; (B) - *Leucobryum laevifolium*.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 10 - Mapa do local de coleta dos musgos *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium*.



Legenda: ponto A em vermelho.

Fonte: Google, 2013.

9.2 Preparo dos extratos

Após a coleta da espécie *S. uncinata*, os materiais vegetais foram secos em liofilizador na estação Antártica Comandante Ferraz, acondicionadas em sacos plásticos, vedados e devidamente identificados, para que pudessem ser transportados até o Brasil. Posteriormente foram mantidos em freezer até o momento da extração. Após a coleta, os materiais vegetais das espécies *H. laevifolia* e *L. laevifolium* também foram devidamente acondicionados em sacos plásticos, vedados, identificados e transportados congelados. Em seguida foram mantidos no freezer até o momento da extração.

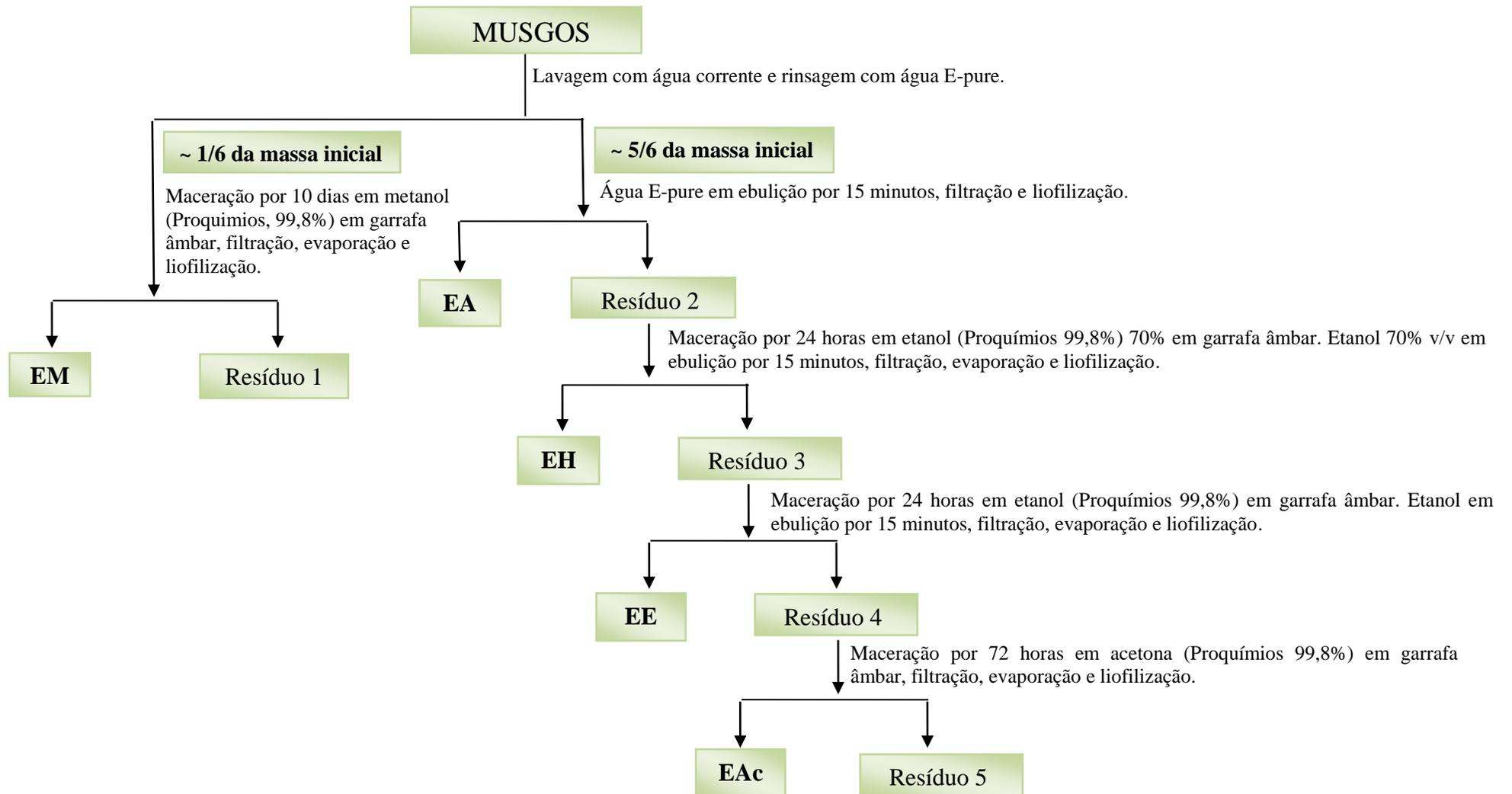
As amostras foram pesadas e lavadas sob água corrente visando remover as impurezas e sedimentos do material vegetal. Em seguida foram rinsadas com água ultrapura. O processo de extração seguiu o descrito no esquema da Figura 11. As massas (g) /volumes de solventes (L) utilizados foram os seguintes: Extrato metanólico (EM) de *S. uncinata* - 232g/3,0L; de *H. laevifolia* – 56 g/0,6 L; e de *L. laevifolium* - 8,19 g/0,22 L; Extrato aquoso (EA), extrato hidroalcoólico (EH) e extrato etanólico (EE) e acetônico (EAc) de *S. uncinata* – 300 g/3,0 L; de *H. laevifolia* – 123 g/2,0 L; e de *L. laevifolium* – 32,09 g/1,0 L. Os processos de ebulição

foram realizados em bécher de 1000 mL protegido com filme de PVC. Todos os extratos foram filtrados através de filtro de papel Whatman n°. 1, ultracentrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e, então, microfiltrados em membrana de nylon com 0,22 µm de tamanho de poro. Os solventes (etanol, acetona e metanol) foram removidos em evaporador rotatório, previamente à secagem dos extratos por liofilização. Os extratos isentos de solventes foram liofilizados em aparelho HETO Drywinner. Os extratos secos foram pesados, transferidos para microtubos, mantidos em frascos com sílica-gel e armazenados em freezer (-20°C) até o uso.

9.3 Espectros de absorção ao ultravioleta-visível

Os espectros de absorção ao UV e visível (220 a 800 nm) dos extratos de *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* foram obtidos em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico em aparelho Shimadzu UV-160. Os extratos secos foram adequadamente diluídos com água destilada para todos os extratos aquosos. Os demais extratos foram diluídos em acetonitrila (proquímios, 99,8%). As adequadas diluições com os respectivos solventes foram realizadas a fim de ajustar os espectros na faixa linear de resposta do equipamento, atingindo 30 µg/mL para EA de *H. laevifolia* e *L. laevifolium*, 20 µg/mL para EE de *H. laevifolia*, 25 µg/mL para EH de *L. laevifolium* e 50 µg/mL para as demais amostras testadas.

Figura 11. Fluxograma da obtenção dos extratos secos a partir dos musgos *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium*.



Legenda: extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH), etanólico (EE) e acetônico (EAc).

9.4 Quantificação dos polifenóis totais

O método atual mais utilizado para determinar o índice total dos compostos fenólicos em plantas é do *Folin Ciocalteu*. Neste método a mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico, em meio básico, se reduzem ao oxidar compostos fenólicos, originando óxidos azuis de wolfrâmio e molibdeno (Mezadri *et al.*, 2008). Neste estudo, o método foi escalonado para leituras em microplacas.

A determinação dos fenólicos totais seguiu o protocolo descrito por AINSWORTH & GILLESPIE (2007) e HERALD *et al.* (2012) com adaptações. Foi realizada uma homogeneização de 2 mg de cada amostra em 1 mL de água (no caso dos extratos aquosos) ou metanol/água (7:3) (demais extratos). A mistura reacional foi de 500 µL dos respectivos extratos ou a solução padrão com diferentes concentrações de catecol (2,2, 5,5, 11, 22 e 33 µg/mL) e 250 µL de solução de *Folin-Ciocalteu* (Merck). Decorridos 5 minutos de incubação adicionou-se 1250 µL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na₂CO₃, Vetec, 99,5%) a 75 g/L. Após o período de incubação de 2 horas a 30°C, 200 µL da mistura reacional foram transferidos para poços de microplacas (transparentes) de polipropileno e a absorvância medida em leitor de microplacas (µ-Quant, Bio-tek Instruments INC), a 760 nm. Leituras dos brancos (extratos e solventes – água ou metanol/água) também foram realizadas. A partir da equação da reta obtida na curva de calibração do catecol determinou-se a quantidade de fenólicos totais, expresso em mg de catecol/g de amostra.

9.5 Capacidade captadora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O método do radical DPPH é amplamente utilizado para analisar substâncias de interesse fitotecnológico, alimentar, farmacológico e toxicológico. É um radical estável muito utilizado para determinar a potência antioxidante de polifenóis (MAMBRO e FONSECA, 2005). Esse radical livre tem uma cor violeta característica com absorção a 517 nm. Após sua reação com o agente a cor violeta passa a ser amarela, diminuindo gradualmente a absorvidade a 517 nm proporcionalmente à concentração e à atividade da amostra (BONDET *et al.*, 1997).

A avaliação da atividade antioxidante dos diferentes extratos dos musgos foi determinada seguindo o protocolo descrito por KAEZER *et al.*, 2012, com adaptações HERALD *et al.* (2012). Adicionaram-se metanólica de DPPH (0,25 µM) (Sigma-Aldrich®) e 100 µL de soluções com diferentes concentrações dos extratos ou do padrão hidróxi-tolueno

butilado (BHT) (Proquímios). As concentrações utilizadas para o BHT e para os extratos foram 1, 10, 100, 500 e 1000 µg/mL. Para EA de *S. uncinata*, EH de *H. laevifolia* e EM de *L. laevifolium* também foram realizadas leituras nas concentrações de 4000 e 6000 µg/mL. O BHT foi diluído em etanol (proquímios, 99,8%), EA foram diluídos em água destilada e demais extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO, Proquímios, 99,8%). Determinou-se a absorvância em leitor de microplaca (µ-Quant, Bio-tek Instruments INC) a 517 nm após 40 min do início da reação a temperatura ambiente. Leituras do branco (solvente do controle + extratos) e do controle negativo (solvente do controle + DPPH) também foram realizadas. A capacidade percentual captadora do radical livre foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\text{Atividade captadora (\%)} = ((\text{Abs}_N - \text{Abs}_A) / (\text{Abs}_N - \text{Abs}_B)) \times 100\% \quad (1)$$

Na qual:

Abs_N: Absorvância do controle negativo

Abs_A: Absorvância da amostra com DPPH

Abs_B: Absorvância do branco

A partir dos dados, foram traçados os gráficos dos extratos e do padrão BHT, onde na abscissa encontra-se a concentração das amostras, em µg/mL e, na ordenada, o percentual de atividade por redução do radical DPPH. A correlação com a concentração foi calculada por regressão linear, obtendo-se o coeficiente de correlação (r) e a equação da reta ($y = ax + b$). O valor encontrado para a concentração efetiva 50 - CE50 - representa a concentração necessária para se obter 50% da capacidade máxima estimada (MENSOR *et al.*, 2001).

9.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE em análise de polifenóis é uma técnica bastante utilizada e eficiente na separação de substâncias, inclusive em misturas complexas (Shahidi and Nackzk, 2004; Hostettmann *et al.*, 2003). O equipamento consiste numa bomba de alta pressão, injetor, coluna, detector e um sistema de aquisição de dados. O detector UV-visível é o mais utilizado em CLAE para a análise em flavonóides, especialmente porque estes compostos apresentam, em geral, duas bandas de absorção bem características no UV, as bandas I (cinamoil) e II (benzoil). O detector por arranjo de diodos analisa em diferentes comprimentos de onda,

possibilitando a varredura na região UV-visível (Katz, 1994).

Foi utilizado um sistema de cromatografia a líquido Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity com 2 bombas binárias 1260 DAD, degaseificador, injetor automático, controlador e compartimento termostaticador para colunas e detector por arranjo de diodos. A aquisição de dados e o controle foram obtidos pelo software OpenLabCDS, ed. Chemstation. As condições cromatográficas atenderam SAKAKIBARA *et al.* (2003) com coluna cromatográfica de fase estacionária similar à aplicada pelos autores: LiChrospher RP-18e (250 mm x 4,0 mm x 5 µm) em Lichrocart e pré-coluna LiChrocart 4-4 (mm) LiChrospher RP18e 5 µm. Eluente fosfato de sódio 0,050 mol/L pH 3,3-metanol (9:1) (A) e metanol-água (7:3) (B) com a programação em gradiente com vazão de 1,0 mL/min: 15 min, 0-30% B; 30-35% B em 30 min; 35-40% B em 20 min; 40-50% B em 5 min; 50-100% B em 25 min; 100% B em 15 min; 100-0% B em 10 min, mantendo mais 10 minutos. Temperatura do forno em 35°C e o volume de injeção de 10 µL. As eluições foram monitoradas em 250, 280 e 320 nm. Uma mistura de polifenóis em metanol (Tabela 1) foi injetada nas mesmas condições para a referência de tempo de retenção e de seletividade, confrontando com os dados da literatura original que apresenta dados (t_R e λ_{max}) de 100 substâncias. Os polifenóis nas amostras (50 mg) foram extraídos com 3×2000 µL de 90% de metanol contendo 0,5% de ácido acético, sob agitação em vórtex, sonicação por 1 minuto e centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes reunidos foram submetidos à secagem sob pressão de 300 mTorr em Speedvac SC-110 (Savants Instruments, Holbrooks, USA) e armazenados em freezer até o uso. Previamente à análise, o resíduo foi ressuspensão em dimetilsulfóxido (DMSO) e filtrado em membrana Durapore 0,22 µm. Os cromatogramas foram obtidos no Laboratório de Tecnologia Ambiental no Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em colaboração com a Professora Dr^a. Monica Regina da Costa Marques.

Tabela 1 – Mistura de polifenóis e suas características analíticas usada como padrão na cromatografia líquida de alta eficiência.

Substância	Fabricante®	Concentração µg/mL	Tempo de retenção (min) no método	
			Literatura original	Experimental
Ácido caféico	Sigma-Aldrich	45	18,4	14,5
Ácido ferúlico	Sigma-Aldrich	57	25,8	22,1
Orientina	PhytoLab	50	26,2	24,1
Homorientina	PhytoLab	20	27,5	26,0
Rutina	Sigma-Aldrich	56	40,6	39,8
Quercetina	Acros Organics	27	75,5	73,5

Fonte: SAKAKIBARA *et al.* (2003) e o autor, 2015.

9.7 Fator de proteção solar por método *in vitro*

Esse método tem como vantagem a segurança de não envolver voluntários humanos para a determinação do FPS. Assim, o FPS é a medida da capacidade de um filtro solar em proteger contra o eritema, formado principalmente pela exposição à radiação UVB. Portanto, é uma avaliação da medida de eficácia do filtro solar contra a radiação UVB (Savian *et al.*, 2010). De acordo com a legislação brasileira um produto adequado para utilização em cosméticos para bronzear ou fotoproteger, deve apresentar um FPS igual ou superior a 6 (Brasil, 2012). Os filtros sintéticos orgânicos comerciais aplicados neste estudo são utilizados mundialmente e abrangem ampla faixa dos espectros UVA e UVB, além da comprovada segurança recomendada pelo FDA e pela legislação brasileira (Rangel e Corrêa, 2002; Edlich *et al.*, 2004; Brasil, 2006). Na avaliação do efeito sinérgico o filtro solar BZE foi selecionado por absorver a radiação nas faixas UVA e UVB, sendo um composto importante na fotoquímica e na cosmetologia (Ribeiro, 2004).

Pesou-se 2 mg de cada extrato e diluiu-se em isopropanol (Proquímios, 99,8%) até 2 mg/mL. Como controles positivos foram utilizadas substâncias aplicadas em filtros solares comerciais diluídos em isopropanol: 0,2 µL/mL para 3-(4'-metil-benzilideno) cânfora (BZC) (Merck, lote 105851000), 3,1 µL/mL para *p*-metoxicinamato de octila (MCO) (Viafarma, lote 107/2690/099), 0,1 µL/mL para benzofenona-3 (BZE) (Pharma Nostra Comercial, lote 33706014) e 25 µL/mL para Octocrileno (OCT) (Galena – Química e Farmacêutica Ltda, lote 32). Uma alíquota (200 µL) dos respectivos extratos das três espécies de musgo, além dos controles positivos, foi adicionada a poços de microplacas de 96 poços.

Em outro ensaio uma alíquota (100 µL) dos respectivos extratos das três espécies de musgos adicionadas de mesma alíquota do BZE a 0,05 µg/mL foram aplicadas aos poços de microplacas de polipropileno de 96 poços.

As absorvâncias das soluções, entre 290 e 320 nm a intervalos de 5 nm, foram medidas no leitor de microplacas (µ-Quant, Bio-tek Instruments INC). O Fator de proteção solar (FPS) médio foi calculado pela fórmula abaixo segundo Mansur *et al.* (1986), aplicando a ponderação da Tabela 2. O controle negativo foi o isopropanol.

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC \cdot \sum_{290}^{320} [EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)] \quad (2)$$

Onde, FC = fator de correção (igual a 10); EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ ; Abs (λ) = leitura espectrofotométrica de absorvância da solução da preparação no comprimento de onda λ .

Tabela 2. Ponderação empregada no cálculo do Fator de proteção solar por espectrofotometria.

λ (nm)	EE (λ) \times I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Soma	1,0000

Legenda: EE (λ) - efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ ; I (λ) - intensidade da luz solar no comprimento de onda λ .

Fonte: SAYRE *et al.* (1979).

Assim multiplica-se os valores de absorvância pelos respectivos valores ponderais (Tabela 2) e multiplica-se o somatório final por 10.

9.8 Teste de *Salmonella*/microsoma

Os genótipos das linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium derivadas da parental LT2 foram confirmados antes dos ensaios através dos testes de auxotrofia para histidina (*his*), mutação *rfa*, mutação *uvrB*, presença do plasmídeo pKM101, e de presença do plasmídeo pAQ1 (MARON E AMES, 1983; *Organisation for Economic Co-Operation and*

Development - OECD, 1997). Todas as cepas bacterianas usadas neste trabalho são provenientes do estoque do nosso laboratório.

O ensaio de *Salmonella*/microsossoma seguiu o protocolo de Pré-incubação (MARON E AMES, 1983). As cepas *Salmonella entérica sorovar* Typhimurium (TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104) cresceram por cerca de 16 h em meio lisogênico (meio LB) (10 g/L triptona; 5,0 g/L extrato de levedura; 10 g/L NaCl), contendo 8 µg/mL de ampicilina e 2 µg/mL de tetraciclina (apenas TA102), à 37°C à 150 rpm, até as culturas alcançarem a fase estacionária de crescimento ($1-2 \times 10^9$ células/mL). Em tubos de ensaios foram adicionados 100 µL dos extratos diluídos em diferentes doses ou controles positivos ou negativo, 500 µL de solução tampão fosfato de sódio (27,6 g/L NaH₂PO₄.H₂O e 28,4 g/L Na₂HPO₄.H₂O; 0,2 mol/L, pH 7,4; para o ensaio sem metabolização exógena) ou de S9 mix (para o ensaio com metabolização exógena; descrição de preparo abaixo) e 100 µL da suspensão bacteriana. Os tubos foram incubados por 20 minutos a 150 rpm a 37°C. Após a incubação, uma alíquota de 10 µL dessa mistura foi retirada para o ensaio de sobrevivência realizado em paralelo. Em seguida, 2 mL de ágar de superfície contendo solução de histidina e biotina (7 g/L ágar; 5 g/L NaCl; 0,0105 g/L L-histidina; 0,0122 g/L D-biotina, pH 7,4) à 45°C foram adicionados aos tubos de ensaio e a mistura final foi vertida sobre uma placa de Petri contendo meio mínimo (15 g/L ágar, meio Vogel-Bonner 10X [10 g/L MgSO₄.H₂O; 100 g/L C₆H₈O₇.H₂O; 500 g/L K₂HPO₄; 175 g/L Na₂NH₂PO₄.4H₂O, contendo 40 g/L glicose). Estas placas foram incubadas à 37°C por 72 h e as colônias revertentes His⁺ foram contadas.

A alíquota de 10 µL da mistura sem adição de ágar foi adicionada a um microtubos contendo solução de salina fisiológica (NaCl 9 g/L), completando-se o volume a 1 mL. Foram realizadas sucessivas diluições em solução de salina fisiológica e em seguida 100 µL da última diluição foram inoculadas em placa de Petri contendo meio LB gelosado (em ágar 15 g/L). A diluição total da alíquota foi de 10⁻⁷ vezes. A citotoxicidade foi considerada positiva quando a sobrevivência celular foi ≤ a 60%, comparado ao controle negativo (VARGAS *et al.*, 1993) ou quando ocorreram diferenças significativas entre as diluições dos extratos e o controle negativo. Todos os produtos químicos foram comprados da Sigma-Aldrich®.

As doses testadas dos extratos de *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* foram 1, 4, 10, 40, 100 e 400 µg/placa. Tais doses foram selecionadas a partir de uma relação dose-resposta em ensaios preliminares de *Salmonella*/microsossoma, seguindo procedimento spot-test (MORTELMANS E ZEIGER, 2000). As amostras foram diluídas em DMSO e esterilizadas em membrana Millipore 0,22 µM antes do teste. O controle negativo usado foi o DMSO. Os controles positivos por placa em ausência de metabolização exógena foram: 0,5 e 1 µg/placa

de 4-nitro-1-óxido-quinolina (4NQO) para TA98 e TA97, respectivamente, 0,5 µg/placa de azida sódica (AS) para TA100 e 0,5 e 250 µg/placa de mitomicina C (MMC) para TA102 e TA104, respectivamente. Os controles positivos por placa em presença de S9 foram: 0,5 µg/placa de 2-Aminoantraceno (2-AA) e 5 µg de benzo(α)pireno (BaP, apenas TA102). Apenas AS foi diluída em água destilada, demais controles positivos e extratos foram diluídos em DMSO. A mutagenicidade foi considerada positiva quando número de *His*⁺ foi significativa em relação ao controle negativo ($P \leq 0,05$) e o índice de mutagenicidade (razão do número de revertentes da amostra pelo número de revertentes do controle negativo) foi igual ou superior a dois (I.M. ≥ 2) e pôde-se se observar uma relação dose-resposta (MORTELMANS E ZEIGER, 2000).

9.8.1 Preparo de metabolização exógena

A fração microsomal S9 foi adquirida do laboratório Molecular Toxicology Inc. (MoltoxTM, USA). A preparação do S9 mix (4%) foi realizada de acordo com MORTELMANS E ZEIGER (2000) em condições de esterilidade total e em banho de gelo. Para 50 mL de S9 mix utilizou-se 5,0 mL de S9 reconstituído com 2,1 mL de água estéril (40 mg/mL de proteínas totais); 1,0 mL de MgCl₂-KCl 0,15 mol/L, 0,25 mL de glicose-6-fosfato 1 mol/L, 2,0 mL de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) 0,1 mol/L, 25 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L, pH 7,4 e 19,75 mL de água destilada estéril.

9.9 **Fotomutagenicidade**

O ensaio de fotomutagenicidade foi realizado de acordo com os protocolos descritos na literatura (UTESCH E SPLITTGERBER, 1996; WANG *et al.*, 2003; GOCKE *et al.*, 2003; WATANABLE-AKANUMA *et al.*, 2007 com adaptações).

Foi realizado com os extratos selecionados de *S. uncinata* (EH, EM, e EE), *H. laevifolia* (EA, EH e EE) e *L. laevifolium* (EM, EA, EH). As concentrações testadas foram 1, 4, 10, 40, 100 e 400 µg/placa. O controle positivo utilizado foi 8-metoxipsoraleno (8-MOP) na concentração de 10 ng/poço. As condições de manutenção, crescimento e tratamento das células bacterianas seguiram-se conforme item 9.8. Entretanto, quatro pontos devem ser considerados:

(i) não foi utilizado um sistema de metabolização exógena, como o S9 mix, pois este influenciaria na absorção do UV (Gocke *et al.*, 2000);

(ii) foram usadas as cepas TA102 e TA104. Tais cepas foram selecionadas, pois elas são geneticamente semelhantes (discussão sobre o genótipo das cepas é encontrada no final da introdução diferindo apenas no sistema de REN. A cepa TA102 é proficiente neste sistema e a TA104 é deficiente, ou seja, possui deleção do gene *uvrB* (MORTELMANS E ZEIGER, 2000). Assim, estas cepas representam dois modelos de interesse para o estudo de fotomutagenicidade;

(iii) em relação ao tratamento, após a mistura ser vertida em placa de meio mínimo, placas foram mantidas no escuro numa superfície nivelada para permitir o endurecimento do agar. Em seguida, as placas, sem as tampas, foram irradiadas usando aparelho UV Crosslinker, marca Ultra-violet Products Ltd, Upland, CA, modelo CL-1000L (365 nm, UVA) a taxa de dose de 6,5 J/cm² para TA102 e 0,24 J/cm² para TA104. Após a irradiação, as placas foram incubadas a 37°C por 72 h e *His*⁺ foram contadas por placa. O controle positivo foi 8-metoxipsoraleno (TA102) a concentração de 10 µg/placa. É considerado aceitável para o ensaio de fotomutagenicidade, utilizar somente uma cepa com controle positivo para mostrar uma resposta fotomutagenica (GOCKE *et al.*, 2000). Além disso, os ensaios para as duas cepas foram feitos concomitantemente;

(iv) outro ensaio de fotomutagenicidade foi realizado, seguindo o mesmo protocolo descrito acima, porém utilizando taxa de doses menores de radiação UVA: 1,3 J/cm² para TA102 e 0,04 J/cm² para TA104. Em doses menores de radiação o efeito mutagênico em células bacterianas deficientes em REN é mais intenso. Além disso, para a cepa TA104 este ensaio foi realizado também na presença de BZE na concentração de 400 µg/placa para avaliar efeitos protetores.

9. 10 Ensaio de Micronúcleo

O ensaio de micronúcleo também é um método recomendado pela OECD (2010). O micronúcleo (MN) é uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os micronúcleos são formados durante o processo de divisão celular e são constituídos por fragmentos cromossômicos no interior do núcleo das células-filhas (efeito clastogênico) ou por cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico) e, por isso, foram excluídos do núcleo principal nas células-filhas (FENECH, 2000).

Para avaliar os efeitos clastogênico, aneugênico e citotóxico dos diferentes extratos dos musgos *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* seguiu-se o protocolo descrito por

HORI *et al.* (2006) com modificações. Em paralelo também foi realizada a checagem da viabilidade celular seguindo a metodologia descrita por MENCALHA *et al.* (2010).

As linhas celulares de macrófago (RAW 264.7) e de hepatoma (HepG2) foram gentilmente cedidas, respectivamente, pelas Prof^{as}. Marcia Paes Leme, do Departamento de Bioquímica da UERJ e Danielle Palma de Oliveira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. A linhagem de queratinócito, HaCat, foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, número do catálogo 0341, lote 001075). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) HIGH GLUCOSE suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos (penicilina e estreptomicina a 1%) e bicarbonato de sódio 3,7 g/L, mantendo à 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂. Repiques celulares foram feitos a cada dois ou três dias de cultura.

Antes de iniciar o Ensaio de Micronúcleo, a concentração das células na cultura foi determinada em uma câmara de Neubauer na presença do corante de exclusão azul de tripan (Trypan Blue, Sigma® T-6146). A concentração da suspensão celular foi ajustada para aplicar 1-2 x 10⁵ células em cada poço de microplacas (placas de poliestireno) de 24 poços contendo lamínulas de vidro circulares de 13mm, previamente tratadas com ácido nítrico 1 N.

O ensaio foi realizado com EM, EA e EH de *S. uncinata*, EA, EH e EE de *H. laevifolia* e EM, EA e EH de *L. laevifolium*. As concentrações testadas foram 400, 1000 e 4000 µg/placa. Tais concentrações foram selecionadas a partir dos resultados positivos para resposta citotóxica no teste de *Salmonella*/microsoma na ausência de metabolização exógena. As células foram incubadas com 100 µL das diluições das amostras em DMSO por 3 h (tratamento agudo) a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período o meio de cultivo foi desprezado e adicionado 1 mL de meio nutriente para lavar as células. Em seguida, este meio foi descartado e, então foi adicionado 1 mL de meio de cultivo contendo 10% de soro fetal bovino em cada poço. As células foram mantidas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por mais 24 horas. O controle negativo usado foi DMSO a 5% e 1% (apenas HaCat). Também foi utilizado em controle do ensaio (sem DMSO, com água). O controle positivo utilizado foi 1-metil-2-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG) na concentração de 0,5 µM.

Após as 24 horas, o meio nutriente foi descartado e adicionados a cada poço 1 mL de Fixador de Carnoy (3 partes de álcool metílico para 1 parte de ácido acético) gelado e mantendo por 15 minutos. O fixador foi retirado e acrescentou-se a cada poço 1 mL de tampão McIlvaine pH 7,5 (21 g/L de ácido cítrico; 35,6 g/L de Na₂HPO₄) para lavar as células. O tampão foi retirado e as placas foram secas no fluxo laminar por aproximadamente 40 minutos. As lamínulas foram coradas com 300 nmol/L de 4'-6-diamidino-2-fenilindol

(DAPI) por 40 minutos. Após a coloração as lamínulas foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão McIlvaine. As placas lavadas foram secas no fluxo laminar. Após secagem, as lamínulas foram colocadas em lâminas para análise no microscópio de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 350 nm (Olympus BX51, 60X). Foram determinados o índice mitótico e o número de células micronucleadas. Nesse ensaio também é possível analisar outros marcadores de danos citogenéticos como a formação de células apoptóticas e necróticas. Assim, como indicativos de tais eventos as frequências de células em apoptose e necrose foram determinadas. Foram analisadas 2000 células por poço (6000 células por concentração) (OECD, 2010).

9.10.1 Viabilidade celular por WST-1

O ensaio com WST-1 (*Water Soluble Tetrazolium*, Roche®) foi utilizado para avaliar a viabilidade celular das células de macrófagos frente aos diferentes extratos de *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* utilizados no Ensaio de Micronúcleo.

Este teste se baseia na redução do íon (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno disulfonato) pela enzima desidrogenase nas mitocôndrias das células metabolicamente ativas para gerar Formazan, o qual apresenta uma coloração amarelo/laranja e pode ser analisado por espectrofotometria. Essa conversão ocorre somente nas células viáveis, sendo então possível determinar a proporção de células vivas após o tratamento.

Cada linhagem celular utilizada (RAW 264.7, HepG2 e HaCat) foram semeadas a densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços e colocadas em estufa a 37°C a 5% de CO₂. A concentração das células na cultura foi determinada em uma câmara de Neubauer na presença do corante de exclusão azul de tripan. No dia seguinte foram feitas as incubações adicionando uma alíquota de 10 µL das soluções dos extratos de interesse nas concentrações de 400, 1000 e 4000 µg/placa, em triplicata para cada amostra, por 37°C em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Ao final da incubação foram adicionados 10 µL de solução de WST-1 para cada poço e as células permaneceram no escuro a 37°C por 3 h. A quantificação das variações colorimétricas foi realizada leitor de microplaca (µ-Quant, Bio-tek Instruments INC) utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm com a referência de 630 nm. Como padronização dos brancos de reações foram utilizados 100 µL do meio de cultivo sem células e 10 µL do reagente WST-1 (Branco 1) e 100 µL do meio de cultivo sem células na presença dos extratos e 10 µL do reagente WST-1 (Branco 2). A porcentagem das células viáveis, após os períodos de tratamentos, foi determinada pela razão da absorvância

obtida das culturas tratadas em relação às não tratadas. O controle negativo usado foi DMSO a 5% e 1% (apenas HaCat) e o controle positivo utilizado foi o Triton X-100 a 10%.

Os resultados foram expressos em percentual de redução do WST-1 pelas células, que foi calculada a partir das absorvâncias tendo, como parâmetro o controle negativo para o qual se atribuiu 100% de redução de WST-1 (MENCALHA *et al.*, 2010).

9.11 Ensaio de Fotomicronúcleo

A avaliação dos efeitos fotoclastogênico, fotoaneugênico e fotocitotóxico seguiu protocolos descritos na literatura (GUÉRARD *et al.*, 2012; HORINOUCI e ARIMOTO-KOBAYASHIB, 2011 e CALÒ E MARABNI, 2014, com modificações). Em paralelo foi realizada a checagem da viabilidade celular por exclusão de azul de tripan (YANG *et al.*, 2014). O Ensaio de Fotomicronúcleo foi realizado utilizando queratinócitos, da linhagem celular HaCat.

As condições de manutenções e crescimento da célula seguiram-se conforme item 9.10. O ensaio foi realizado com EH, EM, e EE de *S. uncinata*, EA, EH e EE de *H. laevifolia* e EM, EA, EH de *L. laevifolium*. A concentração da suspensão celular foi ajustada para aplicar 1×10^5 células em cada poço de microplacas (placas de poliestireno) de 6 poços. Antes da irradiação, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS - *phosphate buffered saline* - 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH_2PO_4 , 8,0 g de NaCl, 1,15 g de Na_2HPO_4 em água destilada q.s.p. 1000 mL,) e foram recobertas por uma fina camada de PBS (1,5 mL). As células foram pré-tratadas com 100 μL das diluições das amostras diluídas em DMSO a 1% e incubadas por 1 h mantidos a 37°C sob atmosfera com 5% de CO_2 . As doses testadas foram 1, 10, 40, 400, 1000 e 4000 $\mu\text{g}/\text{placa}$. Tais doses foram selecionadas a partir dos resultados positivos para resposta citotóxica no teste de fotomutagenicidade. Após esse período, as células foram irradiadas usando aparelho UV Crosslinker, a taxa de dose de 8 J/cm^2 para UVA, modelo CL-1000L (365 nm), e 0,008 J/cm^2 para UVB, modelo CL-1000M (302 nm). Após a irradiação, as células foram mantidas no escuro a 37°C com 5% de CO_2 por 10 minutos. Após esse período, PBS foi removido e, então, adicionado DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 h, o meio foi retirado, lavado com PBS (2 mL) e então as células foram tripsinizadas (com 2mL de tripsina em solução EDTA, Sigma-Aldrich®), inativadas com mesmo volume de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 1 mL de meio de cultura. Uma porção da

suspensão celular (50 µL) de cada concentração foi separada para análise de viabilidade celular por exclusão de azul de tripan (ver item 9.11.1). As células remanescentes foram adicionadas em poços de microplacas (placas de poliestireno) de 24 poços contendo lamínulas de vidro circulares de 13 mm, previamente tratadas com ácido nítrico 1 mol/L. As condições de fixação, coloração e análise seguiram-se conforme descrito no item 9.10. O controle negativo usado foi o DMSO a 1%. O controle positivo utilizado foi 8-MOP na concentração de 1 ng/poço. Também foi utilizado em controle do ensaio (sem DMSO, com água).

9.11.1 Viabilidade celular de HaCat pelo método de exclusão por azul de tripan

Uma diluição 1:1 foi feita com a suspensão celular do protocolo de Fotomicronúcleo e uma solução aquosa a 0,25% do corante azul de tripan. Após homogeneização uma alíquota de 10 µL foi analisada em um hemacitômetro (câmara de Neubauer) utilizando-se um microscópio óptico binocular a fim de avaliar as células viáveis e não viáveis. O percentual de células viáveis foi determinado.

9.12 **Análises estatísticas**

Os resultados de cada ensaio foram estatisticamente avaliados usando-se análise de variância (ANOVA) a fim de determinar diferenças significativas entre as diluições dos extratos e o controle negativo. Quando ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) a análise de Tukey's HSD foi aplicada, utilizando-se o GraphPad Prism Software, Versão 5.0, GraphPad, San Diego, CA). Também foram aplicados os testes Exato de Fischer e *t-student* (Ensaio de Fator de Proteção Solar). Cada experimento foi realizado com triplicatas e repetido duas vezes. Os resultados representativos foram expressos como a média \pm desvio padrão.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Rendimentos dos extratos

Os dados dos rendimentos dos extratos secos estão representados nas Tabela 3. As extrações com acetona apresentaram rendimentos muito baixos, e isto impossibilitou a realização dos ensaios com estes extratos. As espécies *S. uncinata* e *H. laevifolia* apresentaram maior rendimento com os solventes utilizados (metanol, água, etanol a 70% e etanol), quando comparados com *L. laevifolium*.

Tabela 3. Rendimentos (% g/g) da extração dos musgos aplicados neste estudo.

Extratos	<i>Sanionia uncinata</i>	<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	<i>Leucobryum laevifolium</i>
EM	2,13	0,49	0,816
EA	6,06	1,04	0,445
EH	4,07	1,11	0,468
EE	2,65	1,09	0,158
EAc	0,15	0,03	0,04

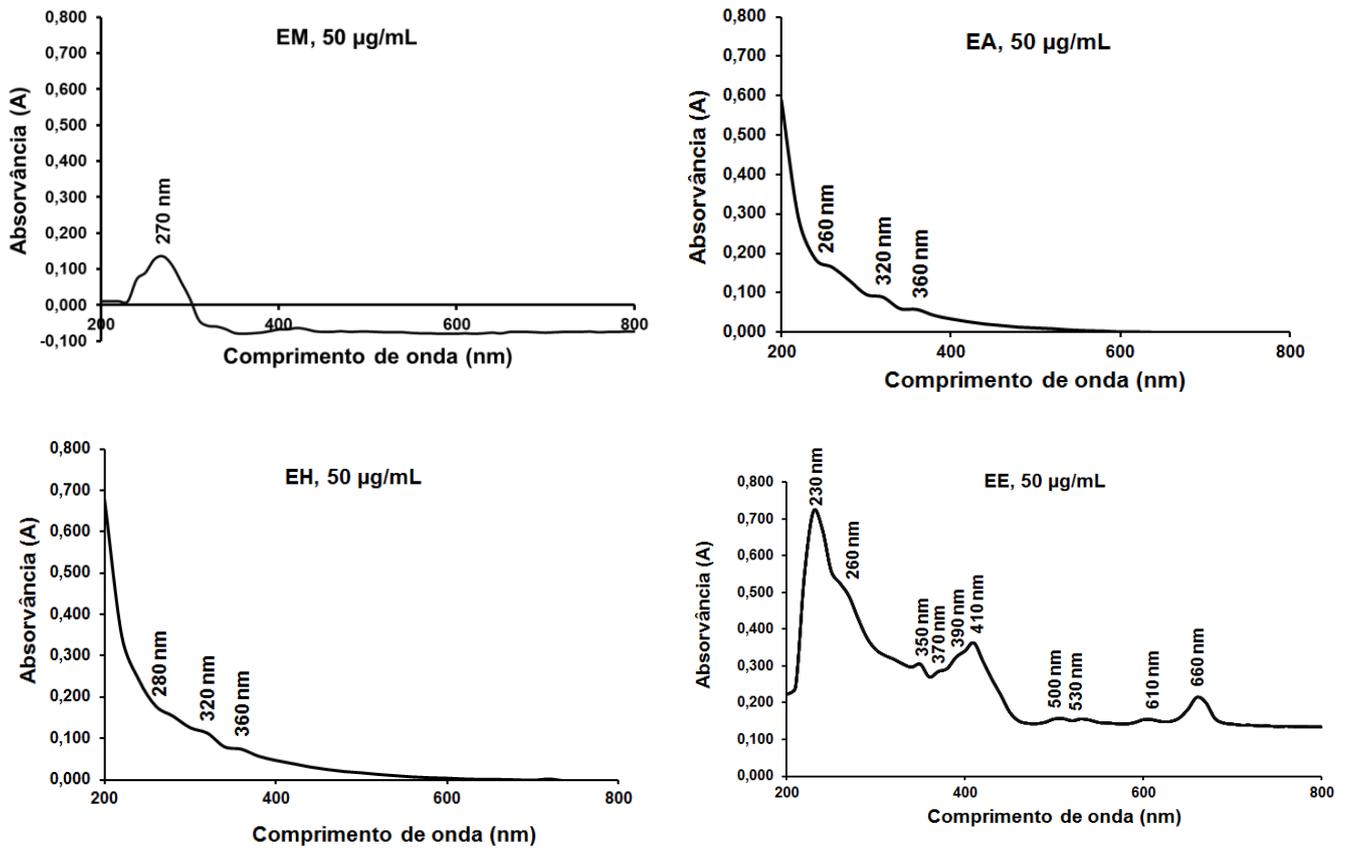
Legenda: Extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH), etanólico (EE) e acetônico (EAc).

Apesar da diferença de polaridade entre os solventes utilizados, em geral eles possuem caráter polar. SIMÕES *et al.* (2004) apontam os componentes ativos que podem ser extraídos com os solventes mais polares utilizados em processos extrativos e utilizados neste trabalho. De acordo com os autores a água extrai heterosídeos mais polares, como poliglicosídeos, flavanodióis, catequinas e os glicosídeos. O metanol e o etanol extraem, preferencialmente agliconas poliidroxiladas, flavonas, flavonóis mais polares, auronas e chalconas. Apesar do metanol extrair, preferencialmente, componentes de mesmas classes que o etanol, há relatos de uma faixa maior de componentes, podendo ser aplicados como primeiro solvente de extração (CHECHINEL FILHO e YUNES, 1997).

10.2 Espectros de ultravioleta-visível

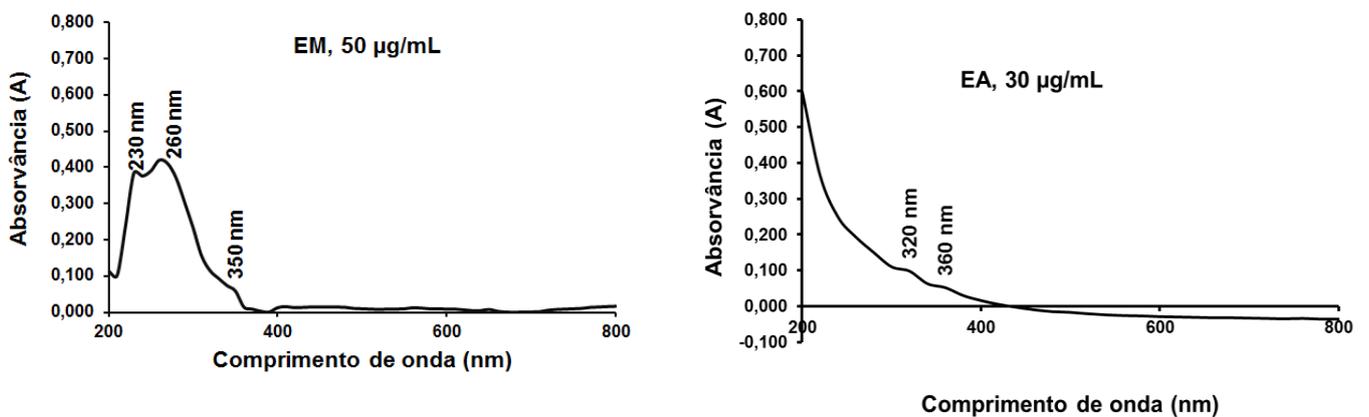
Os espectros de UV-visível estão apresentados nos gráficos 2, 3 e 4 dos extratos de *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium*, respectivamente.

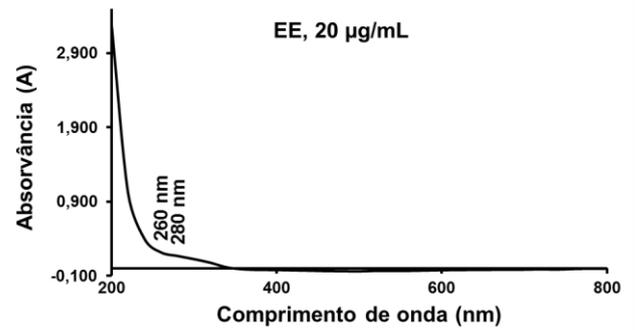
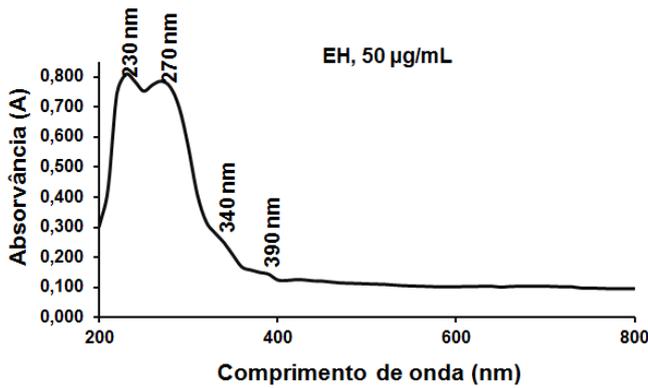
Gráfico 2 - Espectros de absorção na região do UV e do visível dos extratos do musgo *Sanionia uncinata*.



Legenda: Extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE).

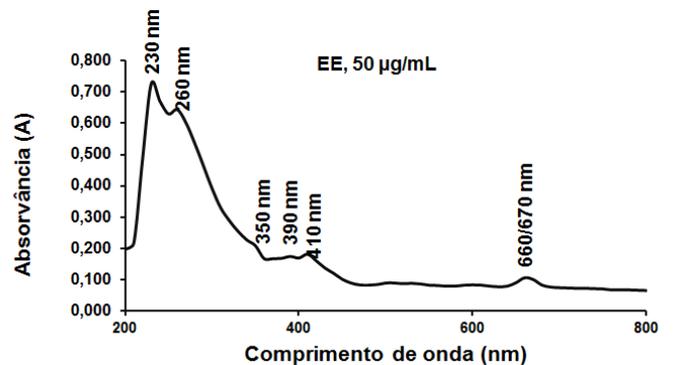
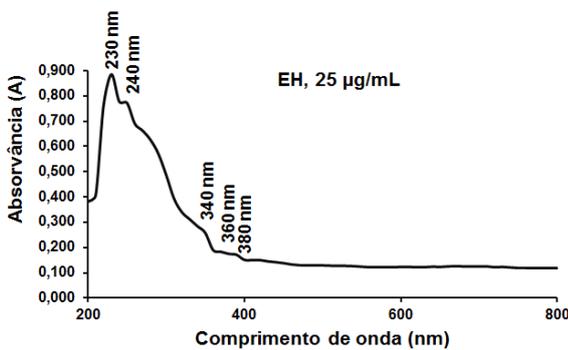
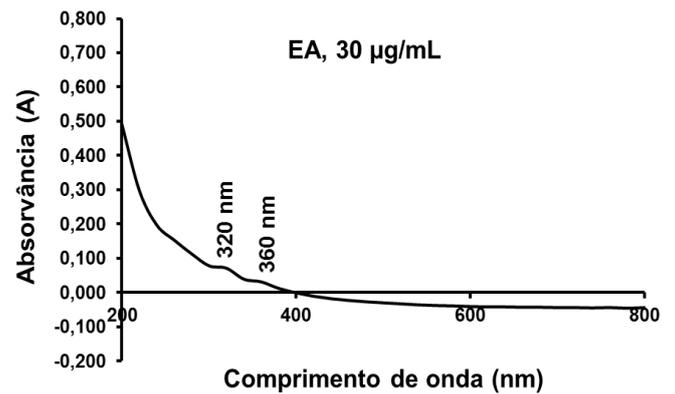
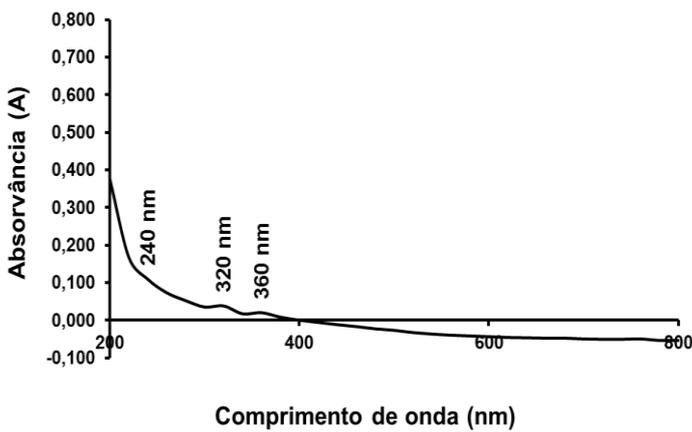
Gráfico 3 - Espectros de absorção na região do UV e do visível dos extratos do musgo *Holomitriopsis laevifolia*.





Legenda: Extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH), etanólico (EE)

Gráfico 4 - Espectros de absorção na região do UV e do visível dos extratos musgo *Leucobryum laevifolium*.



Legenda: Extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE).

Em função dos solventes utilizados na extração foram observadas variações no perfil de varredura, bem como na intensidade das absorções o que indica a seletividade dos componentes extraídos, entre os diferentes extratos e entre as três espécies de musgos analisados para o mesmo solvente.

Os solventes menos polares, como etanol, extraíram componentes em *S. uncinata* e *L. laevifolium* (Gráficos 2 e 4) que absorvem na faixa do espectro do visível (400 – 800 nm). Interessantemente, a clorofila apresenta máximos de absorção em 420, 490 e 660 nm (TAIZ e ZEIGER, 2004). Os máximos também são característicos de corantes e pigmentos contendo ligações insaturadas conjugadas, como os carotenóides, que têm bandas de absorção na região entre 400 a 500 nm (YOUNG e LOWE, 2001). O sinal de absorção em 500 nm do extrato etanólico de *S. uncinata* (Gráfico 2) está próximo do máximo de absorção do β -caroteno (497 nm) e licopeno (505 nm).

Além disso, observa-se também que todos os solventes utilizados extraíram, das três espécies de musgos, compostos que absorvem faixa do UV (gráficos 2 e 4). É possível notar também que os extratos das três espécies apresentaram absorção máxima dentro da faixa de absorção dos principais flavonóides (Gráfico 1). Uma discussão sobre compostos fenólicos é encontrada no item 10.5.

10.3 Quantificação de polifenóis totais

Utilizou-se como padrão o catecol, nas concentrações de 2, 5, 11, 22 e 33 $\mu\text{g/mL}$ para construir uma curva de calibração (Gráfico 5), na qual verifica-se excelente repetibilidade (coeficiente de variação $< 0,01$) e linearidade ($r = 0,999$). A Tabela 4 apresenta os valores de fenólicos totais expressos em mg equivalente de catecol/g de extrato.

Gráfico 5 - Curva de calibração do catecol.

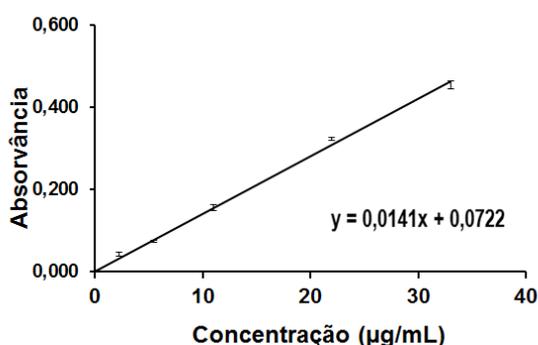


Tabela 4. Teores de polifenóis totais (expressos em mg equivalente de catecol)/g de extratos dos musgos *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium*.

Extratos	<i>S. uncinata</i>	<i>H. laevifolia</i>	<i>L. laevifolium</i>
EM	3,86 ± 0,01	2,48 ± 0,01	7,68 ± 0,01
EA	0,76 ± 0,00	6,01 ± 0,00	7,75 ± 0,00
EH	2,88 ± 0,01	5,09 ± 0,01	0,52 ± 0,01
EE	3,94 ± 0,01	1,04 ± 0,01	0,28 ± 0,01

Legenda: extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE). Entre todas as espécies os teores diferem com $P < 0,01$ (ANOVA e Tukey).

A tabela 4 indica que os extratos que apresentaram os maiores valores de polifenóis totais foram EM, EH e EE para *S. uncinata*; EM, EA e EH para *H. laevifolia* e EM e EA para *L. laevifolium*. Demais extratos apresentaram teores próximos ou abaixo de 1 mg/g de catecol. Estes dados são indicativos dos menores teores de ácidos fenólicos e/ou polifenóis glicosilados (hidrossolúveis) em *S. uncinata*. *L. laevifolium* parece ter predominantemente estes componentes, enquanto que *H. laevifolia* apresenta maior distribuição e variabilidade de componentes polifenólicos. Semelhantes resultados foram obtidos usando extratos aquoso e hidroalcoólico de *S. uncinata* na determinação de teor de polifenóis totais (FERNANDES *et al.*, 2011; FERNANDES, 2010).

10.4 Capacidade captadora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

Neste estudo, avaliou-se a capacidade dos diferentes extratos dos musgos em capturar os radicais DPPH em diferentes concentrações, de forma a obter uma curva linear entre a concentração do extrato e a sua capacidade. No gráfico 6 podem ser visualizados as curvas de atividade antioxidantes dos diferentes extratos dos musgos *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* avaliada em distintas concentrações. Os resultados também foram expressos em CE50 que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial do DPPH em 50 %.

No gráfico 6 percebe-se que cada extrato apresentou um comportamento distinto na faixa de concentração testada. A análise estatística dos resultados demonstrou que dois dos extratos, a 1 µg/mL, apresentaram significativos ($P < 0,01$) valores de captura de radicais DPPH superiores ao controle positivo utilizado, BHT a mesma concentração: EA das três espécies (Gráfico 6 A, B e C) e EM de *L. laevifolium* (Gráfico 6 C).

Observa-se também que, até a concentração de 1000 µg/mL todos os extratos de *S. uncinata*; EH de *H. laevifolia* e EM de *L. laevifolium* não alcançaram ou ficaram com valores muito próximo ao percentual de 50% de redução do radical DPPH, sendo necessário realizar novo ensaio com aumento da concentração para determinação do CE50.

A comparação estatística demonstra que para *S. uncinata* a 1, 10 e 100 µg/mL apenas os extratos EA e EE ($P < 0,01$) diferem dos demais. A partir da concentração de 500 µg/mL diferenças estatísticas ($P < 0,05$) podem ser observadas entre todos os extratos, exceto de EA para EH (1000 µg/mL) (Gráfico 6A).

A comparação estatística demonstra que para *H. laevifolia* a 1 µg/mL apenas EA ($P < 0,01$) difere dos demais. A partir da concentração de 10 µg/mL diferenças estatísticas ($P < 0,05$) podem ser observadas entre todos os extratos, exceto entre EH (10, 100 e 500 µg/mL), entre EA e EM (100 µg/mL) e entre EA e EE (1000 µg/mL) (Gráfico 6B).

Em *L. laevifolium* a partir da concentração de 1 µg/mL diferenças estatísticas ($P < 0,05$) podem ser observadas entre todos os extratos, exceto entre EH e EE (10 µg/mL) e entre EA e EM (100 µg/mL) (Gráfico 6C).

Os EM, EA e EE de *H. laevifolia* e os EA, EH e EE de *L. laevifolium*, até a concentração de 1000 µg/mL, apresentaram capacidade de induzir 50% de diminuição na concentração do radical DPPH. Entretanto, os EA de *H. laevifolia* e *L. laevifolium*, EE de *H. laevifolia* e EH de *L. laevifolium* apresentaram a maior capacidade captadora do radical DPPH. Não houve qualquer correlação entre CE50 para DPPH e o teor de polifenóis totais (r de Pearson = 0,0006, $P = 1,00$) indicando que a atividade deve ser correlacionada a outros fatores, como natureza química dos polifenóis ou outras classes de substâncias. Entretanto, vale ressaltar que, apesar de serem resultados pontuais, os EA de *H. laevifolia* e *L. laevifolium* apresentaram valores significativos de teores de polifenóis, comparado com o EA de *S. uncinata* (Tabela 4).

Maiores concentrações (de 1000 a 6000 µg/mL) foram testadas para os EA, EH e EE de *S. uncinata*, EH para *H. laevifolia* e EM para *L. laevifolium*, pois estes extratos não apresentaram 50% de diminuição do radical DPPH, até a concentração analisada (1000 µg/mL). O EM de *S. uncinata* não foi incluído, pois apresentou a capacidade em sequestrar o radical livre DPPH muito baixa. Em maiores concentrações a capacidade de induzir redução do radical DPPH foi observada nas três espécies. Os resultados de *S. uncinata* foram apresentados graficamente (Gráfico 6A). Os percentuais da capacidade sequestrante nas concentrações 4000 e 6000 µg/mL para o EH de *H. laevifolia* foram 76,87% e 86,42%, respectivamente, para o EM de *L. laevifolium* foram 89,23% e 97,35%, respectivamente. A

análise estatística demonstra que não há diferenças significativas entre EA e EH para *S. uncinata*, mas EE difere estatisticamente ($P < 0,01$) desses.

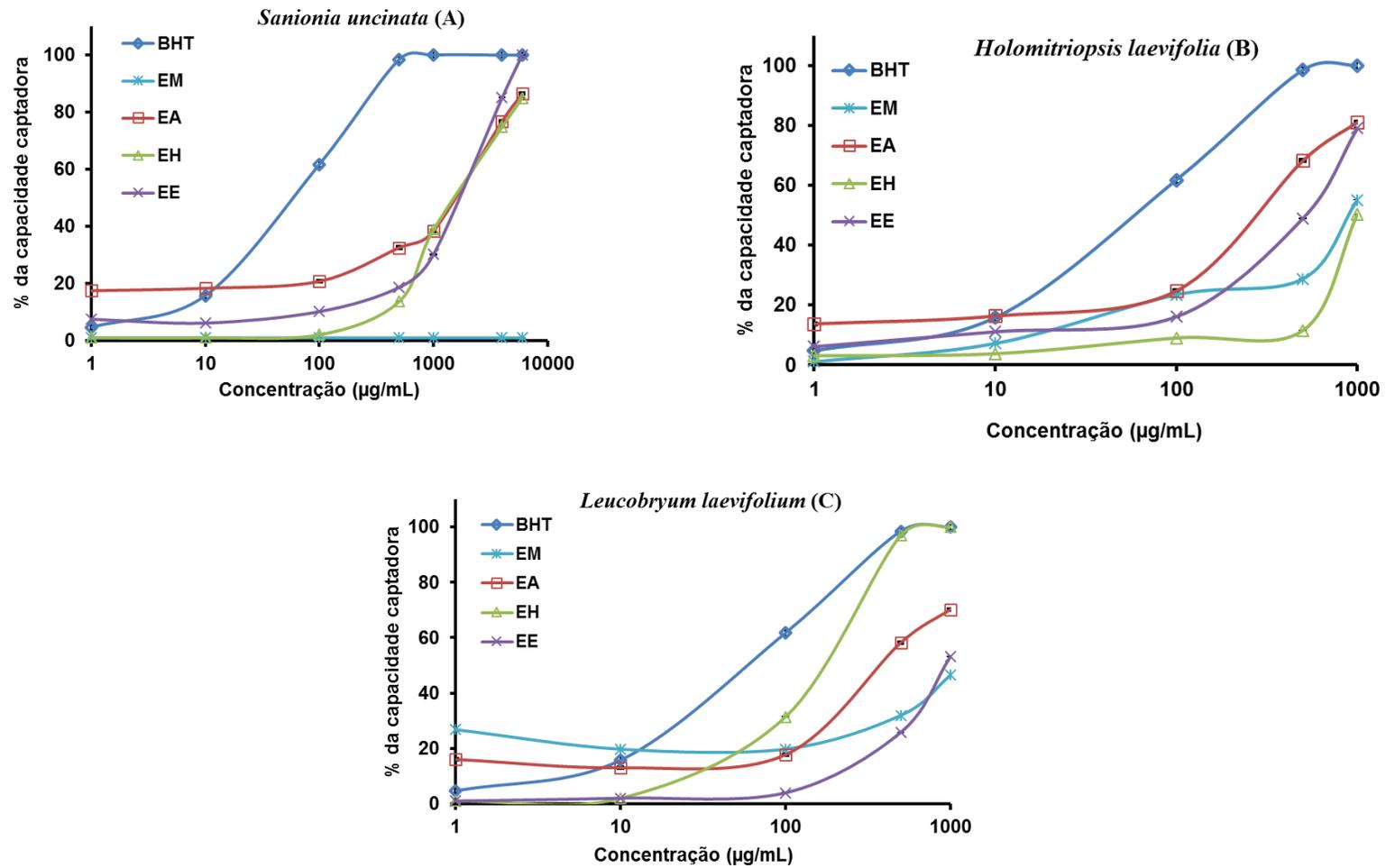
A tabela 5 apresenta os valores das concentrações dos extratos estimadas para a CE50. Observa-se que EH de *L. laevifolium* apresentou o menor valor de CE50, equivalente a cerca de três vezes comparados ao CE50 do BHT. Os EA de *H. laevifolia* e *L. laevifolium* apresentaram valores de CE50 equivalentes a cerca de 5 a 6 vezes respectivamente comparados ao CE50 do BHT. O EE de *H. laevifolia* apresentou valor de CE50 equivalente a 8 vezes comparados ao CE50 do BHT. O EM de *H. laevifolia* e o EE de *L. laevifolium* apresentaram CE50 equivalentes a cerca de 15 vezes para alcançar o equivalente de 50% de inibição do DPPH obtido pelo BHT. Considerando que os extratos investigados se compõem de misturas multicomponentes complexas, tais valores de CE50 indicam possibilidades de componentes terem atividades muito acentuadas. LOPEZ *et al.* (2007) também apontaram atividade antioxidante de extratos etanólicos de diversas espécies de musgos. Resultados semelhantes foram obtidos por BHATTARAI *et al.* (2008), em extrato hidroalcoólico do musgo *S. uncinata* pelo método do radical DPPH.

Tabela 5 - Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) obtidas pelos extratos para *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* para alcançar a concentração efetiva 50.

	<i>S. uncinata</i>	<i>H. laevifolia</i>	<i>L. laevifolium</i>
EM	-	905	1200
EA	1800	309	401
EH	1900	1100	195
EE	2040	510	928

Legenda: extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE). Concentração efetiva 50%: quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial do DPPH em 50%. Concentração do BHT para CE50: 60 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 6. Atividade dos extratos dos musgos *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* e do padrão quanto à captura de radicais livres, determinada pelo método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.



Legenda: metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH), etanólico (EE) e hidróxi-tolueno butilado (BHT). *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C).

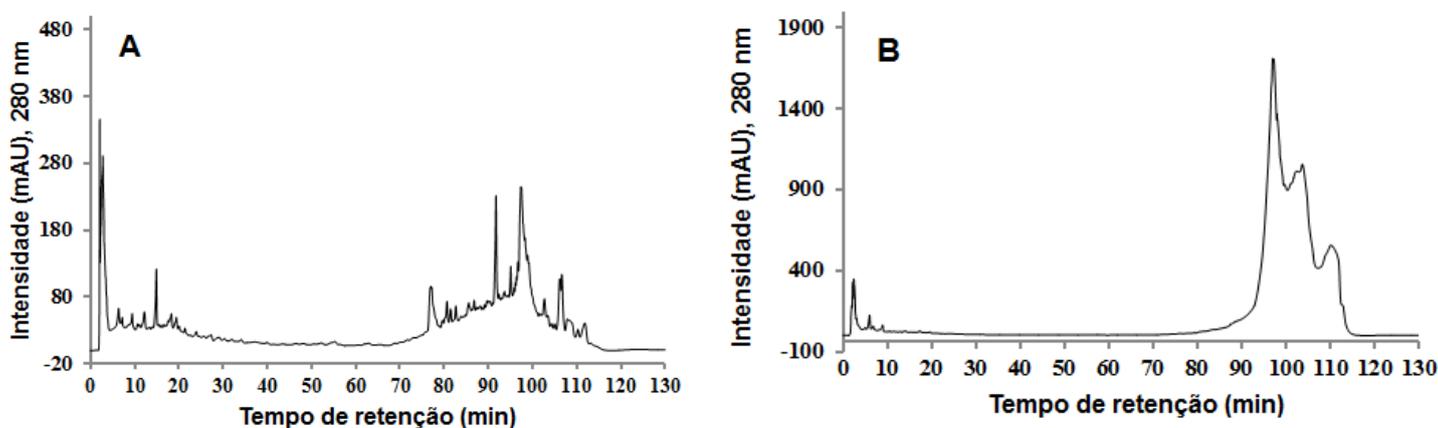
Baseado no mecanismo de ação extensivamente descrito na literatura sobre a captura do radical DPPH correlacionado com a presença de grupos hidroxilas em moléculas antioxidantes (BONDET *et al.*, 1997; FAUCONNEAU and WAFFO, 1997) pode-se, neste trabalho, inferir que a atividade dos extratos é provavelmente devido à presença de substâncias com um grupo hidroxila disponível (fenólico ou não). Esse requerimento estrutural pode estar relacionado com a presença de flavonóides (SIMÕES *et al.*, 2004). A complexidade da composição química dos extratos pode influenciar na capacidade que cada constituinte tem de acessar o centro radicalar o que justifica as diferentes concentrações utilizadas para cada extrato para induzir 50% de captação do radical. Existe também a hipótese de que a interação com a molécula de DPPH depende não somente da estrutura do antioxidante, mas também da cinética de reação dessas substâncias com o radical (MENSOR, 1999).

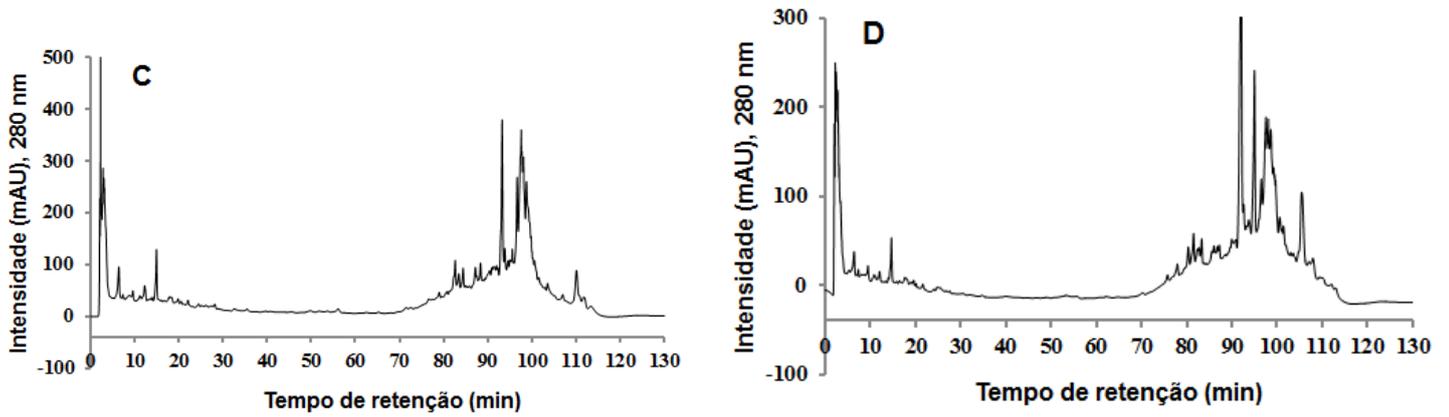
10.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

A partir dos cromatogramas e espectros de absorção resultantes foi possível caracterizar polifenóis possivelmente presentes nos extratos.

Os gráficos 7, 8 e 9 apresentam os cromatogramas de *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium*, respectivamente, obtidos dos extratos analisados, no comprimento de onda que represente todos os principais sinais encontrados.

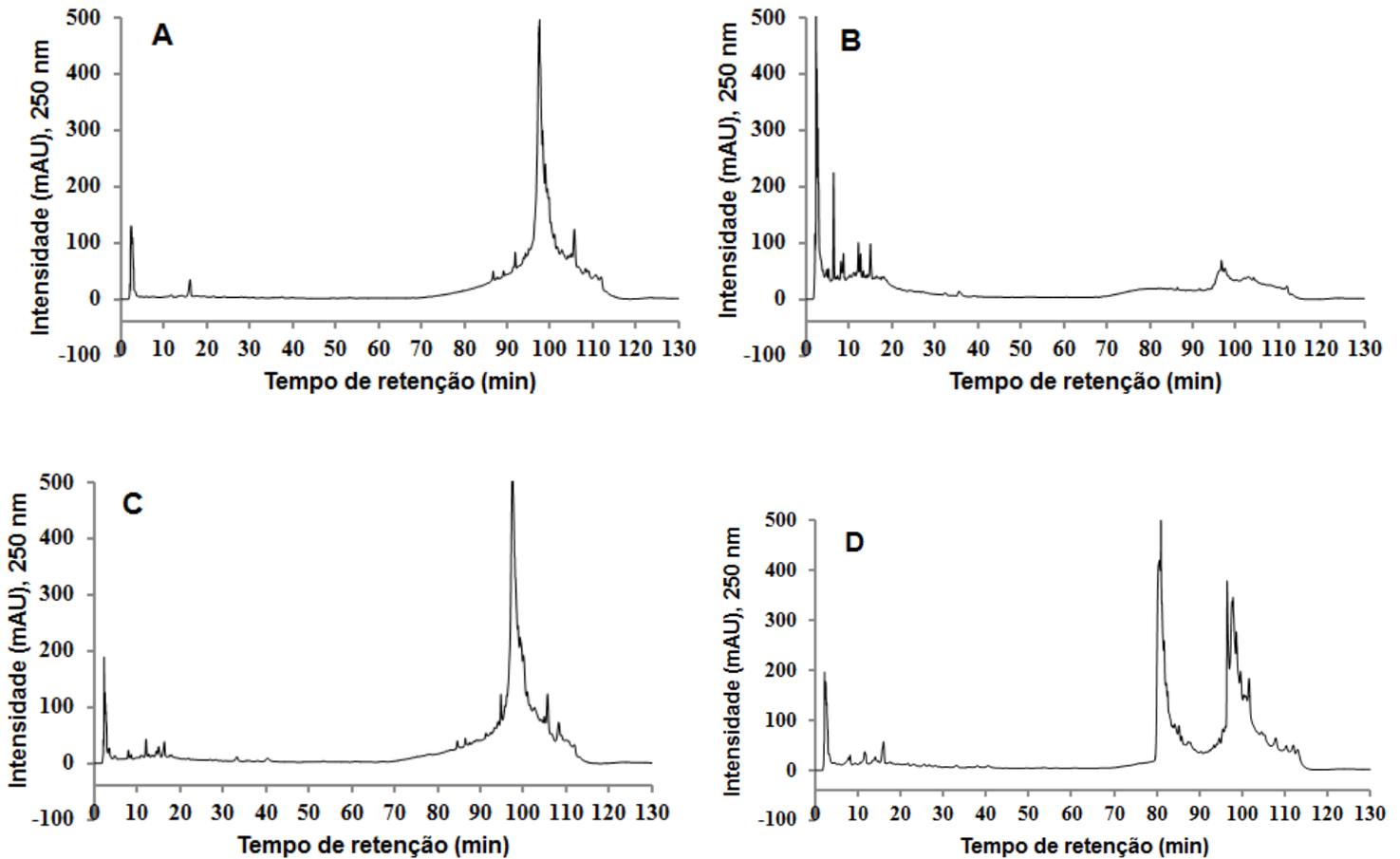
Gráfico 7 - Perfil cromatográfico por CLAE dos extratos de *Sanionia uncinata*.



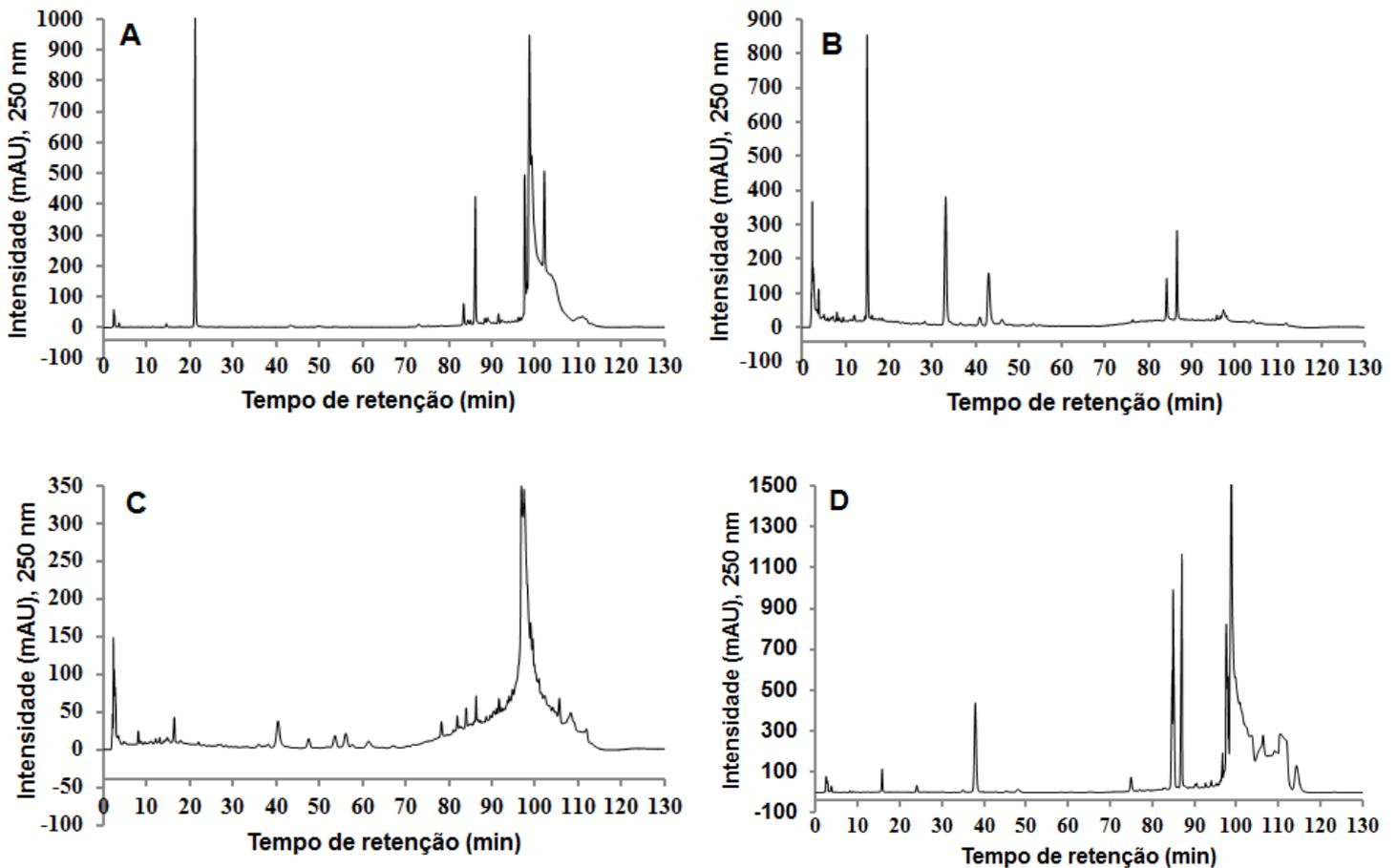


Legenda: (A) metanólico, (B) aquoso, (C) hidroalcoólico e (D) etanólico.

Gráfico 8 - Perfil cromatográfico por CLAE dos extratos de *Holomitriopsis laevifolia*.



Legenda: (A) metanólico, (B) aquoso, (C) hidroalcoólico e (D) etanólico.

Gráfico 9 - Perfil cromatográfico por CLAE dos extratos de *Leucobryum laevifolium*.

Legenda: (A) metanólico, (B) aquoso, (C) hidroalcoólico e (D) etanólico.

Observou-se diferenças no perfil cromatográfico em cada extrato nas espécies analisadas. A partir dos cromatogramas foi possível obter os espectros de UV-visível de cada ponto de retenção. Ao analisar os tempos de retenções e os comprimentos de onda máximo de cada espectro de absorção foi possível sugerir grupos de polifenóis de todos os extratos e em alguns desses também foi caracterizar a provável substância. Essas análises e identificações foram realizadas com base em referências recomendadas (SAKAKIBARA *et al.*, 2003; GRASSELLI, 1973; MABRY *et al.*, 1970; SCOTT, 1964). As tabelas 6, 7 e 8 mostram para *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. leucobryum*, respectivamente, os prováveis grupos de polifenóis e substâncias identificadas nos extratos, correspondentes aos picos dos cromatogramas dos gráficos 7, 8 e 9 e também majoritárias (em intensidade de área de integração) nos demais comprimentos de onda adotados para detecção. Os sinais com retenção acima de 97 minutos não foram caracterizados, pois corresponderam a componentes eluídos no retorno de composição da fase móvel.

Tabela 6 - Prováveis classes de ácidos fenólicos e substâncias caracterizadas dos extratos de *Sanionia uncinata*.

<i>Sanionia uncinata</i>	t _R (min)	λ _{max} (nm)	Prováveis grupos de polifenóis ^a	Provável substância ^b
EM	6,38	262	Ácido fenólico ou catequina	Ácido benzoico ou derivado
	9,49	248, 304	Flavona	-
	12,15	260	Ácido fenólico ou catequina	Ácido benzoico ou derivado
	77,33	284	Flavanona	Hesperitina ou derivado
EA	6,00	266, 260sh	Catequina	-
EH	6,43	270	Ácido fenólico ou catequina	Ácido benzoico ou derivado
	12,29	260, 228sh	Catequina	-
	84,18	246sh, 268,340	Flavona	-
	84,37	288, 330sh	Flavanona	-
	91,99	269, 340, 300(inflexão)	Flavona	Derivado de apigenina (metilados, acetilados ou outros)
	92,99	287	Chalcona	-
	92,93	268, 330	Flavona	-
	95,57	302,362	Chalcona	-
EE	6,40	268	Ácido fenólico ou catequina	Ácido benzoico ou derivado
	12,05	254	Ácido fenólico ou catequina	Ácido benzoico ou derivado
	81,52	344,268, 244sh	Flavona	-

Legenda: (EM) metanólico, (EA) aquoso, (EH) hidroalcoólico e (EE) etanólico.

^{a,b}com base em SAKAKIBARA *et al.* (2003); GRASSELLI, 1973; MABRY *et al.* (1970); SCOTT, 1964; t_R: tempo de retenção; λ: comprimento de onda; sh: ombro.

Tabela 7 - Prováveis classes de ácidos fenólicos e substâncias caracterizadas dos extratos de *Holomitriopsis laevifolia*.

<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	t _R (min)	λ _{max} (nm)	Prováveis grupos de polifenóis ^a	Provável substância ^b
EM	91,88	270	Flavanona	-
	97,42	286	Flavanona	-
EA	6,38	284, 230sh	Catequina	-
	8,67	258, 336	Flavona	-
	12,68	262, 308	Chalcona	-
	13,93	320	Ácido fenólico	Ácido sinápico ou derivado
	14,81	256, 292, 324sh	Flavanona	-
	14,96	258, 296sh, 230sh	Isoflavona	-
EH	7,94	260, 292	Ácido fenólico	Derivado do ácido vanílico provavelmente glicosilado
	16,30	220, 258, 318	Flavanona	-
EE	11,82	256, 326	Flavanona	-
	16,09	220, 258, 318	Flavanona	-
	80,32	284	Flavanona	-
	96,47	286	Chalcona	-

Rodapé: veja a Tabela 6.

Tabela 8 - Prováveis classes de ácidos fenólicos e substâncias identificadas dos extratos de *Leucobryum laevifolium*.

<i>Leucobryum laevifolium</i>	t _R (min)	λ _{max} (nm)	Prováveis grupos de polifenóis ^a	Provável substância ^b
EM	21,23	220, 260sh, 310	Flavona	Daidzeína ou derivado
	83,46	218, 256, 300	Isoflavona ^c	-
	88,99	265, 316	Flavona	Crisina ou derivado
	97,55	228, 258, 300	Isoflavona ^c	-
EA	8,99	234, 298	Ácido fenólico	Derivado do ácido m-hidroxibenzóico (provavelmente glicosilado)
	14,51	220, 262, 300	Isoflavona ^c	-
	33,12	214, 256, 308	Flavanona	-
	84,26	230sh, 278	Catequina	-
	86,65	214, 256, 308	Flavanona	-
EH	8,15	254, 294	Ácido fenólico ou flavona	-
	16,40	214, 254, 320	Flavanona	-
	81,98	236, 302, 338, 344sh	Flavonol	-
EE	90,58	362, 262	Flavonol	Galangina ou derivado
	96,67	218, 258, 300	Isoflavona ^c	

Rodapé: veja a Tabela 6. ^cas isoflavonas possuem λ_{max} de absorção próximos a 260 e 300 nm, mas não em 220 nm. Assim tais t_R foram sugeridos por serem isoflavonas, pois os solventes utilizados na fase móvel possuem absorção próximo a 220 nm e, portanto, podem influenciar os resultados de absorção nesse comprimento de onda.

Na caracterização dos compostos fenólicos por CLAE foram encontrados, de modo geral, ácidos fenólicos, como os ácidos benzoicos e diversas classes de flavonóides. Os ácidos benzoicos possuem sete átomos de carbono e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza (SOARES, 2002).

Os grupos sugeridos são compatíveis com o processo extrativo realizado. É conhecido que solventes polares como metanol, etanol e água extraíam, preferencialmente, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e chalconas mais polares (SIMÕES *et al.*, 2004) com os encontrados nos extratos das três espécies de musgos analisados por CLAE (Tabelas 6-8).

FERREIRA *et al.* 2008 afirmam que flavonas e flavonóis são protetores químicos que absorvem luz no comprimento de onda do UVB, protegendo as células vegetais dos danos causados pelas fotooxidações, pois se acumulam nas camadas epidérmicas das folhas e absorvem intensamente a luz na região do UVB. Genes mais resistentes aos danos da radiação UVB promovem aumento da síntese de flavonóides e de outros polifenóis, como flavonas e glicosídeos flavônicos (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Uma vez que todos os extratos apresentaram absorção máxima dentro da faixa de absorção dos flavonóides (ver Gráficos 2, 3 e 4) e também foram encontrados resultados significativos para quantificação de teores de polifenóis (ver Tabela 4), análise para caracterização de compostos fenólicos por CLAE foi necessária. Os cromatogramas e a caracterização dos principais componentes analisados evidenciaram a elevada seletividade na separação dos componentes com cada solvente empregado, uma vez que mesmos componentes não foram encontrados nos diferentes extratos de mesma espécie. Esta observação é interessante, pois evidencia uma diferença de cada extrato estudado neste trabalho imposta pela composição química.

10.6 Fator de proteção solar por método *in vitro*

Os dados obtidos do fator de proteção solar *in vitro* dos filtros sintéticos orgânicos e/ou dos extratos de *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 - Fator de proteção solar *in vitro* dos extratos individuais dos musgos *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* e destes extratos associados ao filtro solar benzofenona-3.

	- BZE			+ BZE (0,05 µg/mL)		
	<i>S. uncinata</i>	<i>H. laevifolia</i>	<i>L. laevifolium</i>	<i>S. uncinata</i>	<i>H. laevifolia</i>	<i>L. laevifolium</i>
EM	2,87 ± 0,01	0,30 ± 0,01	1,21 ± 0,01	13,49 ± 0,06	11,87 ± 0,02	12,11 ± 0,05
EA	1,10 ± 0,01*	4,67 ± 0,02	0,94 ± 0,003	14,70 ± 0,10	6,58 ± 0,01	21,16 ± 0,01
EH	1,11 ± 0,01*	9,79 ± 0,26	6,95 ± 0,03	8,16 ± 0,06	28,29 ± 0,33 [#]	36,89 ± 0,05
EE	2,42 ± 0,01	4,90 ± 0,03	0,37 ± 0,01	18,22 ± 0,10	26,36 ± 0,09 [#]	9,45 ± 0,01

Legenda: extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE).

Fator de proteção solar para filtros solares benzofenona-3: BZE 18,0 ± 0,1; octocrileno (OCT): 12,6 ± 0,2; *p*-metoxicinamato de octila (MCO): 35,8 ± 0,01 e 3-(4'-metil-benzilideno) cânfora (BZC): 36,5 ± 0,01 utilizados como controles positivos (ensaio ao lado esquerdo da tabela, -BZE). FPS do BZE a 0,05 µg/mL: 11,40 ± 0,10. Os valores identificados por * e # não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$). Demais resultados diferem significativamente ($P < 0,05$) entre si (Exato de Fischer e t-Student).

Observa-se na Tabela 9 que para a espécie *S. uncinata* os EM e EE apresentaram maior FPS quando comparados aos demais extratos. Para a espécie *H. laevifolia* os extratos que apresentaram maior FPS foram EA, EH e EE. Para o gênero *L. laevifolium* apenas o EH apresentou maior valor de FPS comparados aos demais extratos. Observa-se também que apenas o EH das espécies do Amazonas apresentaram o FPS acima de 6, que é o mínimo exigido pela legislação brasileira vigente.

Por outro lado, observa-se que quando os EA e EE de *S. uncinata*, EH e EE de *H. laevifolia* e EA e EH de *L. laevifolium* foram associados ao filtro solar BZE ocorreu um efeito sinérgico, aumentando consideravelmente os valores de FPS (Tabela 9). A concentração de BZE utilizada no efeito sinérgico foi menor (0,05 µg/mL) que o utilizado no ensaio de determinação de FPS dos extratos (0,1 µg/mL) porque o efeito maior que a soma dos efeitos de cada um dos elementos em separado poderia extrapolar a sensibilidade do leitor de microplacas.

Outro exemplo onde ocorre sinergismo é com a vitamina E, que ao ser utilizada em produtos para proteção solar, dependendo da sua formulação, pode aumentar o FPS determinado *in vivo*, ao diminuir a formação de eritema. A literatura aponta que flavonóides e outros derivados fenólicos podem atuar em sinergismo com vitaminas C e E (GUARATINI *et al.*, 2009). Interessante observar que houve uma correlação positiva significativa (r de Pearson = 0,69, $P < 0,05$) entre as induções de fotoproteção pelos extratos (FPS) e o sinergismo desses extratos com BZE (Tabela 9). Ao excetuar apenas dois extratos (EA de *H. laevifolia* e EH de *L. laevifolium*) a correlação é altamente significativa (r de Pearson = 0,886, $P < 0,001$). Diversas substâncias e a mistura delas, sintéticas ou de origem natural, vêm sendo

amplamente estudadas, na busca da otimização dos protetores solares, visando à ampliação da lista de substâncias fotoprotetoras aprovadas pelas agências regulamentadoras (GUARATINI *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2008; GASPAR *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2004).

Observa-se também que quando os EH de *S. uncinata*; EA de *H. laevifolia* e EE de *L. laevifolium* foram associados ao filtro BZE ocorreu uma diminuição do FPS (Tabela 9), ou seja, observou-se um efeito antagônico. Nota-se também que a contribuição dos EM das três espécies de musgos foi somente de aditividade sobre a absorção luminosa. Quando se faz uma comparação entre os resultados na presença de BZE e o resultado que seria esperado apenas pela aditividade, observa-se, por exemplo, intenso efeito sinérgico positivo (hipercrômico) da adição do EH de *L. laevifolium* sobre o FPS de BZE; elevado efeito sinérgico negativo (hipocrômico) da adição do EA de *H. laevifolia* sobre o FPS de BZE; e EM de *S. uncinata* sobre o FPS de BZE foi aparentemente neutra (isocrômico) (Gráfico 10). O baixo efeito hipocrômico em 305 nm, observado pelo efeito sinérgico de EM de *S. uncinata* com BZE (Gráfico 10) não ocorreu com os EM dos outros musgos.

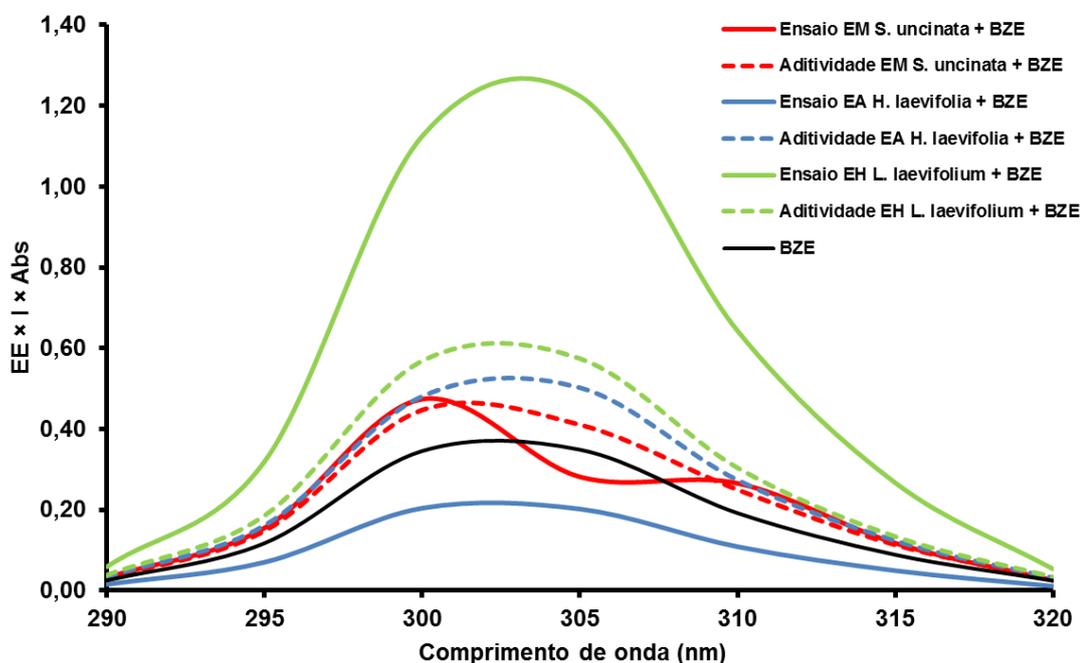
Tanto os efeitos hipocrômicos quanto os hipercrômicos (alteração da intensidade de absorção) são comumente observados com a alteração da polaridade do solvente, uma vez que esta afeta a transição eletrônica do cromóforo (como a BZE) (YADAV, 2005). Nos casos observados na Tabela 9, pode-se estimar que os efeitos se devem à alta concentração de componentes polares ou apolares, já que o solvente aplicado foi o mesmo. Relativamente ao solvente isopropanol, o aumento da polaridade da mistura, em que a BZE esteja presente, leva à maior intensidade da sua banda K ($\lambda_{\text{máx}}$ 260 nm, de transição π conjugada $\rightarrow \pi^*$) (PRETSCH *et al.*, 2000) e o efeito hipocrômico deve-se à alta concentração de componentes apolares. Embora outra banda de absorção da BZE (banda B, $\lambda_{\text{máx}}$ 350 nm, de transição π benzenoídico $\rightarrow \pi^*$) também é responsável pela absorção na região do espectro analisada (290 – 320 nm) (PRETSCH *et al.*, 2000), essa banda não sofre efeitos de intensidade de absorção pela composição do meio ou solvente (YADAV, 2005).

A BZE é susceptível a reações de adição de agentes nucleofílicos sobre o grupo carbonílico, que implicam na sua derivatização levando à modificação da molécula algumas vezes com adição de grupos auxocromos e resultando nos deslocamentos de comprimentos de onda máximos de absorção (deslocamentos hipsocrômico ou batocrômico). No entanto, reações entre os componentes dos extratos e a BZE não foram consideradas, pois as condições de incubação foram brandas e deslocamentos hipsocrômico ou batocrômico não foram observados.

Não foram encontradas correlações destes comportamentos hipocrômico e hiperacrômico com os sinais caracterizados na CLAE-fase reversa de polifenóis, seja comparando com os sinais de baixo tempo de retenção (polifenóis mais polares) ou com os de alto tempo (polifenóis menos polares), suspeitando que outras classes de substâncias estejam envolvidas na alteração de intensidade de absorção ao UV.

A análise estatística de Exato de Fischer, seguido de *t*-student mostrou que todos os extratos das três espécies de musgos, tanto na ausência quanto associado do BZE diferem dos valores de BZE sozinho. Quando comparados entre si, a estatística apontou que todos os valores diferem entre si, exceto o EA e EH de *S. uncinata* na ausência de BZE e EH e EE de *H. laevifolia* associados a BZE. Alguns dados desses resultados foram publicados recentemente na revista *Pharmacognosy Magazine* e estão disponíveis no apêndice.

Gráfico 10 – Gráfico comparativo mostrando diferenças entre efeitos hiperacrômicos (extrato hidroalcoólico de *Leucobryum laevifolia*) hipocrômicos (extrato aquoso de *Holomitriopsis laevifolia*) e isocrômico (extrato metanólico de *Sanionia uncinata*).



Legenda: EM – extrato metanólico; EA – extrato aquoso; EH – extrato hidroalcoólico.

10.7 *Salmonella/microsoma*

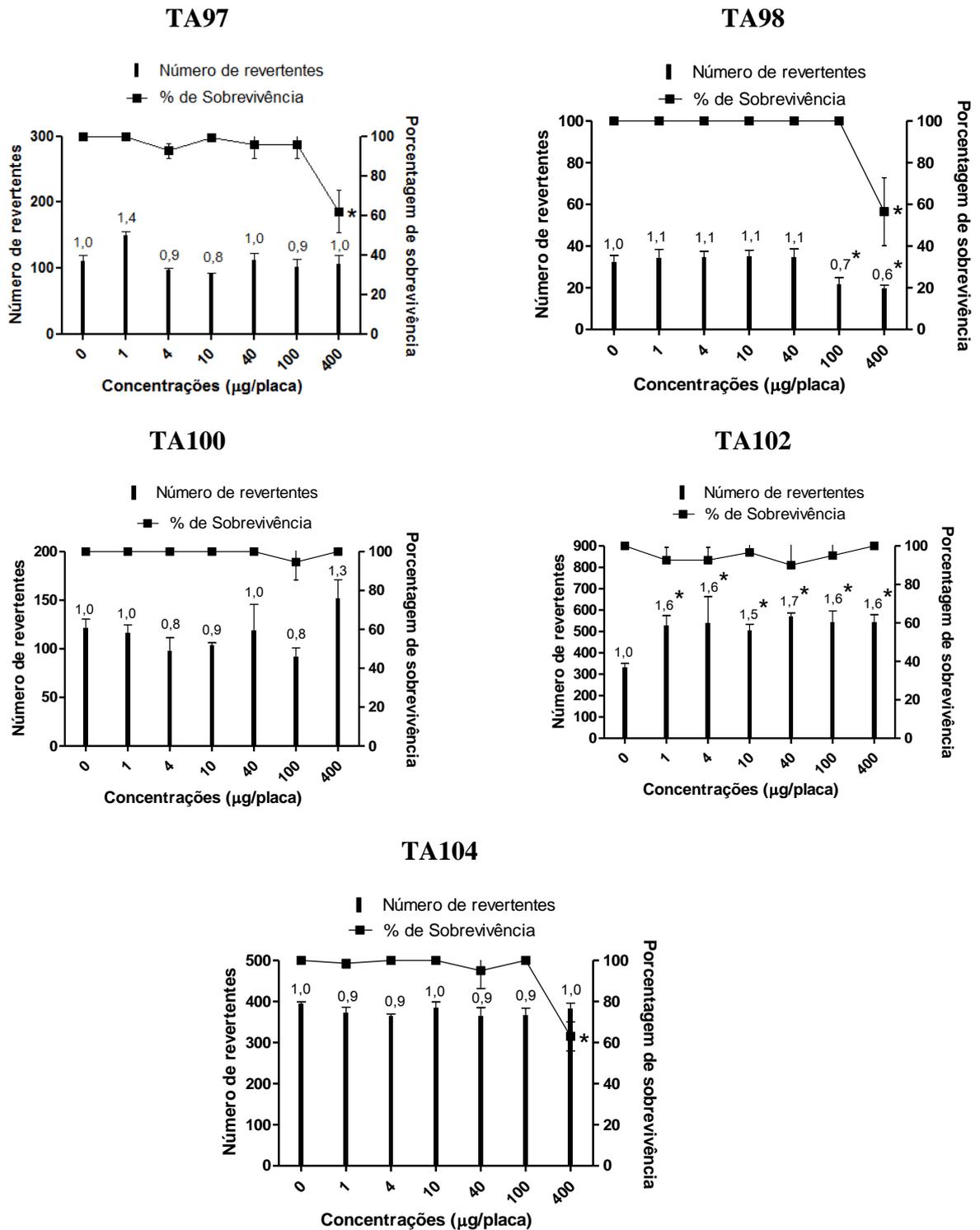
Há inúmeros exemplos de plantas que possuem compostos com potencial efeito mutagênico, carcinogênico ou teratogênico (HORN e VARGAS, 2008). A literatura aponta não haver publicações científicas em relação à atividade toxicológica de componentes dos musgos *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium*. Assim, no presente trabalho foi realizado também uma investigação da atividade citotóxica e mutagênica destes musgos, uma vez que os mesmos se apresentam promissores nos estudos de fotoproteção.

10.7.1 Na ausência de metabolização exógena

Os gráficos a seguir mostram a relação entre dose e resposta dos extratos metanólico (A) aquoso (B), hidroalcoólico (C) e etanólico (D) de *S. uncinata* (Gráfico 11), *H. laevifolia* (Gráfico 12) e *L. laevifolium* (Gráfico 13), avaliado pelo ensaio de *Salmonella/microsoma*, na ausência de metabolização exógeno, seguindo o protocolo de Pré-incubação, utilizando as cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104. Os respectivos índices de mutagenicidade (I.M.) estão apresentados acima das barras verticais. As linhas horizontais acima das barras apresentam a sobrevivência das cepas relativas ao controle negativo.

Gráfico 11. Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *Sanionia uncinata* no ensaio de *Salmonella*/microsoma na ausência de ativação metabólica, seguindo o protocolo de Pré-incubação.

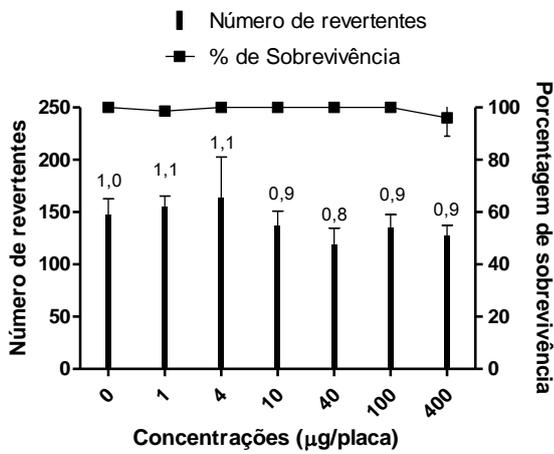
EXTRATO METANÓLICO DE *Sanionia uncinata* (A)



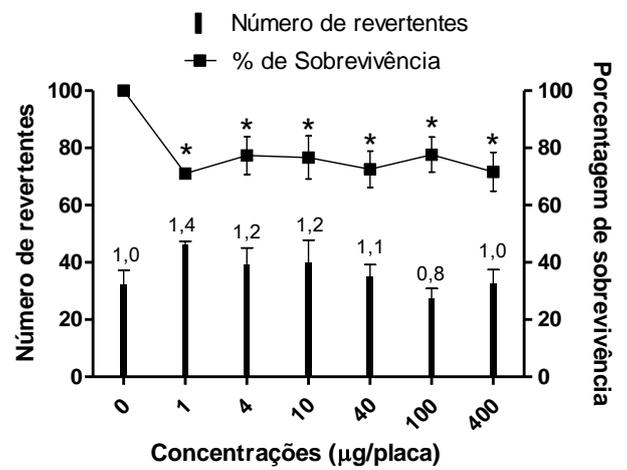
Legenda: IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (5,4); TA98 (8,9); TA100 (2,8); TA102 (6,3) e TA104 (2,8).

EXTRATO AQUOSO DE *Sanionia uncinata* (B)

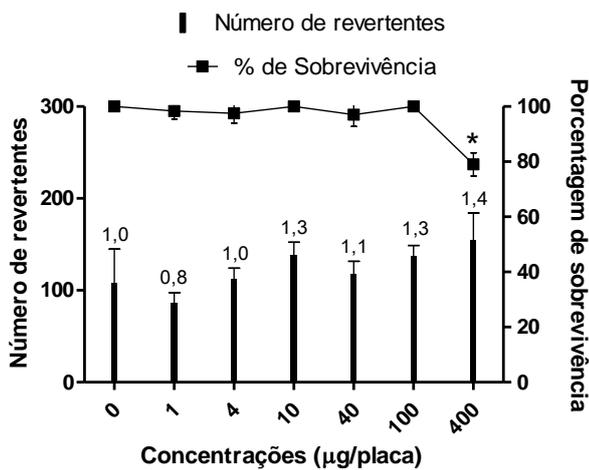
TA97



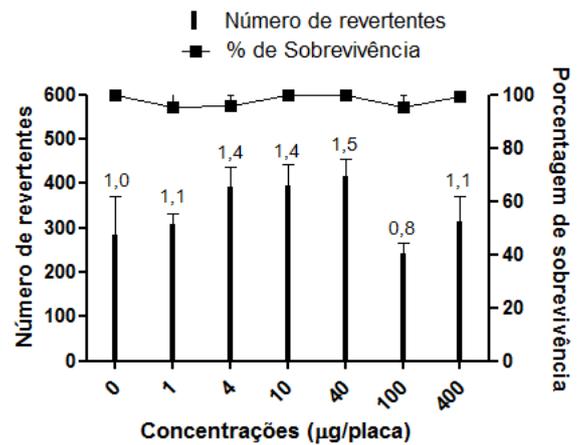
TA98



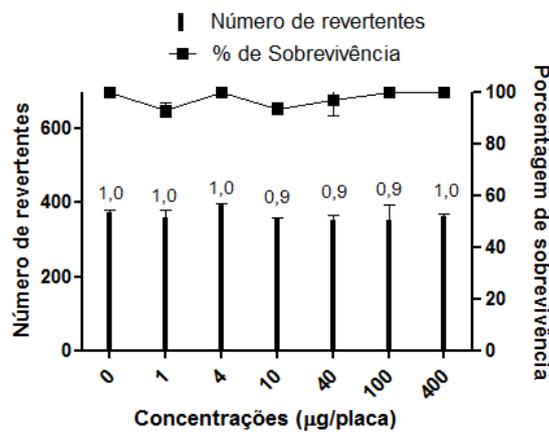
TA100



TA102



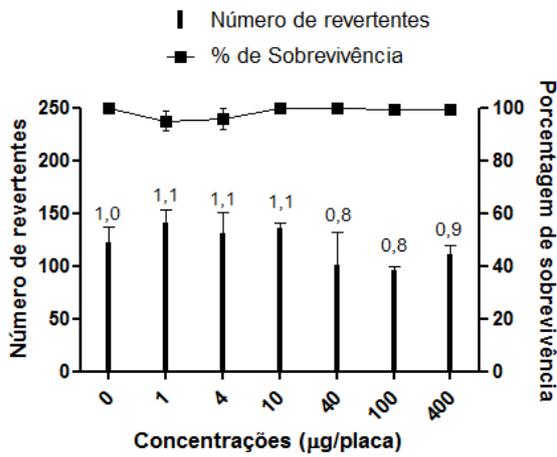
TA104



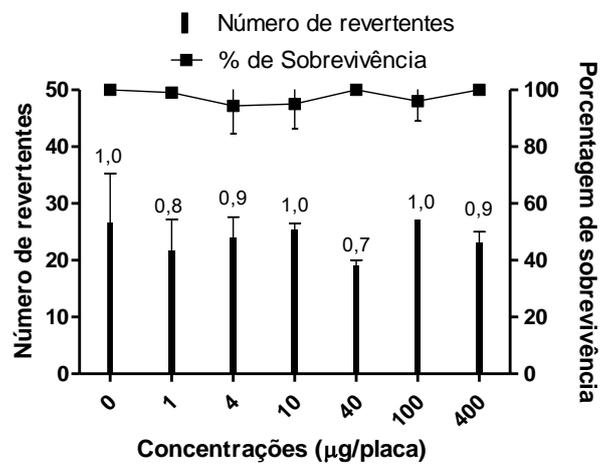
Legenda: IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (4,7); TA98 (9,6); TA100 (3,6); TA102 (3,6) e TA104 (2,9).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Sanionia uncinata* (C)

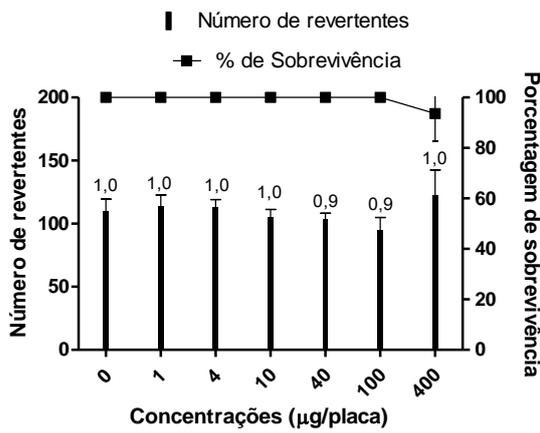
TA97



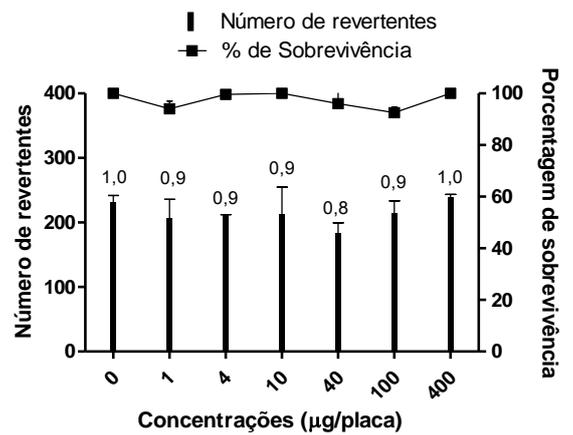
TA98



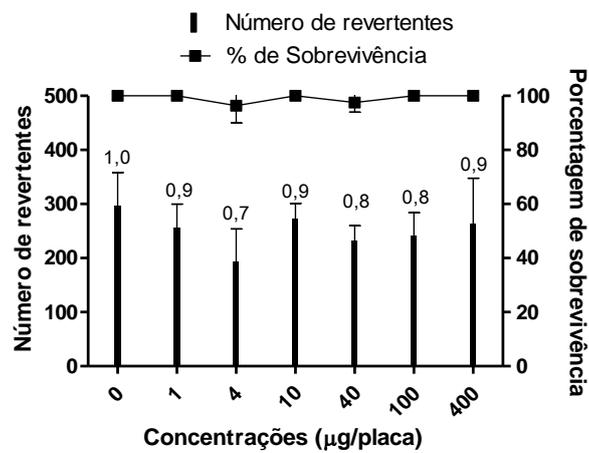
TA100



TA102



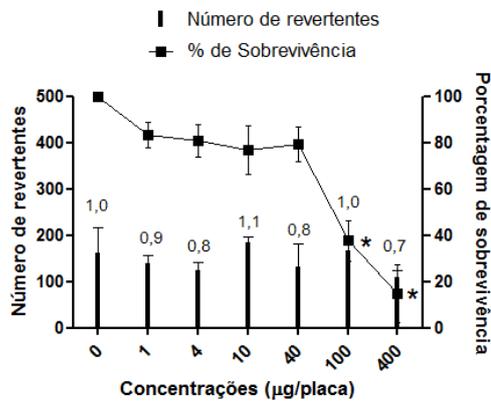
TA104



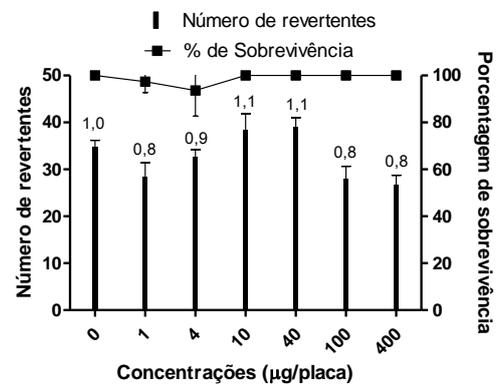
Legenda: IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (4,7); TA98 (7,9); TA100 (3,6); TA102 (5,5) e TA104 (2,9).

EXTRATO ETANÓLICO DE *Sanionia uncinata* (D)

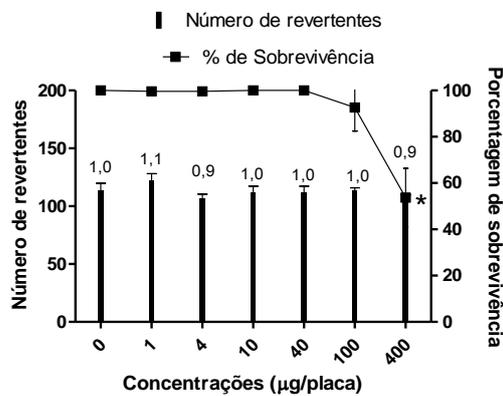
TA97



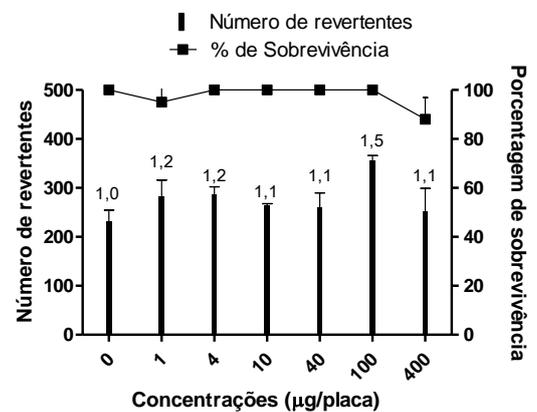
TA98



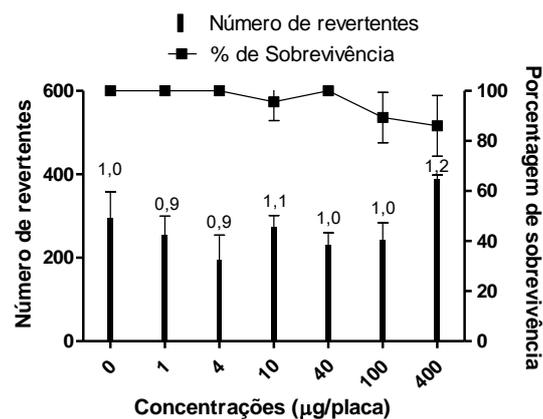
TA100



TA102



TA104



IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (2,7); TA98 (5,0); TA100 (2,8); TA102 (8,7) e TA104 (3,0).

Legenda: Extratos metanólico (A) aquoso (B), hidroalcoólico (C) e etanólico (D). * $P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

O EM de *S. uncinata* induziu uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nas UFCs das cepas TA97, TA98 e TA104, em relação ao controle negativo, na maior concentração testada (400 µg/placa), sugerindo respostas citotóxicas. Além disso, esse extrato induziu significativa diminuição das colônias revertentes da cepa TA98, nas concentrações de 100 e 400 µg/placa. Essas respostas citotóxicas foram evidenciadas pelo crescimento de fundo das colônias (*background*), visualizado em microscópio com aumento de 40x. Também foi observado que EM induziu aumento significativo ($P < 0,05$) das colônias revertentes da cepa TA102, em todas as concentrações testadas. Mas não foram consideradas respostas positivas para mutagenicidade, tendo em vista os critérios para se considerar uma amostra positiva, conforme item 9.8, em Material e métodos.

O EA de *S. uncinata* também induziu diminuição significativa ($P < 0,05$) nas UFCs da cepa TA100, a 400 µg/placa. Esse efeito também foi observado para a cepa TA98, porém induzidas em todas as concentrações testadas do extrato.

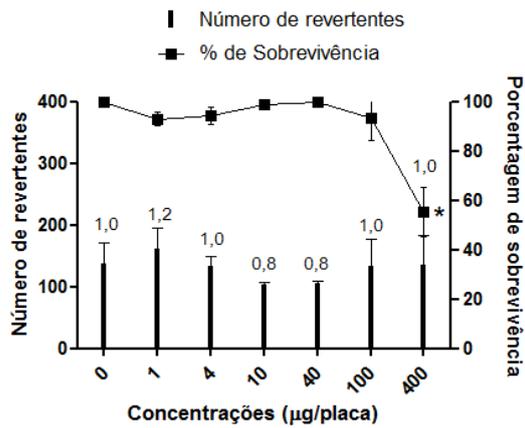
O EE de *S. uncinata* inibiu na sobrevivência celular da cepa TA97, nas concentrações de 100 a 400 µg/placa, e da cepa TA100, a 400 µg/placa.

O EH de *S. uncinata* não induziu respostas citotóxicas. Por fim, não foi observada indução mutagênica dos extratos do musgo *S. uncinata* para as cepas estudadas na ausência de ativação metabólica.

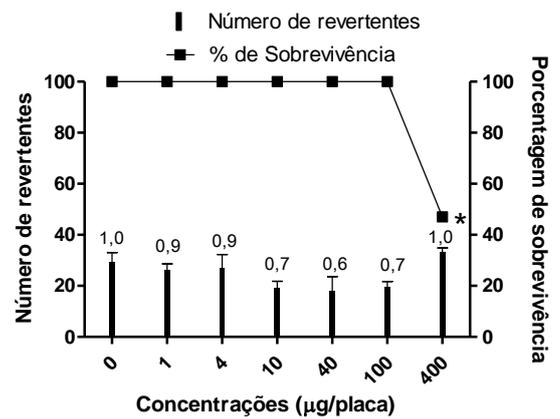
Gráfico 12. Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *Holomitriopsis laevifolia* no ensaio de *Salmonella*/microssoma na ausência de ativação metabólica, seguindo o protocolo de Pré-incubação.

EXTRATO METANÓLICO DE *Holomitriopsis laevifolia* (A)

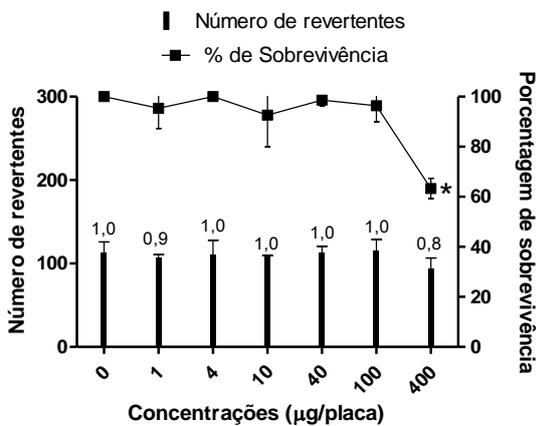
TA97



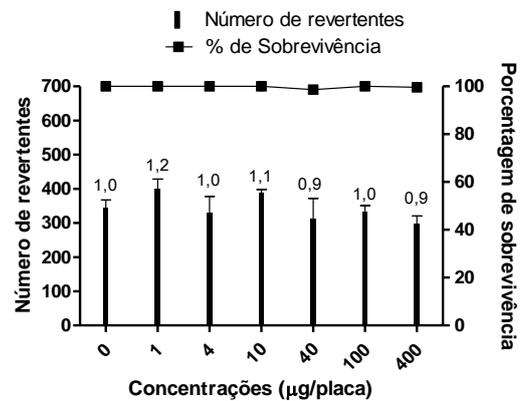
TA98



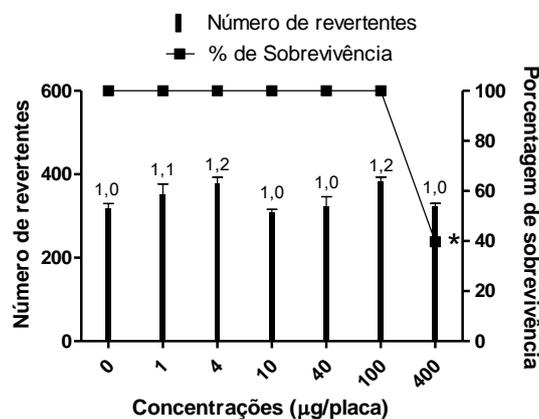
TA100



TA102



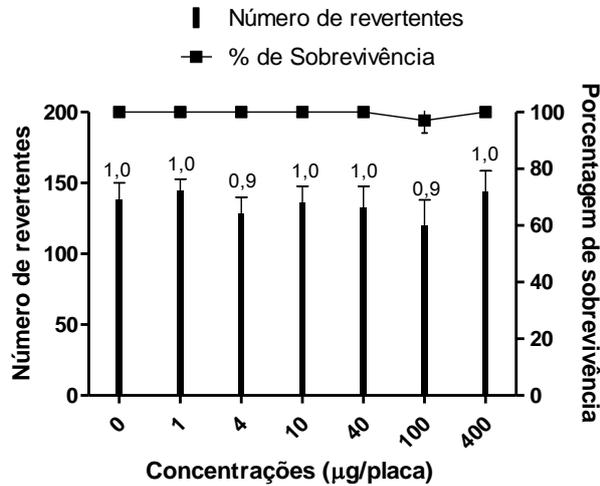
TA104



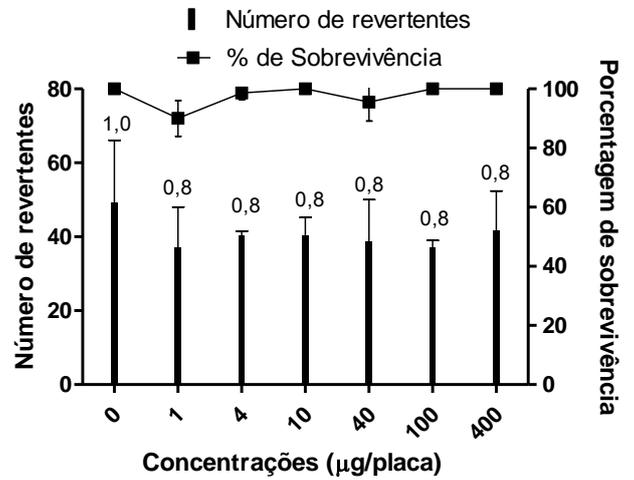
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (3,2); TA98 (7,0); TA100 (3,8); TA102 (3,2) e TA104 (2,1).

EXTRATO AQUOSO DE *Holomitriopsis laevifolia* (B)

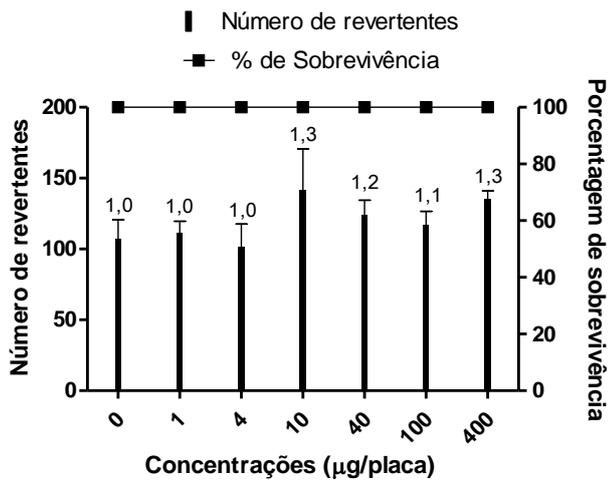
TA97



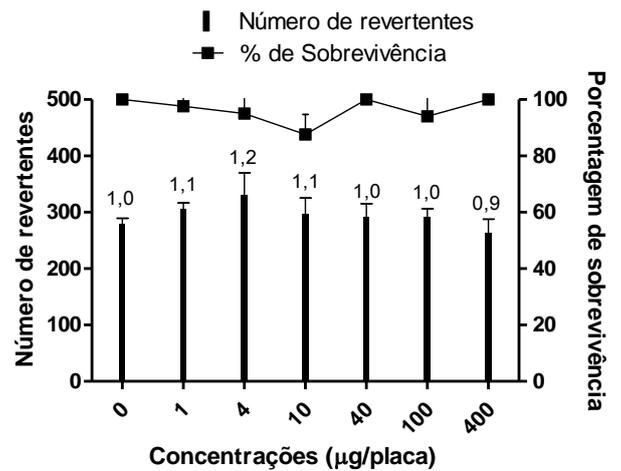
TA98



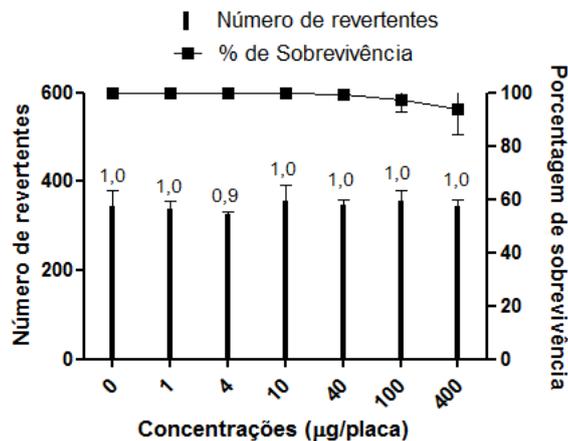
TA100



TA102



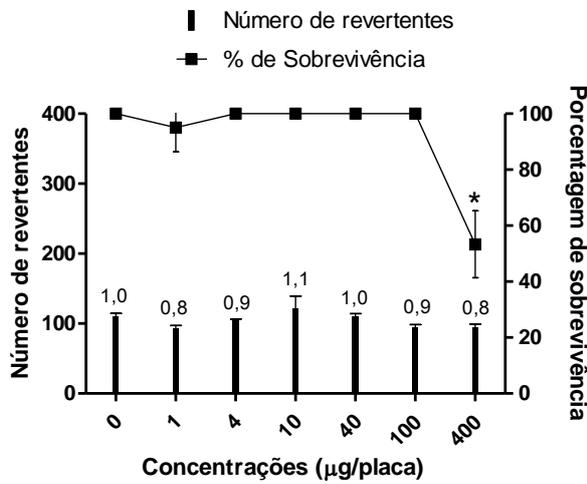
TA104



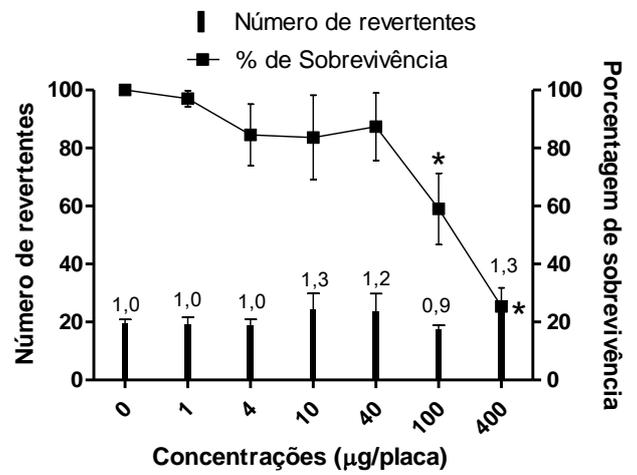
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (7,3); TA98 (11); TA100 (2,2); TA102 (6,5) e TA104 (3,1).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Holomitriopsis laevifolia* (C)

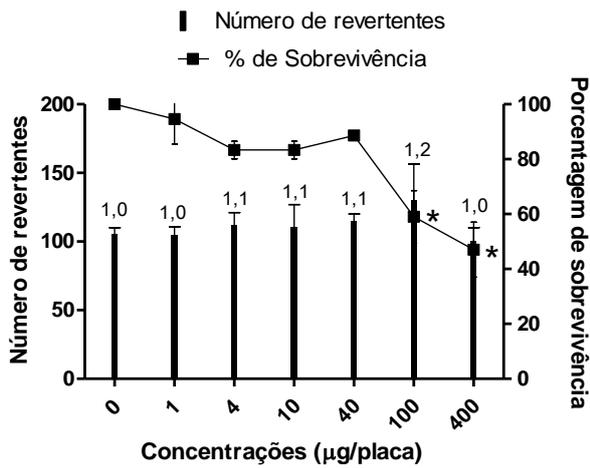
TA97



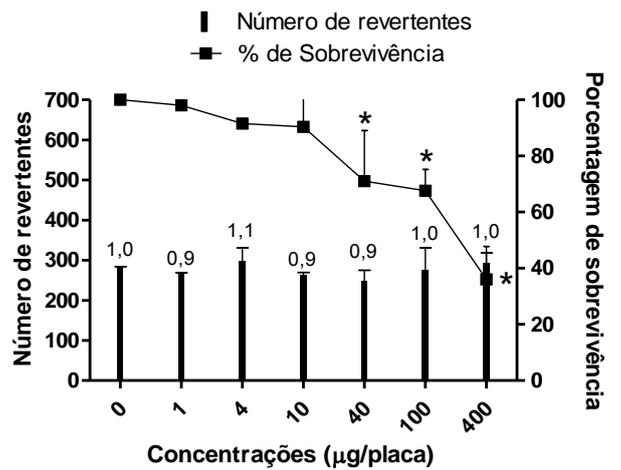
TA98



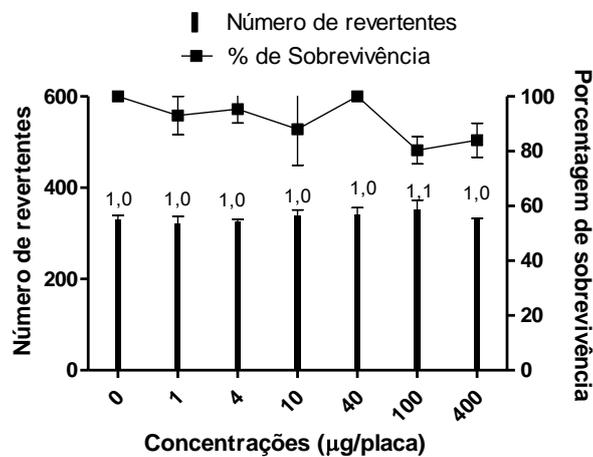
TA100



TA102



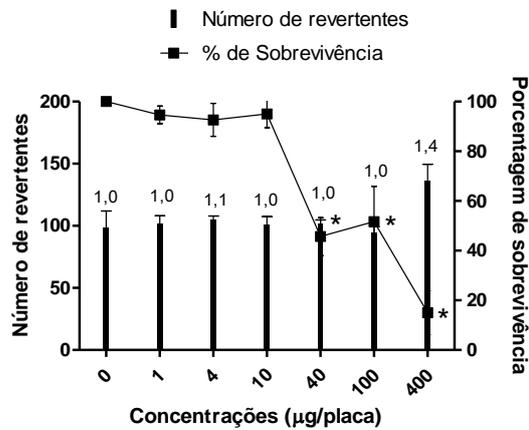
TA104



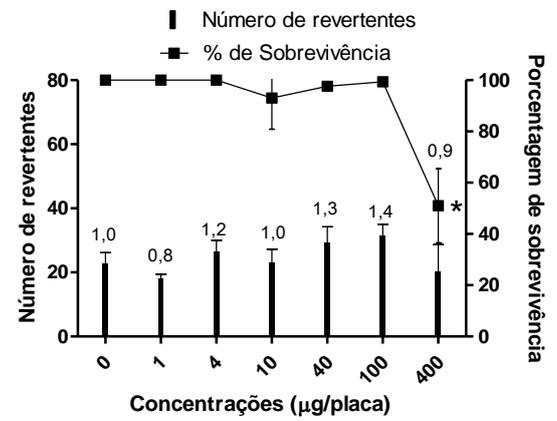
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (3,2); TA98 (11); TA100 (3,8); TA102 (3,3) e TA104 (2,1).

EXTRATO ETANÓLICO DE *Holomitriopsis laevifolia* (D)

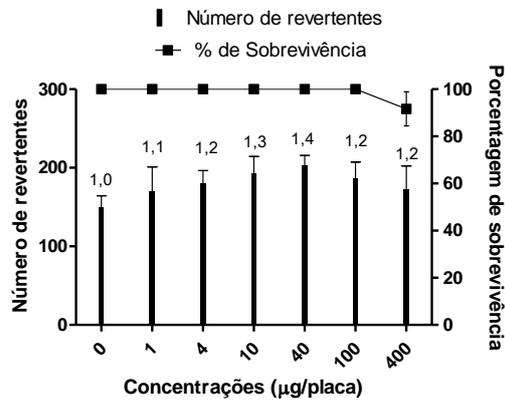
TA97



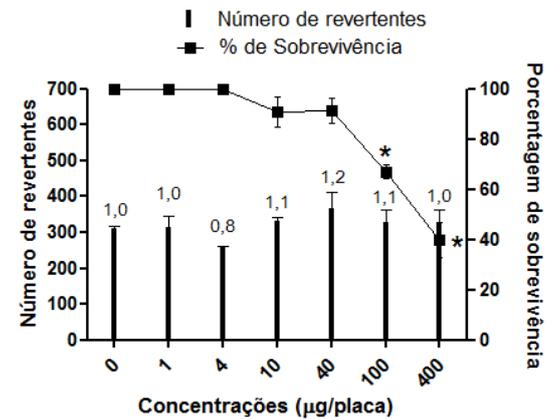
TA98



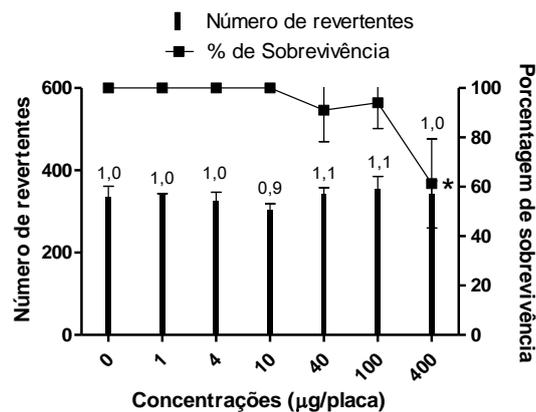
TA100



TA102



TA104



IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (2,0); TA98 (17,0); TA100 (2,6); TA102 (6,5) e TA104 (2,9).

Legenda: extratos metanólico (A) aquoso (B), hidroalcoólico (C) e etanólico (D) de *Holomitriopsis laevifolia*. * $P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

O EM de *H. laevifolia* induziu uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nas UFCs das cepas TA97, TA98, TA100 e TA104, em relação ao controle negativo, na maior concentração testada (400 µg/placa), sugerindo respostas citotóxicas.

O EA de *H. laevifolia* não induziu efeitos citotóxicos ou mutagênicos para as cepas analisadas.

O EH de *H. laevifolia* induziu também induziu uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nas UFCs das cepas TA97, a 400 µg/placa, TA98 e TA100, de 100-400 µg/placa e TA102, a partir de 40 µg/placa em relação ao controle negativo

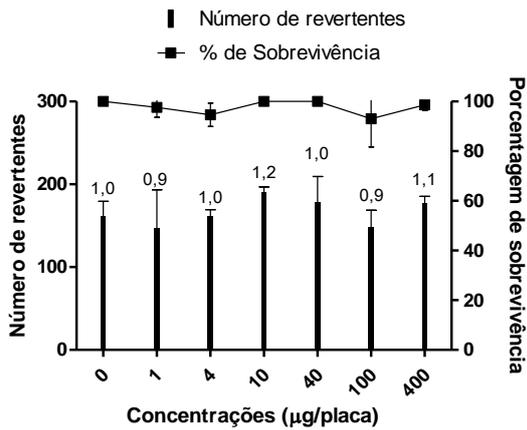
Esse efeito também foi observado para as cepas TA98 e TA104 a 400 µg/placa, TA102, a partir de 100 µg/placa e TA97, a partir de 40 µg/placa do EE de *H. laevifolia*.

Não foi observada indução mutagênica na presença de extratos do musgo *H. laevifolia*.

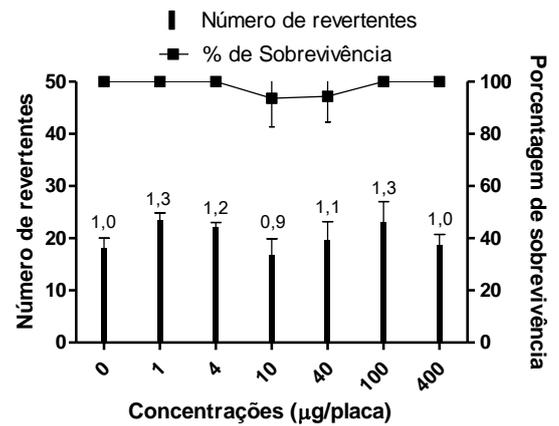
Gráfico 13. Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *Leucobryum laevifolium* no ensaio de *Salmonella*/microsoma na ausência de ativação metabólica, seguindo o protocolo de Pré-incubação.

EXTRATO METANÓLICO DE *Leucobryum laevifolium* (A)

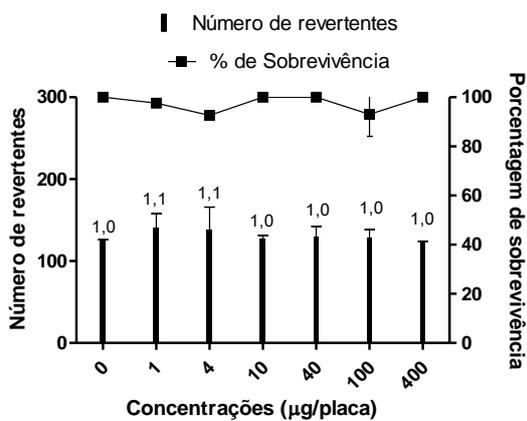
TA97



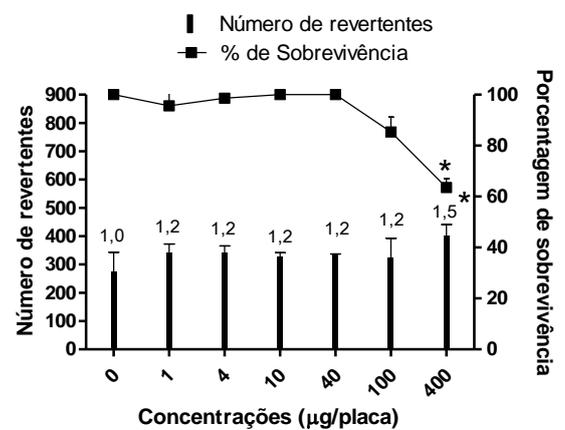
TA98



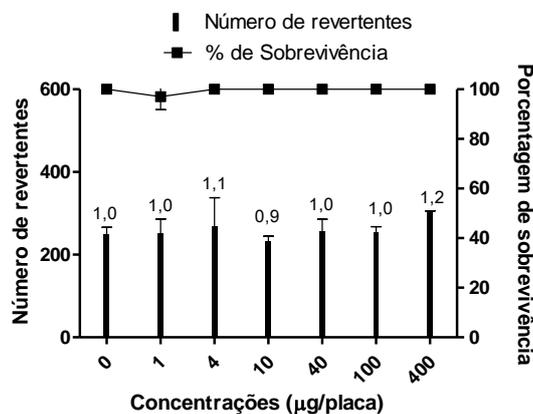
TA100



TA102



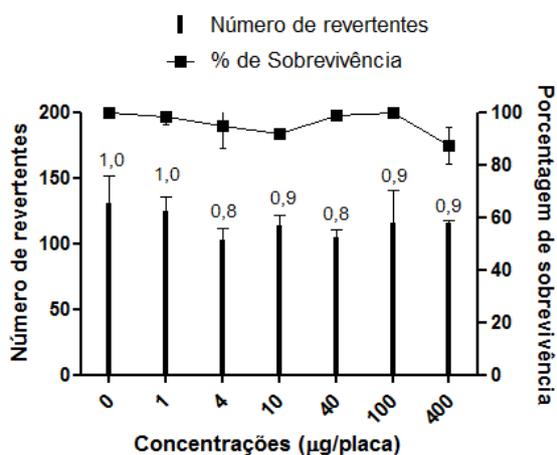
TA104



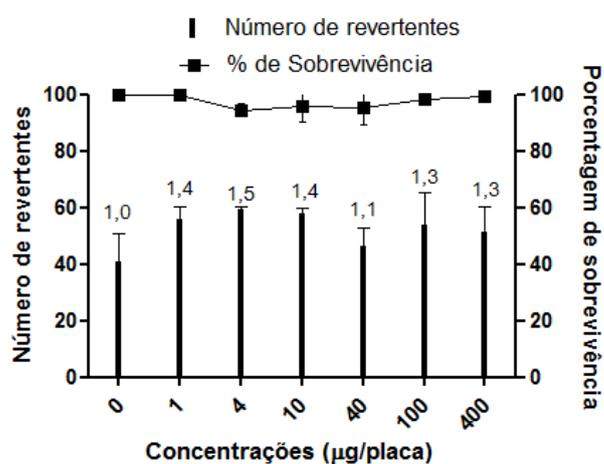
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (6,2); TA98 (23,0); TA100 (4,4); TA102 (7,1) e TA104 (3,1).

EXTRATO AQUOSO DE *Leucobryum laevifolium* (B)

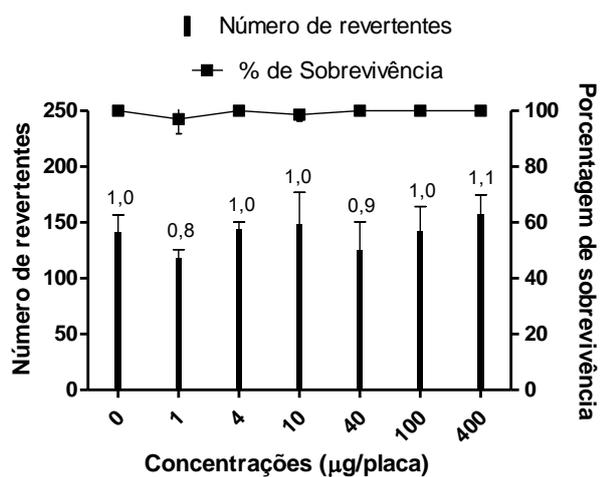
TA97



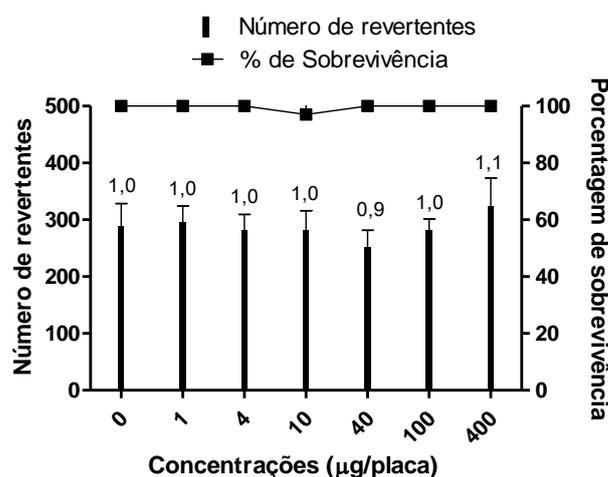
TA98



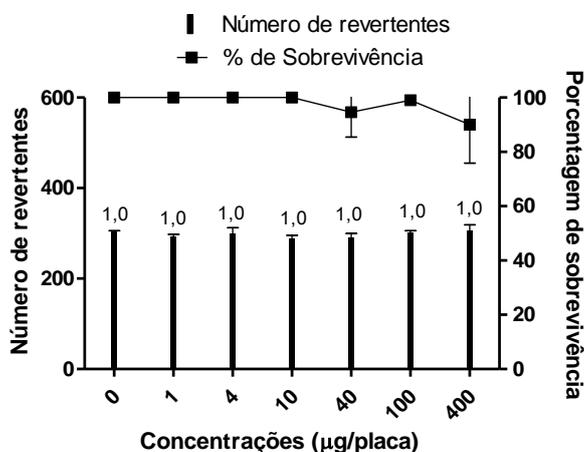
TA100



TA102



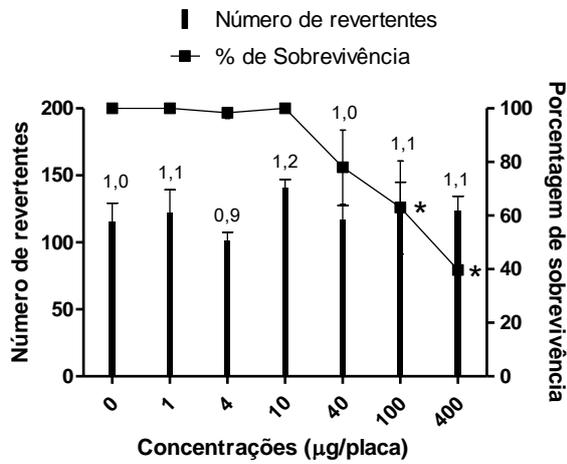
TA104



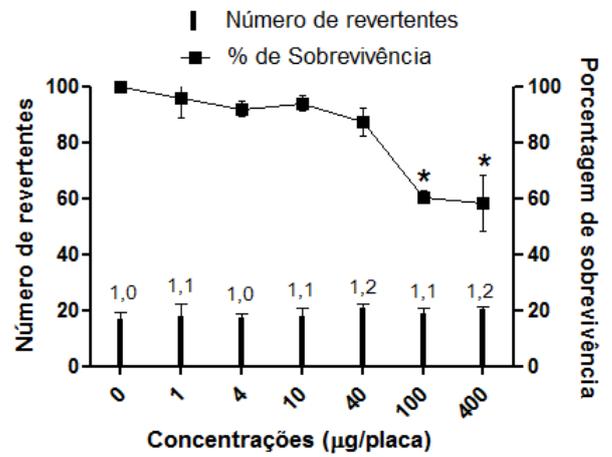
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (6,2); TA98 (5,3); TA100 (8,0); TA102 (6,3) e TA104 (3,6).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Leucobryum laevifolium* (C)

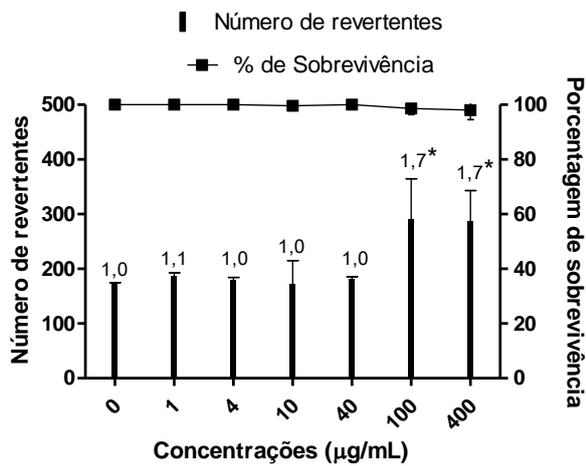
TA97



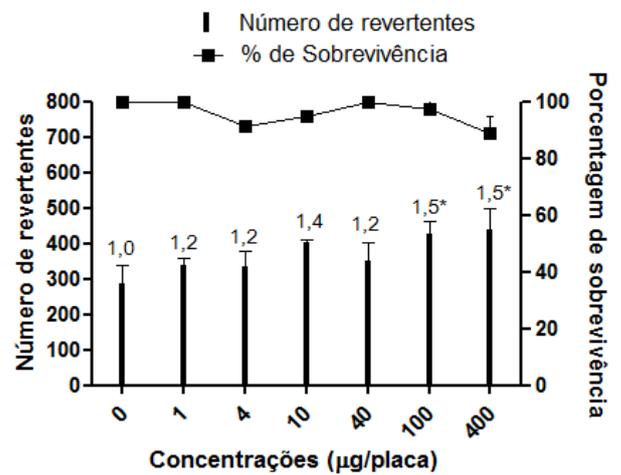
TA98



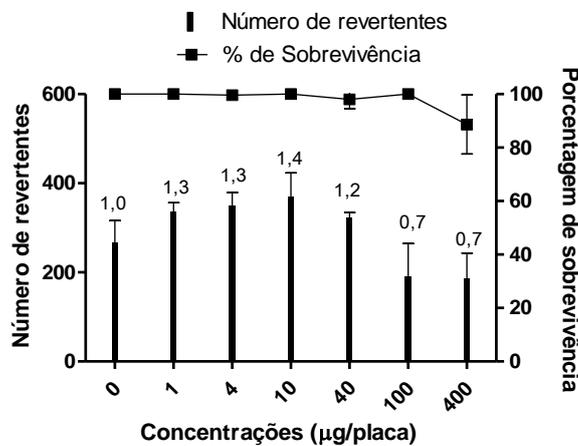
TA100



TA102



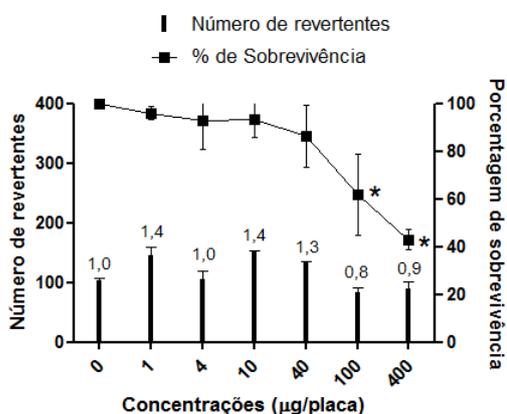
TA104



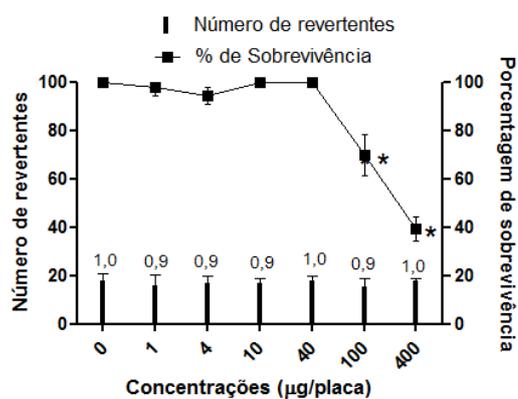
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (5,7); TA98 (17,0); TA100 (3,3); TA102 (6,3) e TA104 (4,5).

EXTRATO ETANÓLICO DE *Leucobryum laevifolium* (D)

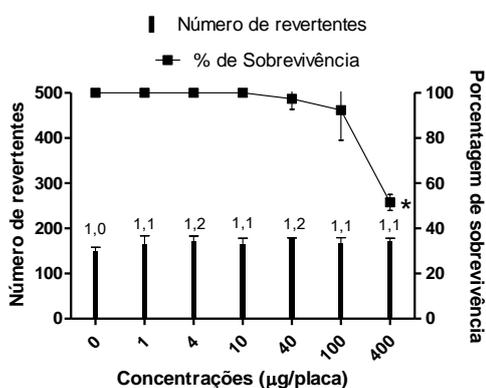
TA97



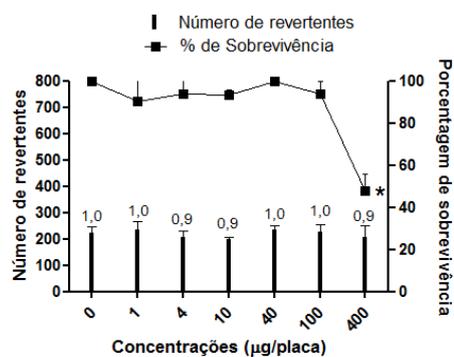
TA98



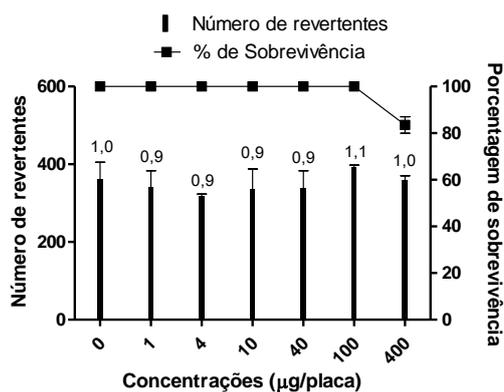
TA100



TA102



TA104



IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (3,2); TA98 (16,0); TA100 (2,3); TA102 (8,3) e TA104 (2,1).

Legenda: extratos metanólico (A) aquoso (B), hidroalcoólico (C) e etanólico (D). *P < 0,05 relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

O EM de *L. laevifolium* induziu uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nas UFCs da cepa TA102, a 400 µg/placa, em relação ao controle negativo. Também foi observado que EM induziu aumento significativo ($P < 0,05$) das colônias revertentes da cepa TA102, a 400 µg/placa. Mas não foi considerada resposta positiva para mutagenicidade, tendo em vista os critérios para se considerar uma amostra positiva ($I.M. \geq 2$).

O EA de *L. laevifolium* não induziu efeitos citotóxicos ou mutagênicos para as cepas analisadas.

O EH de *L. laevifolium* também induziu uma diminuição significativa ($P < 0,05$) nas UFCs das cepas TA97 e TA98, a partir de 100 µg/placa. O mesmo extrato induziu aumento significativo ($P < 0,05$) das colônias revertentes das cepas TA100 e TA102, a partir de 100 µg/placa, apesar de não terem atingidos o valor crítico para considerar amostras positivas.

O EE de *L. laevifolium* induziu inibição na sobrevivência celular das cepas TA97 e TA98, nas concentrações de 100 a 400 µg/placa, e das cepas TA100 e TA102, a 400 µg/placa.

Observa-se, portanto, que apesar de detectar algumas respostas tóxicas, os extratos das três espécies não induziram mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura, detectadas pelas cepas TA97 e TA98, e substituição de pares de base, detectadas pelas cepas TA100, TA102 e TA104.

A partir dos resultados obtidos até o presente momento, com as três espécies de musgos estudadas, foram selecionados extratos promissores em fotoproteção para continuação das avaliações de mutação de ponto, usando metabolização exógena, e de fotomutagenicidade (empregando genoma bacteriano), assim como avaliações de genotoxicidade e fotogenotoxicidade (empregando linhagens celulares de eucariotos). Essas seleções foram baseadas nos resultados obtidos pelos teores de polifenóis totais, da capacidade antioxidante pelo método do radical DPPH e, principalmente, pela determinação do FPS. A Tabela 10 apresenta uma compilação dos resultados obtidos com esses métodos, que levou a seleção dos extratos promissores em fotoproteção.

Tabela 10 – Compilação dos resultados obtidos em fotoproteção.

Atividades	<i>S. uncinata</i>				<i>H. laevifolia</i>				<i>L. leucobryum</i>			
	EM	EA	EH	EE	EM	EA	EH	EE	EM	EA	EH	EE
Teor de polifenóis ≤ 2,0 mg de catecol/g de extrato	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Captura do radical DPPH até 1000 µg/mL de extrato	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
FPS ≥ 6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
FPS + BZE ≥ 6 (Com efeito sinérgico)	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-

Legenda: extrato metanólico (EM), aquoso (EA), hidroalcoólico (EH) e etanólico (EE).

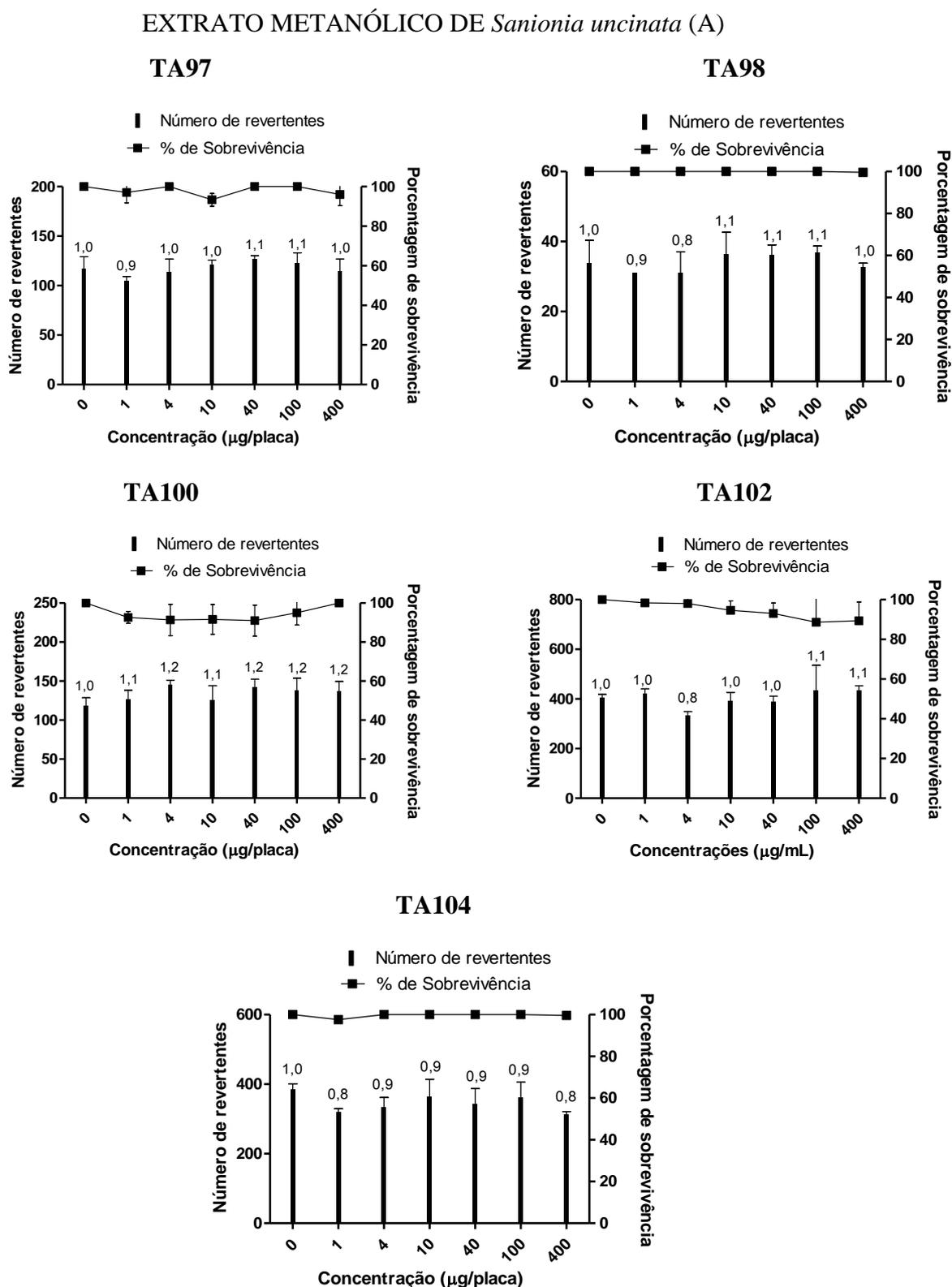
(+): presença (-): ausência de atividades. Observação: Nenhum extrato induziu efeito mutagênico.

Com base na análise dos resultados descritos na Tabela 10 foram selecionados os seguintes extratos: *S. uncinata* – extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico; *H. laevifolia* – extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico; *L. laevifolium* – extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico. Apesar das determinações de teores de polifenóis totais e da capacidade antioxidante terem sido consideradas, o principal ensaio utilizado como critério de seleção foi a determinação do FPS. Assim, o EA de *S. uncinata*, EM de *H. laevifolia* e EE de *L. laevifolium* foram excluídos, pois apresentaram baixos valores de FPS, inclusive em associação com BZE.

10.7.2 Na presença de metabolização exógena por S9 mix

Os gráficos a seguir mostram as relações doses-respostas dos extratos metanólicos (A) hidroalcoólico (B) e etanólico (C) de *S. uncinata* (Gráfico 14); aquoso (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C) de *H. laevifolia* (Gráfico 15); metanólico (A) aquoso (B) e hidroalcoólico (C) de *L. laevifolium* (Gráfico 16) sobre o ensaio de *Salmonella*/microsossoma na presença de metabolização exógena com S9 mix, seguindo o protocolo de Pré-incubação, utilizando as cepas TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104. Os respectivos índices de mutagenicidade (I.M.) estão apresentados acima das barras verticais. As linhas horizontais acima das barras apresentam a sobrevivência das cepas relativas ao controle negativo.

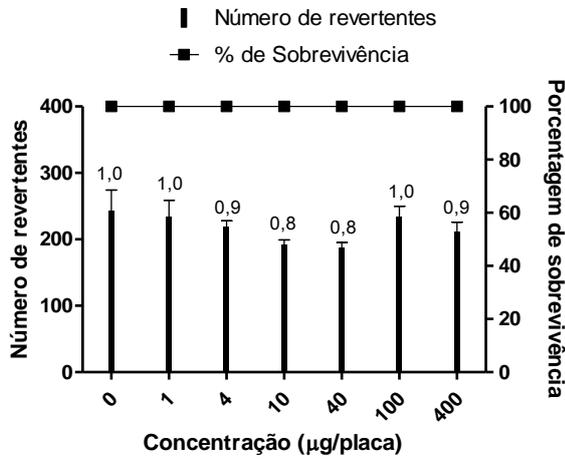
Gráfico 14. Relações doses-respostas dos extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico de *Sanionia uncinata* no ensaio de *Salmonella*/microsoma na presença de ativação metabólica por S9 mix, seguindo o protocolo de Pré-incubação.



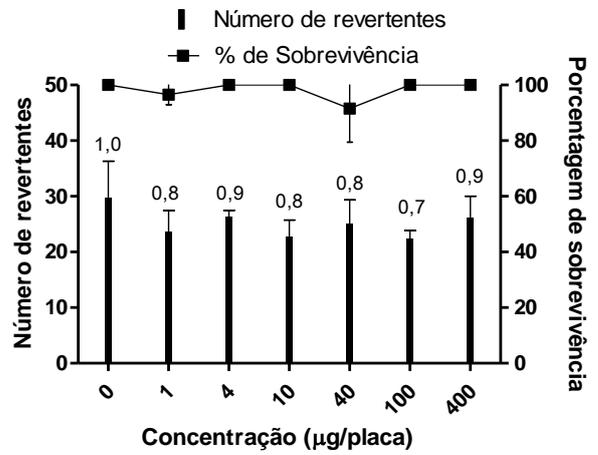
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (12,4); TA98 (19,0); TA100 (17,2); TA102 (4,1) e TA104 (3,4).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Sanionia uncinata* (B)

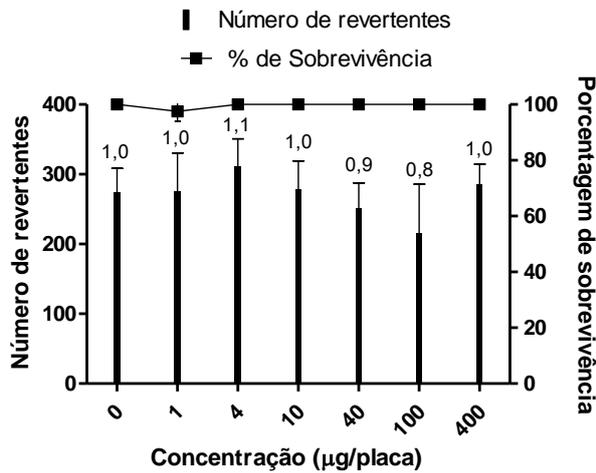
TA97



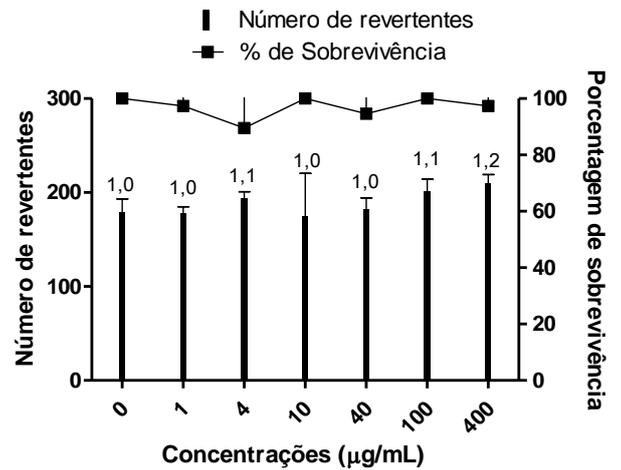
TA98



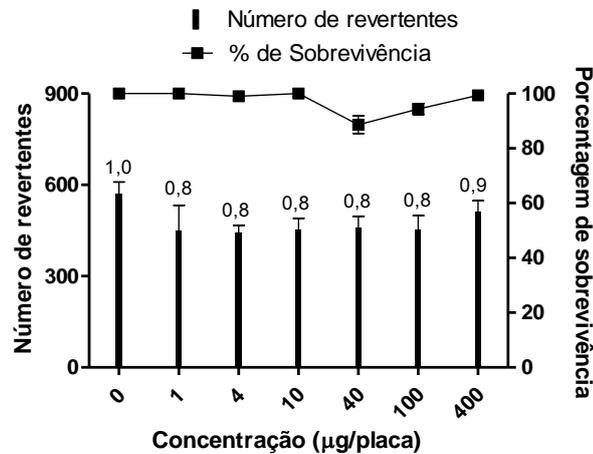
TA100



TA102



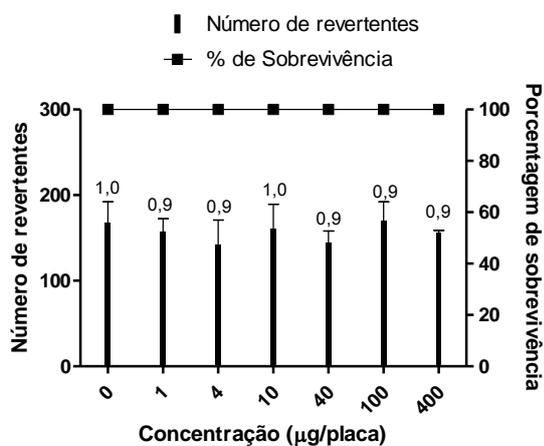
TA104



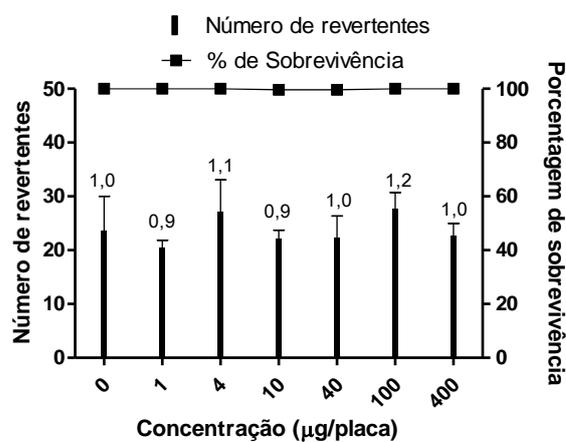
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (6,8); TA98 (3,3); TA100 (4,4); TA102 (8,5) e TA104 (2,8).

EXTRATO ETANÓLICO DE *Sanionia uncinata* (C)

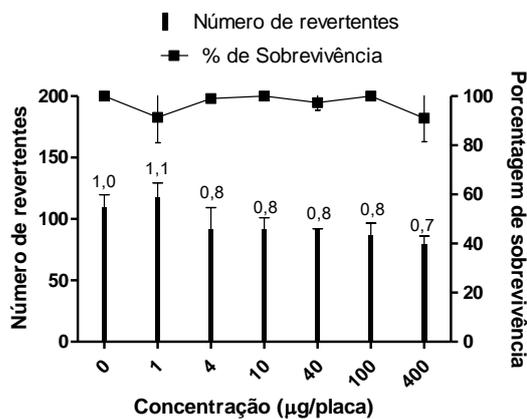
TA97



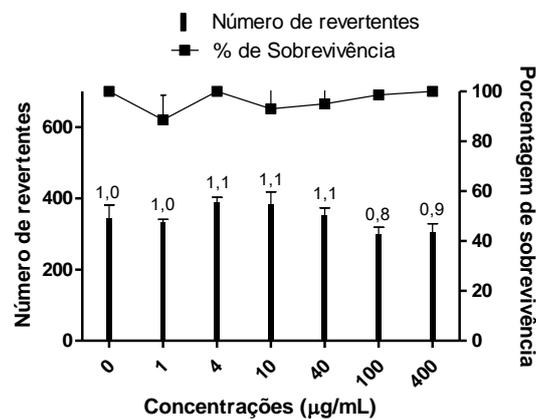
TA98



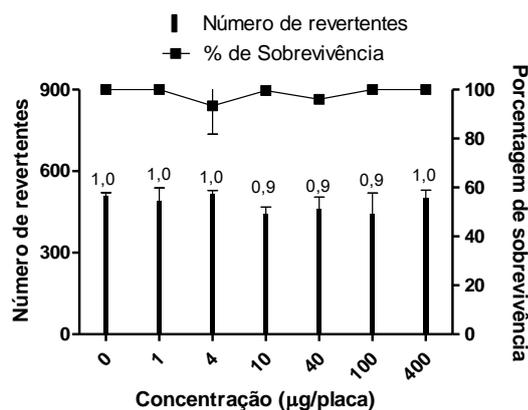
TA100



TA102



TA104



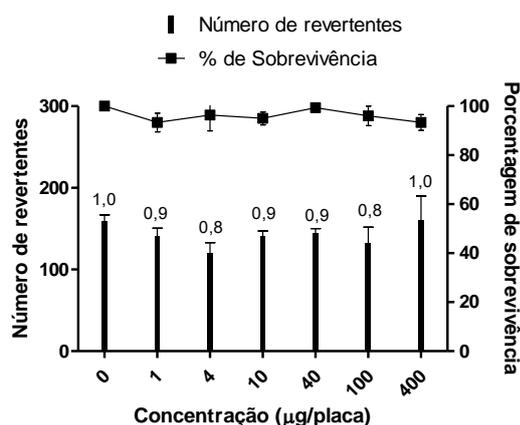
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (9,4); TA98 (18,0); TA100 (11,5); TA102 (4,6) e TA104 (3,3).

Legenda: extratos metanólico (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C).

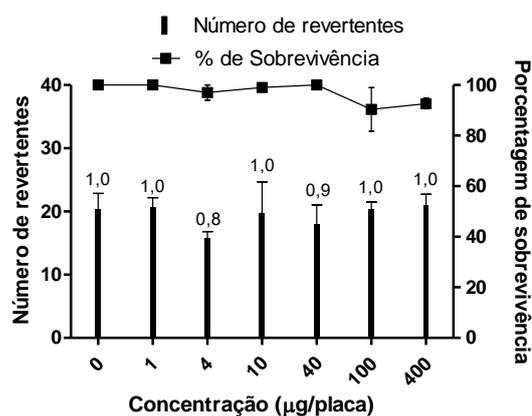
Gráfico 15 - Relações doses-respostas dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *Holomitriopsis laevifolia* no ensaio de *Salmonella*/microsoma na presença de ativação metabólica por S9 mix, seguindo o protocolo de Pré-incubação.

EXTRATO AQUOSO DE *Holomitriopsis laevifolia* (A)

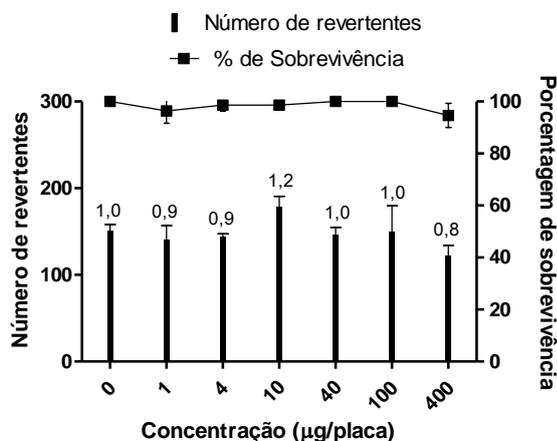
TA97



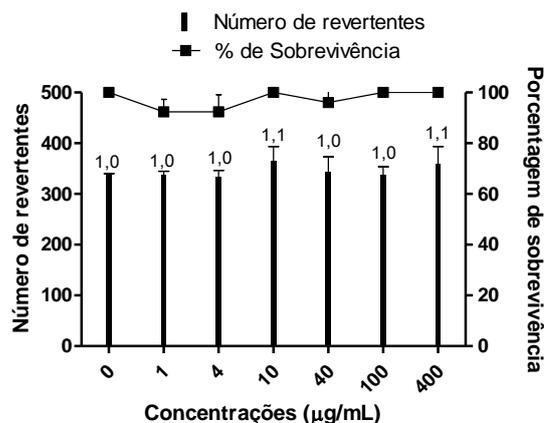
TA98



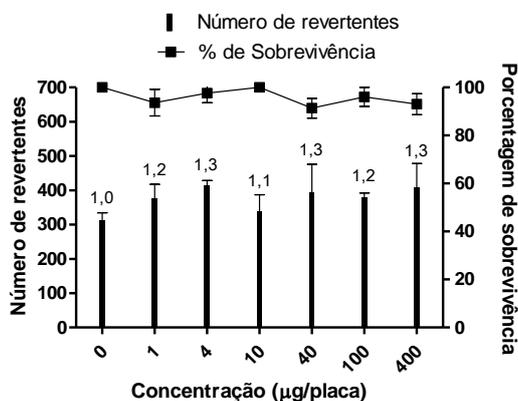
TA100



TA102



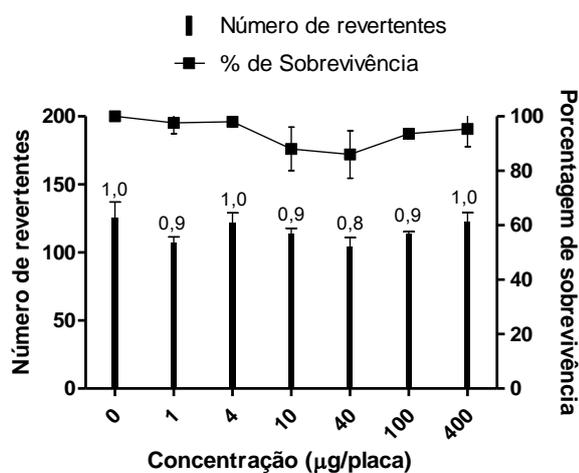
TA104



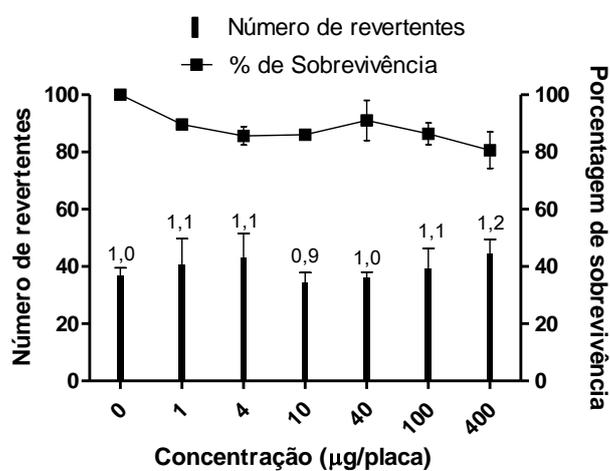
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (2,4); TA98 (36,0); TA100 (10,0); TA102 (5,0) e TA104 (3,5).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Holomitriopsis laevifolia* (B)

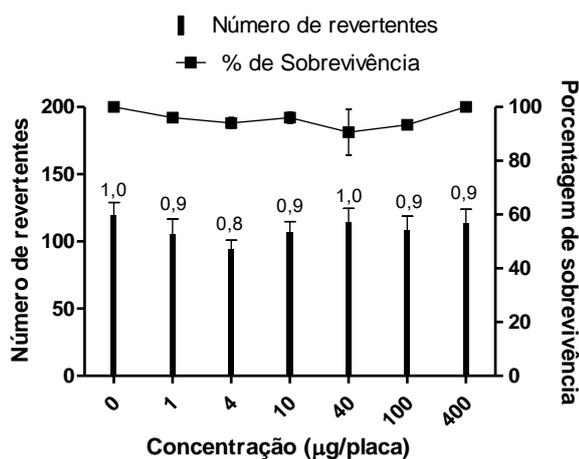
TA97



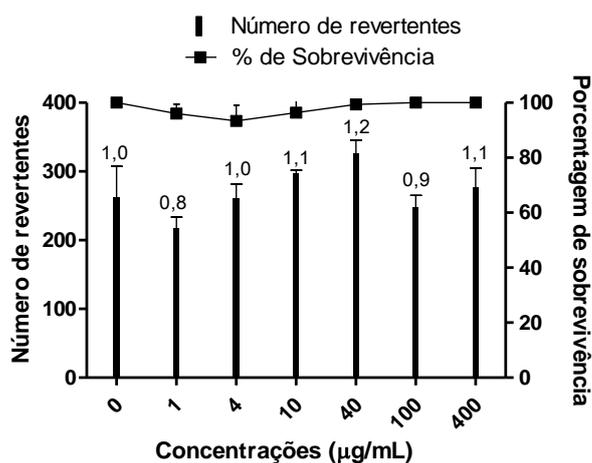
TA98



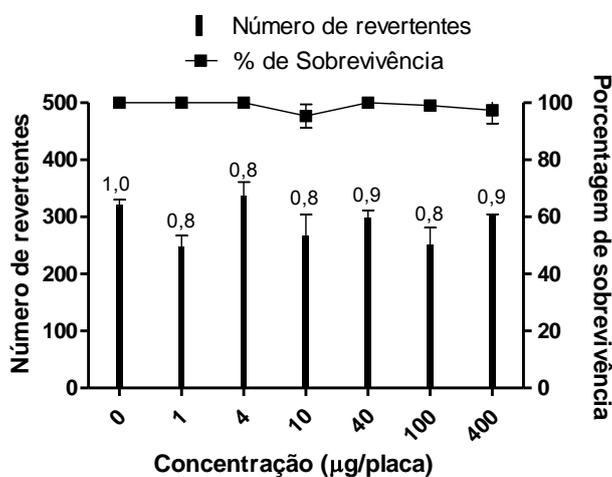
TA100



TA102



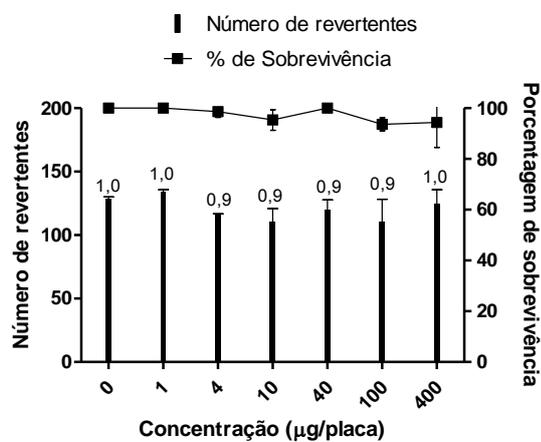
TA104



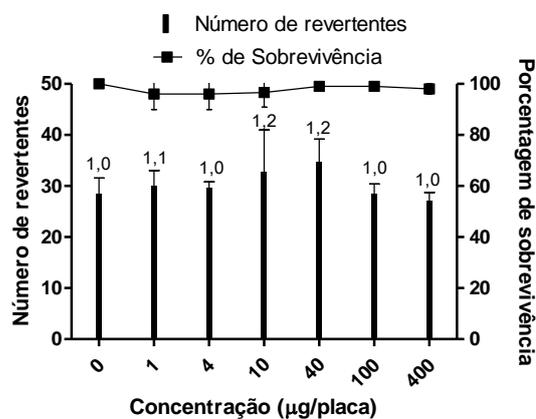
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (10,4); TA98 (23,0); TA100 (13,3); TA102 (2,5) e TA104 (4,4).

EXTRATO ETANÓLICO DE *Holomitriopsis laevifolia* (C)

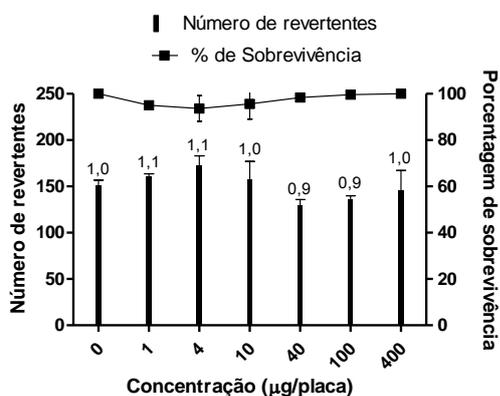
TA97



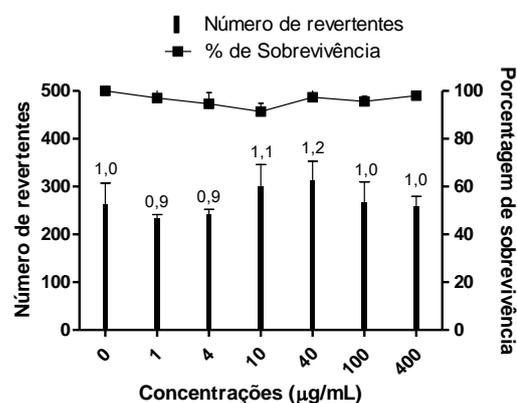
TA98



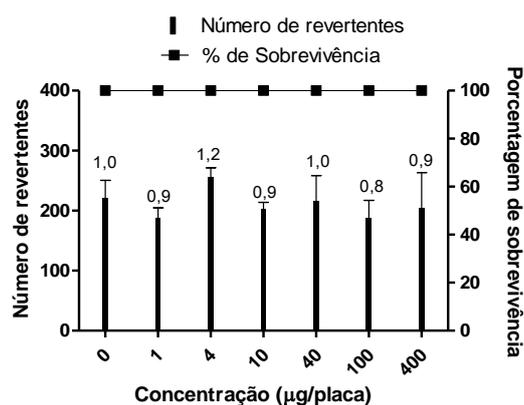
TA100



TA102



TA104



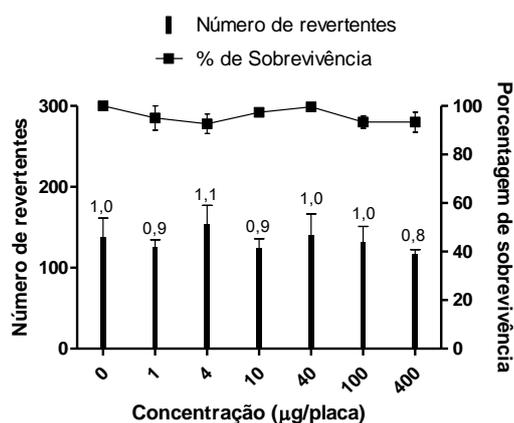
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (10,7); TA98 (28,8); TA100 (9,1); TA102 (2,5) e TA104 (5,9).

Legenda: extratos aquoso (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C).

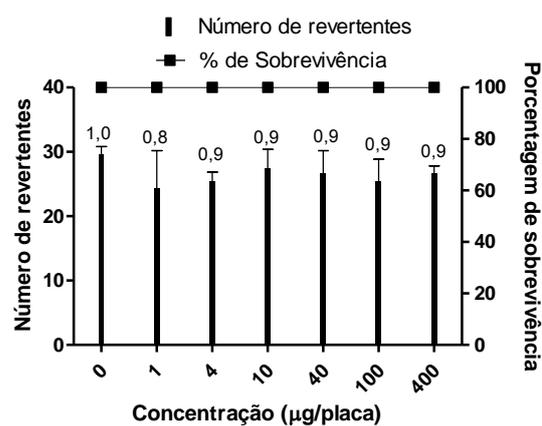
Gráfico 16. Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico, de *Leucobryum laevifolium* no ensaio de *Salmonella*/microsoma na presença de ativação metabólica por S9 mix, seguindo o protocolo de Pré-incubação.

EXTRATO METANÓLICO DE *Leucobryum laevifolium* (A)

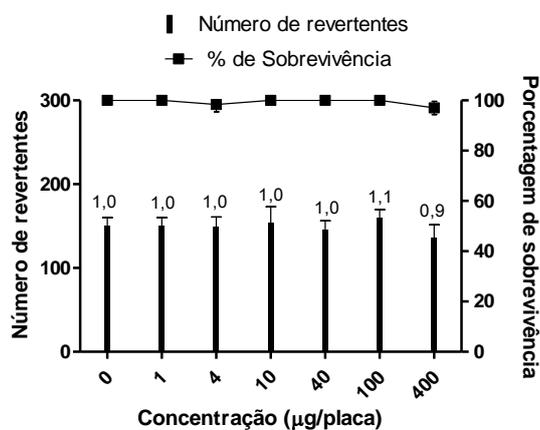
TA97



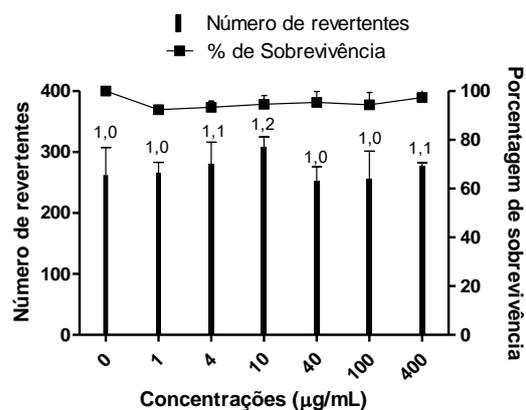
TA98



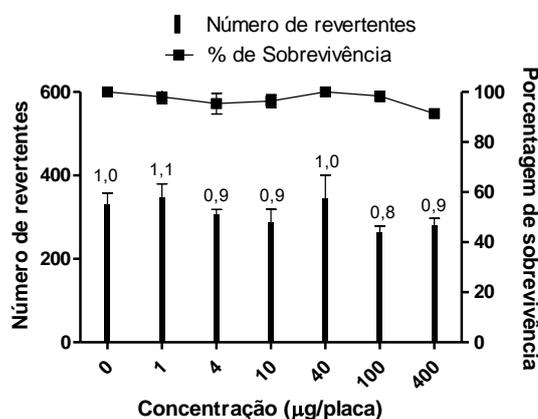
TA100



TA102



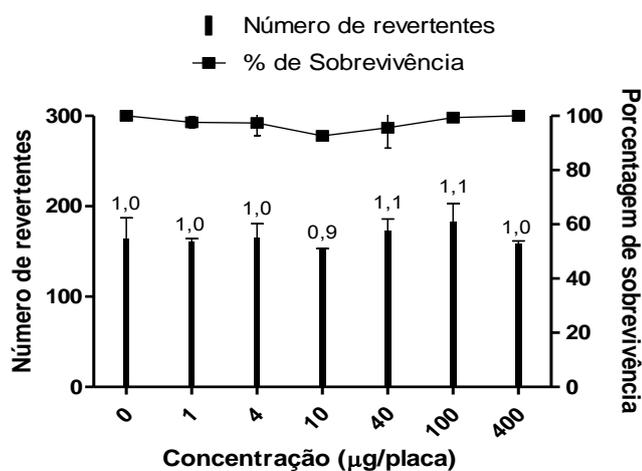
TA104



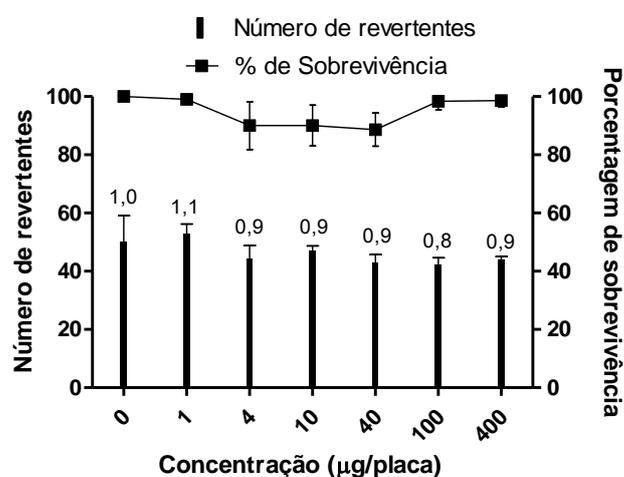
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (8,8); TA98 (26,0); TA100 (8,9); TA102 (2,5) e TA104 (3,5).

EXTRATO AQUOSO DE *Leucobryum laevifolium* (B)

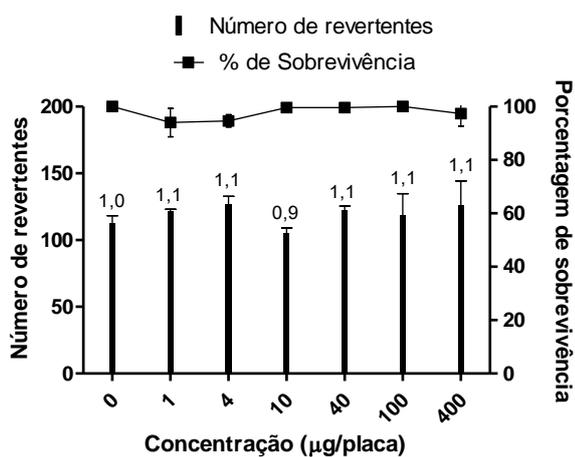
TA97



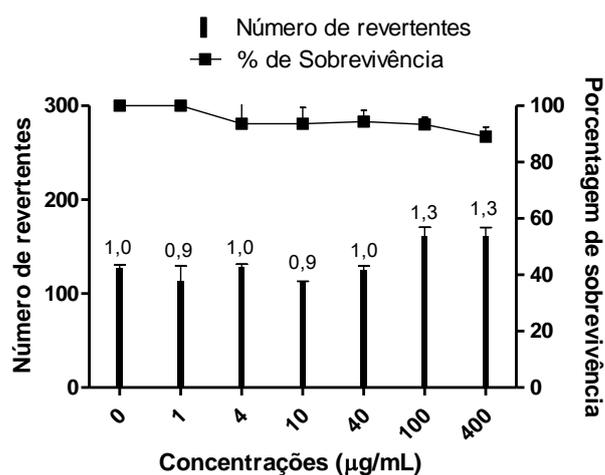
TA98



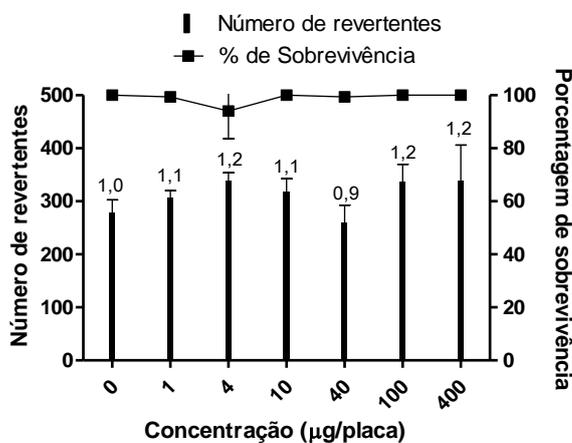
TA100



TA102



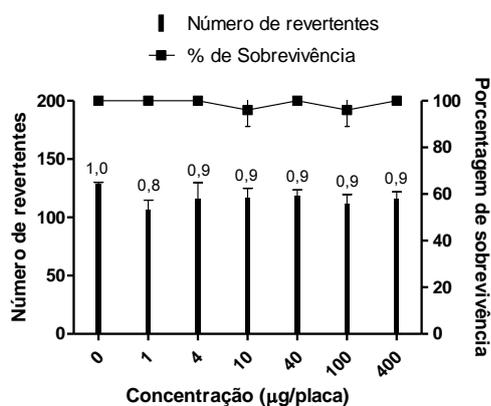
TA104



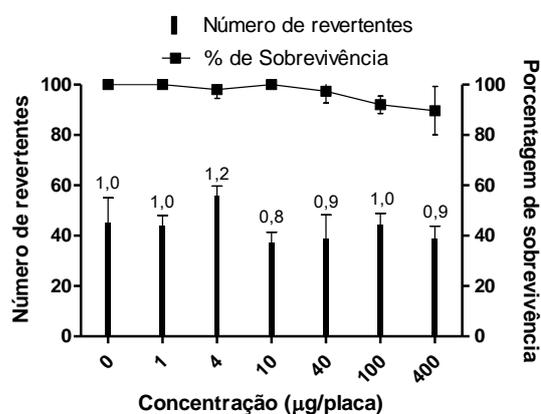
IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (7,4); TA98 (16,6); TA100 (10,2); TA102 (5,8) e TA104 (4,0).

EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Leucobryum laevifolium* (C)

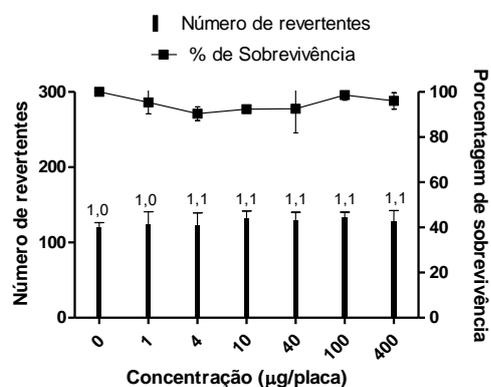
TA97



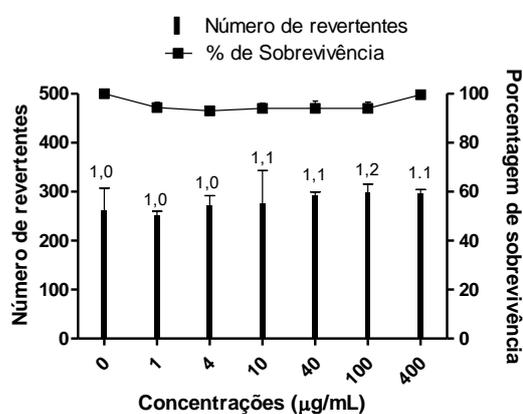
TA98



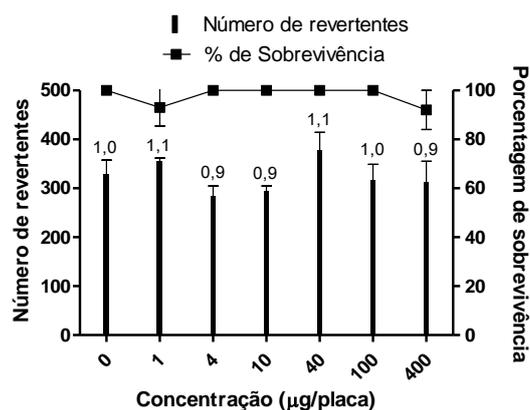
TA100



TA102



TA104



IM dos Controles positivos. Cepas TA97 (10,7); TA98 (18,6); TA100 (12,1); TA102 (2,5) e TA104 (3,5).

Legenda: extratos metanólico (A), aquoso (B) e hidroalcoólico (C).

Não foi observada indução mutagênica na presença dos extratos selecionados nas três espécies de musgos em um sistema metabolicamente ativo. Os extratos não induziram mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura, detectadas pelas cepas TA97 e TA98, e substituição de pares de base, detectadas pelas cepas TA100, TA102 e TA104. Todos os extratos analisados também não induziram respostas citotóxicas significativas nas mesmas condições.

Assim, a metabolização por S9 mix parece ter agido na inibição dos efeitos tóxicos dos extratos encontrados quando na ausência desse sistema, provavelmente pela metabolização ter desintoxicado os componentes responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano.

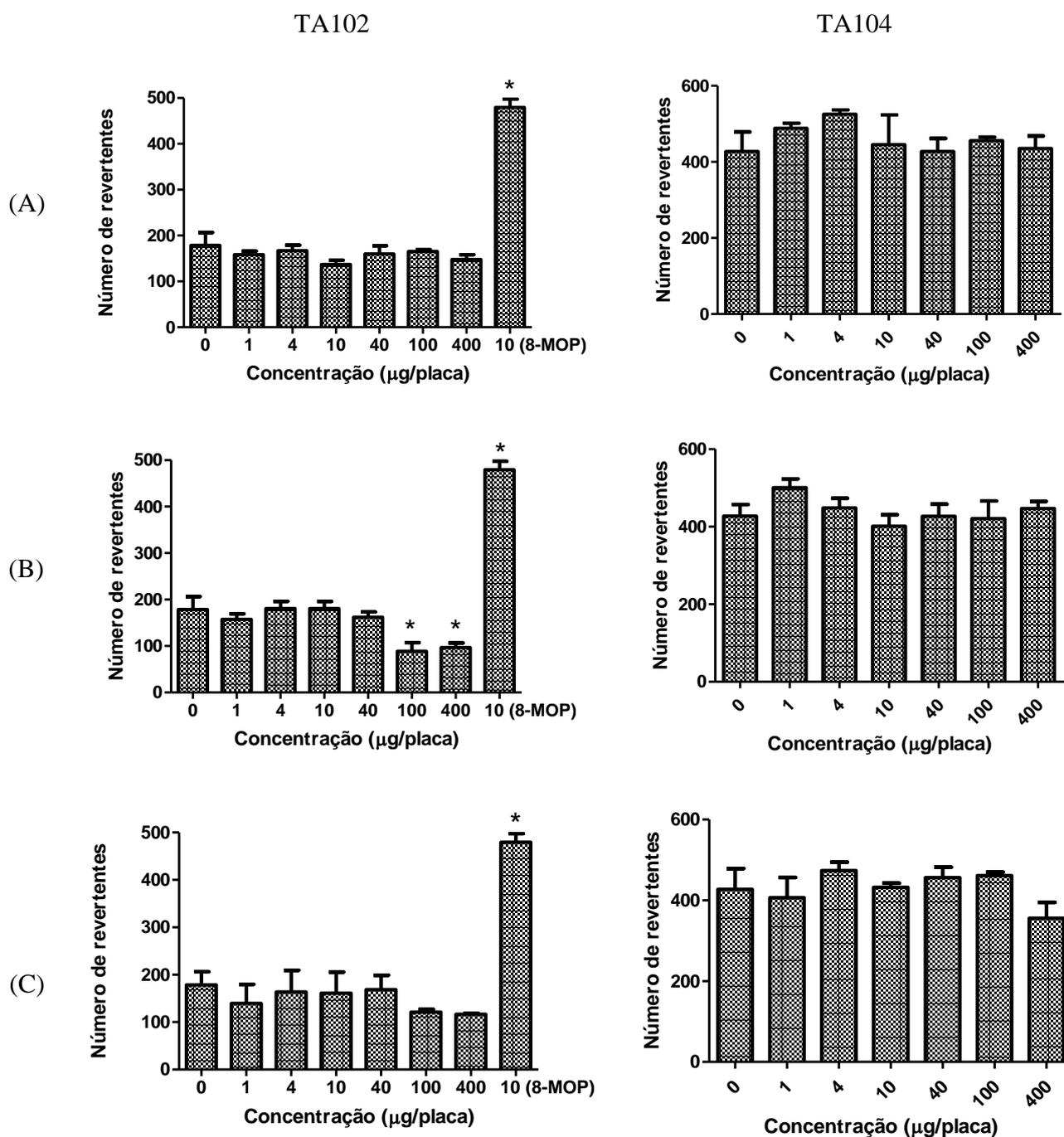
10.8 Fotomutagenicidade

O protocolo *Scientific Committee of Cosmetology, Commission of the European Communities* (SCC) (LOPRIENO, 1991) estabelece que o ensaio de fotomutagenicidade esteja incluído na bateria mínima de testes exigidos para avaliação de uma substância com potencial aplicação em cosméticos. Assim, este teste foi realizado sobre os extratos promissores em fotoproteção das três espécies de musgos estudadas.

Neste ensaio, a metabolização exógena não foi utilizada. GOCKE *et al.* (2000) afirmam que a adição de material com alto conteúdo de proteínas, como o S9 ao meio, pode produzir resultados errôneos, como a redução dos efeitos fotogenotóxicos ou fotocitotóxicos de um químico. Portanto, os autores, assim como órgãos internacionais como a SCC e OECD, afirmam que testes para fotogenotoxicidade necessitam serem executados apenas na ausência de metabolização exógena.

Os gráficos a seguir apresentam as relações doses-respostas dos extratos dos musgos *S. uncinata* (Gráfico 17), *H. laevifolia* (Gráfico 18) e *L. laevifolium* (Gráfico 19) a partir do ensaio de fotomutagenicidade, usado as cepas TA102 e TA104.

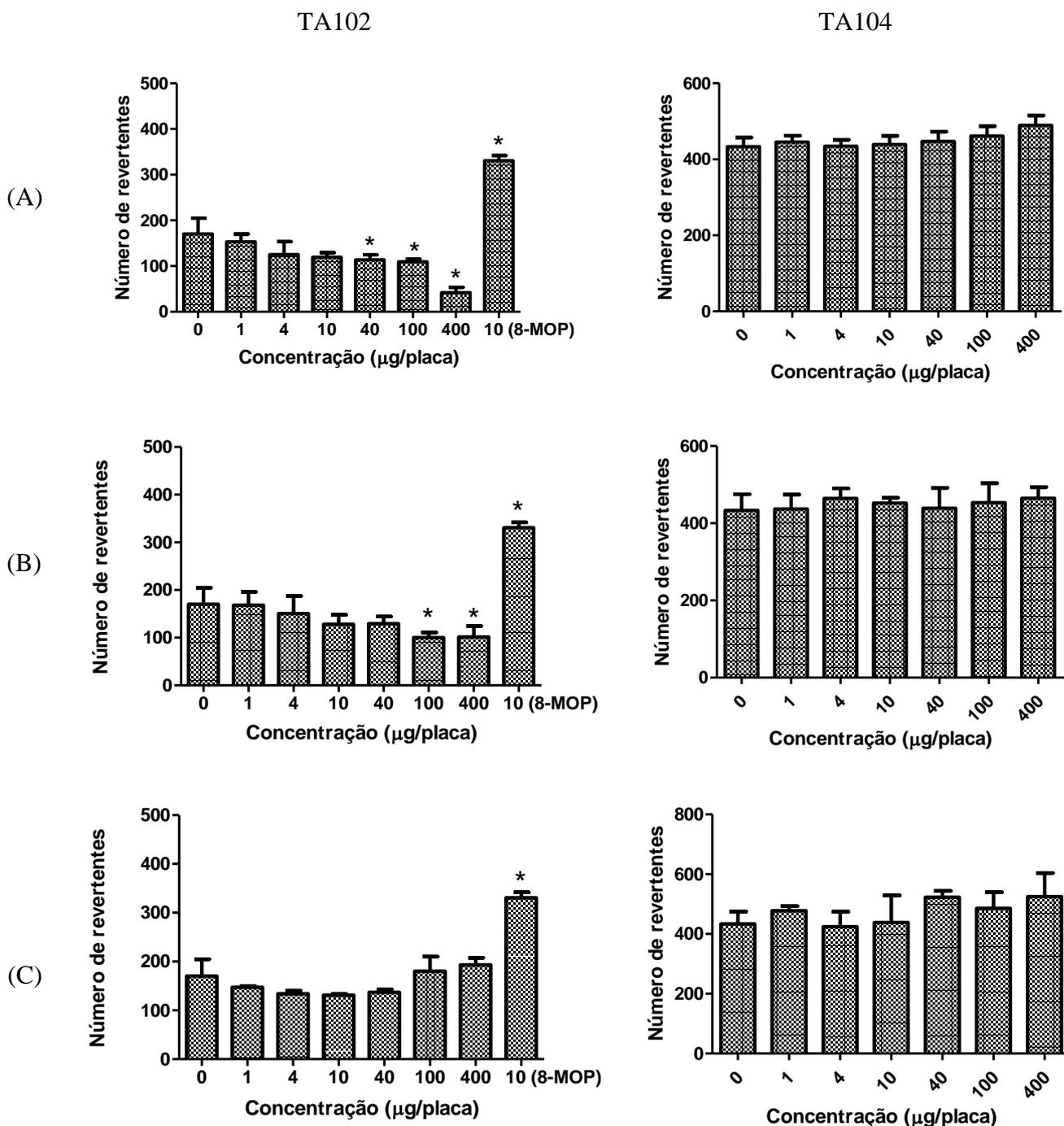
Gráfico 17 - Relações doses-respostas dos extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico de *Sanionia uncinata* sobre a fotomutagenicidade das cepas TA102 (Dose: 6,5 J/cm² UVA) e TA104 (Dose: 0,24 J/cm² UVA).



Diferenças estatisticamente significativas $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas. Respostas citotóxicas foram evidenciadas pelo crescimento de fundo das colônias (*background*), visualizado em microscópio com aumento de 40x.

Legenda: extratos metanólico (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C).

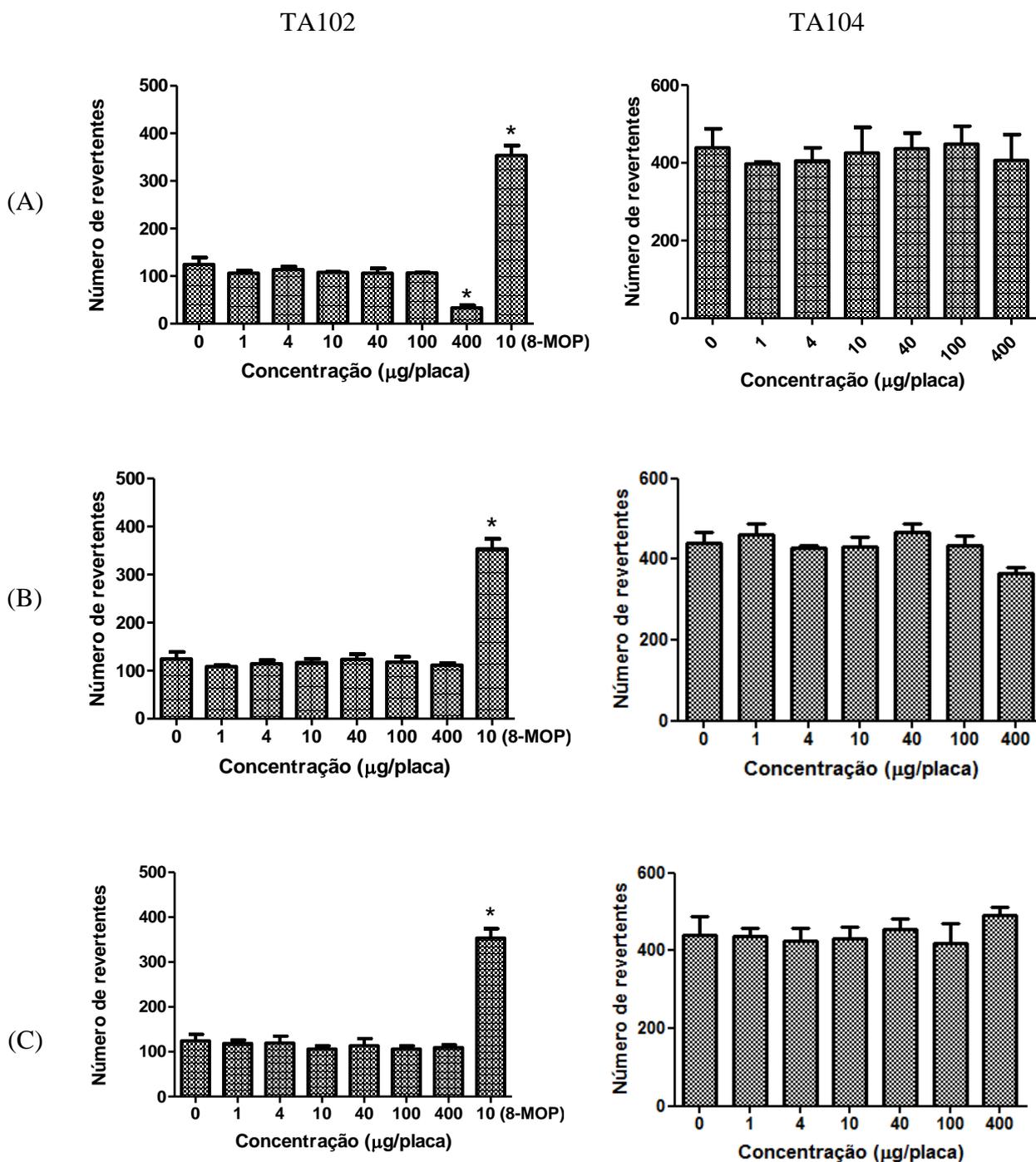
Grafico 18 - Relações doses-respostas dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *Holomitriopsis laevifolia* sobre a fotomutagenicidade das cepas TA102 (Dose: 6,5 J/cm² UVA) e TA104 (Dose: 0,24 J/cm² UVA).



Diferenças estatisticamente significativas $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas. Respostas citotóxicas foram evidenciadas pelo crescimento de fundo das colônias (*background*), visualizado em microscópio com aumento de 40x.

Legenda: Extratos aquoso (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C).

Gráfico 19 - Relações doses-respostas dos extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Leucobryum laevifolium* sobre a fotomutagenicidade das cepas TA102 (Dose: 6,5 J/cm² UVA) e TA104 (Dose: 0,24 J/cm² UVA).



Diferenças estatisticamente significativas $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas. Respostas citotóxicas foram evidenciadas pelo crescimento de fundo das colônias (*background*), visualizado em microscópio com aumento de 40x.

Legenda: extratos metanólico (A), aquoso (B) e hidroalcoólico (C).

A partir dos resultados acima observa-se que os EH (100 e 400 µg/placa) de *S. uncinata* (Gráfico 17 B); EA (40 a 400 µg/placa) e EH (100 e 400 µg/placa) de *H. laevifolia* (Gráfico 18 A e B) e EM (400 µg/placa) de *L. laevifolium* (Gráfico 19 A) induziram respostas fotocitotóxicas a dose de UVA de 6,5 J/cm² na cepa TA102. Essas respostas citotóxicas foram evidenciadas pelo crescimento de fundo das colônias (*background*), visualizado em microscópio com aumento de 40x. Demais extratos não induziram efeitos fotomutagênicos ou fotocitotóxicos para a cepa TA102, assim como para a cepa TA104 (0,24 J/cm²) nas três espécies de musgos. Condições de citotoxicidade não são interessantes para a avaliação de genotoxicidade de um agente, pois o modelo biológico marcador da atividade é comprometido. Deste modo, novo ensaio foi realizado em menores doses de radiação. Além disso, sob condições de menores doses de radiação, foi possível avaliar efeitos protetores dos extratos.

10.8.1 Anti-fotomutagenicidade

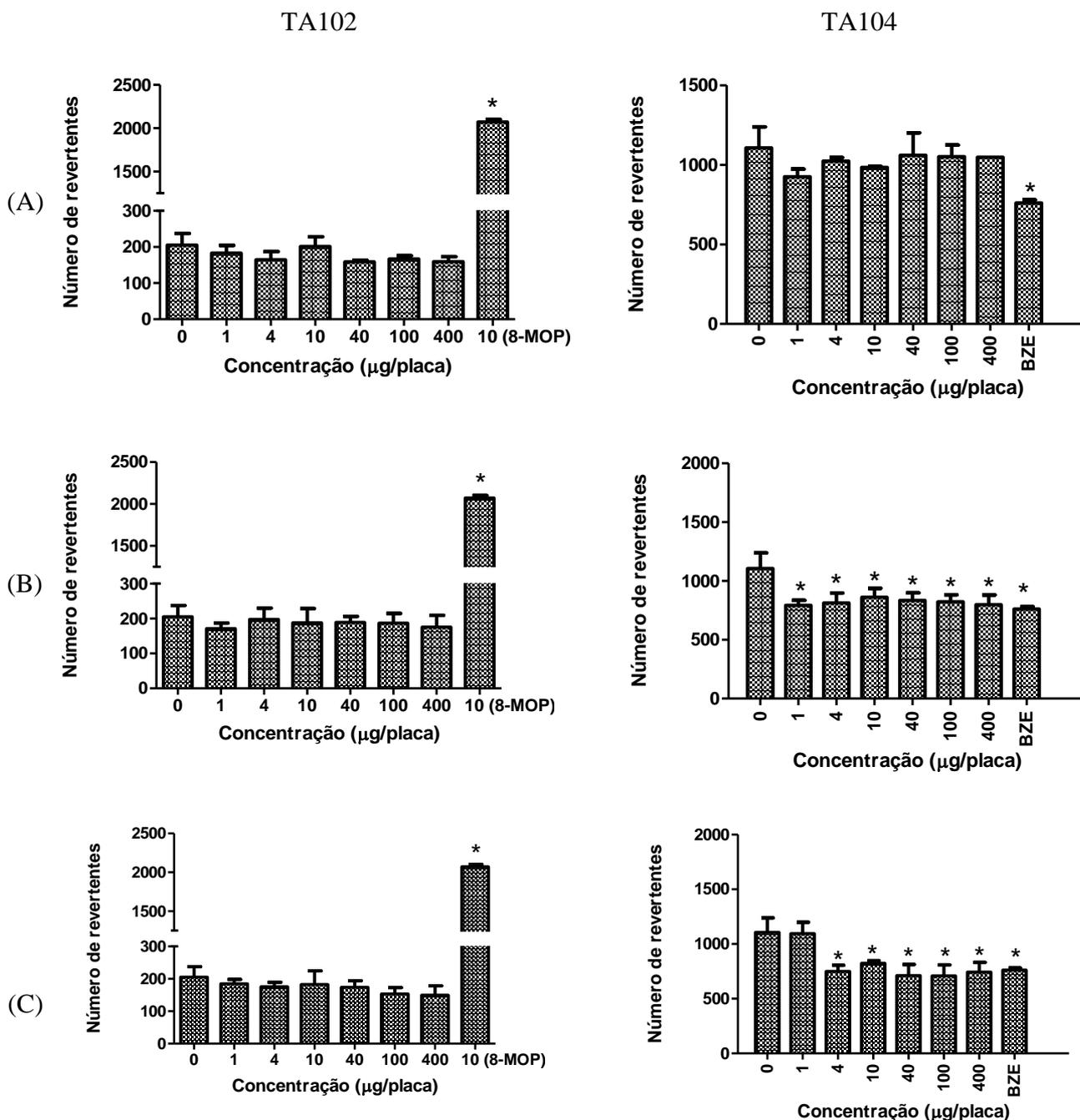
Os gráficos apresentam resultados do ensaio de anti-fotomutagenicidade com os extratos dos musgos *S. uncinata* (Gráfico 20), *H. laevifolia* (Gráfico 21) e *L. laevifolium* (Gráfico 22) em doses menores de radiação UVA, ou seja, 1,3 J/cm² para TA102 e 0,04 J/cm² para TA104.

Em menor dose de radiação UVA, a 1,3 J/cm² para a cepa TA102, quando há expressiva indução a mutação, visualizado pelo aumento significativo de número de colônias revertentes na presença de 8-MOP, observa-se que os extratos analisados não induziram aumento significativo de reversão nas três espécies de musgos (Gráficos 20, 21 e 22), sugerindo que tais extratos não induzem mutações do tipo transições/transversões, sob condições de alta indução fotomutagênica.

Para a cepa TA104, a 0,04 J/cm², quando ocorre uma indução maior de danos visualizado pelo aumento expressivo de colônias revertentes, comparado ao controle negativo, observa-se que de *S. uncinata* o EH (todas as concentrações testadas) e EE (a partir de 4 µg/placa) diminuíram significativamente o número de revertentes, comparada ao controle negativo (Gráfico 20). Em *H. laevifolia* os três extratos induziram significativa diminuição do número de colônias revertentes, comparado ao controle negativo (Gráfico 21). E em *L. laevifolium* tais efeitos foram observados no EM e EH, em todas as concentrações, e EA nas duas maiores concentrações (Gráfico 22). Esses resultados sugerem efeito fotoprotetor de todos os extratos, excetuando-se apenas EM de *S. uncinata*. Vale destacar ainda que a

fotoproteção pelo EA de *L. laevifolium* na maior concentração, difere estatisticamente do positivo (BZE).

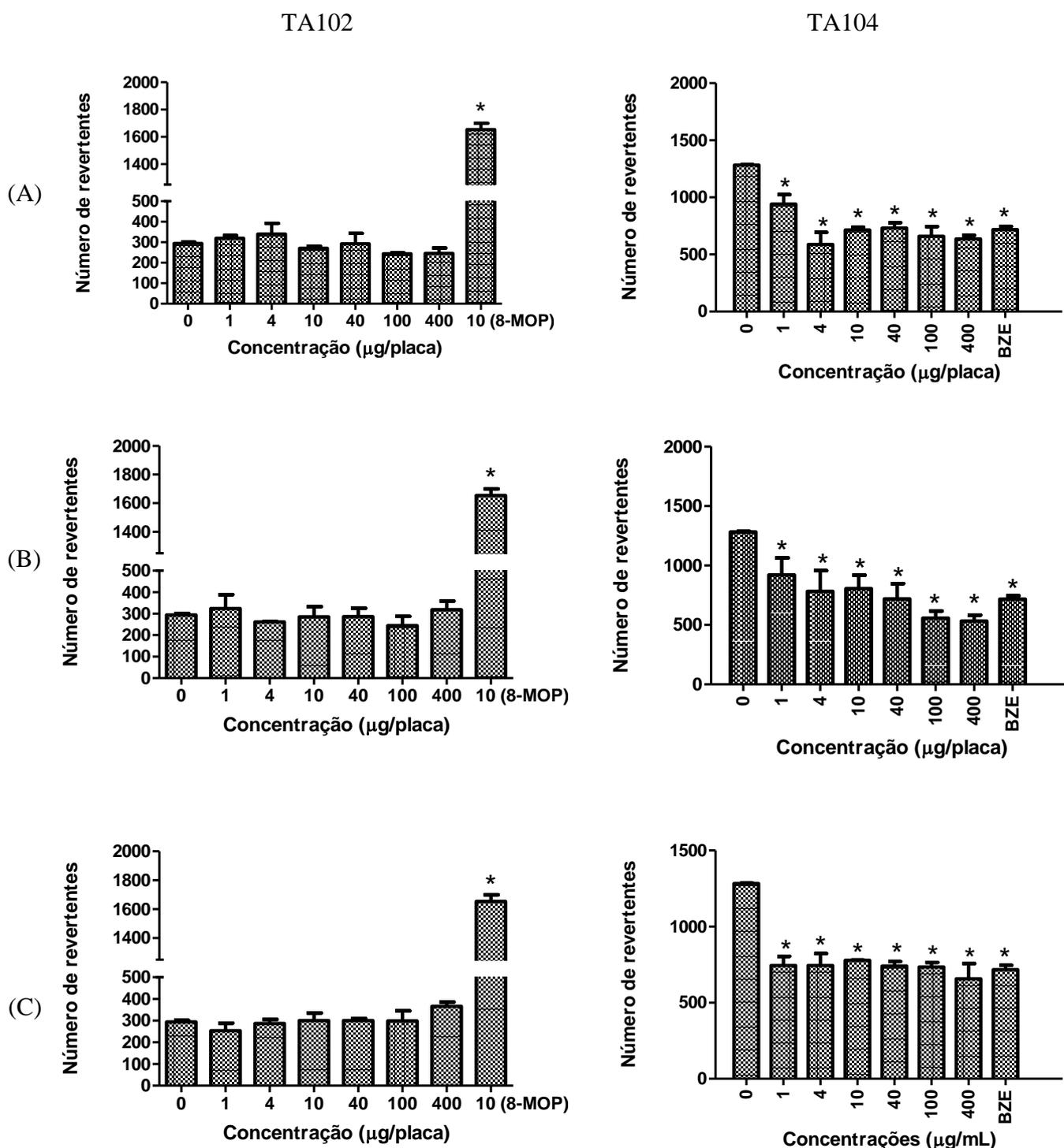
Gráfico 20 – Anti-fotomutagenicidade dos extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico de *Sanionia uncinata* utilizando as cepas TA102 (Dose: 1,3 J/cm² UVA) e TA104 (Dose: 0,04 J/cm² UVA).



Diferenças estatisticamente significativas $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

Legenda: extratos metanólico (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C).

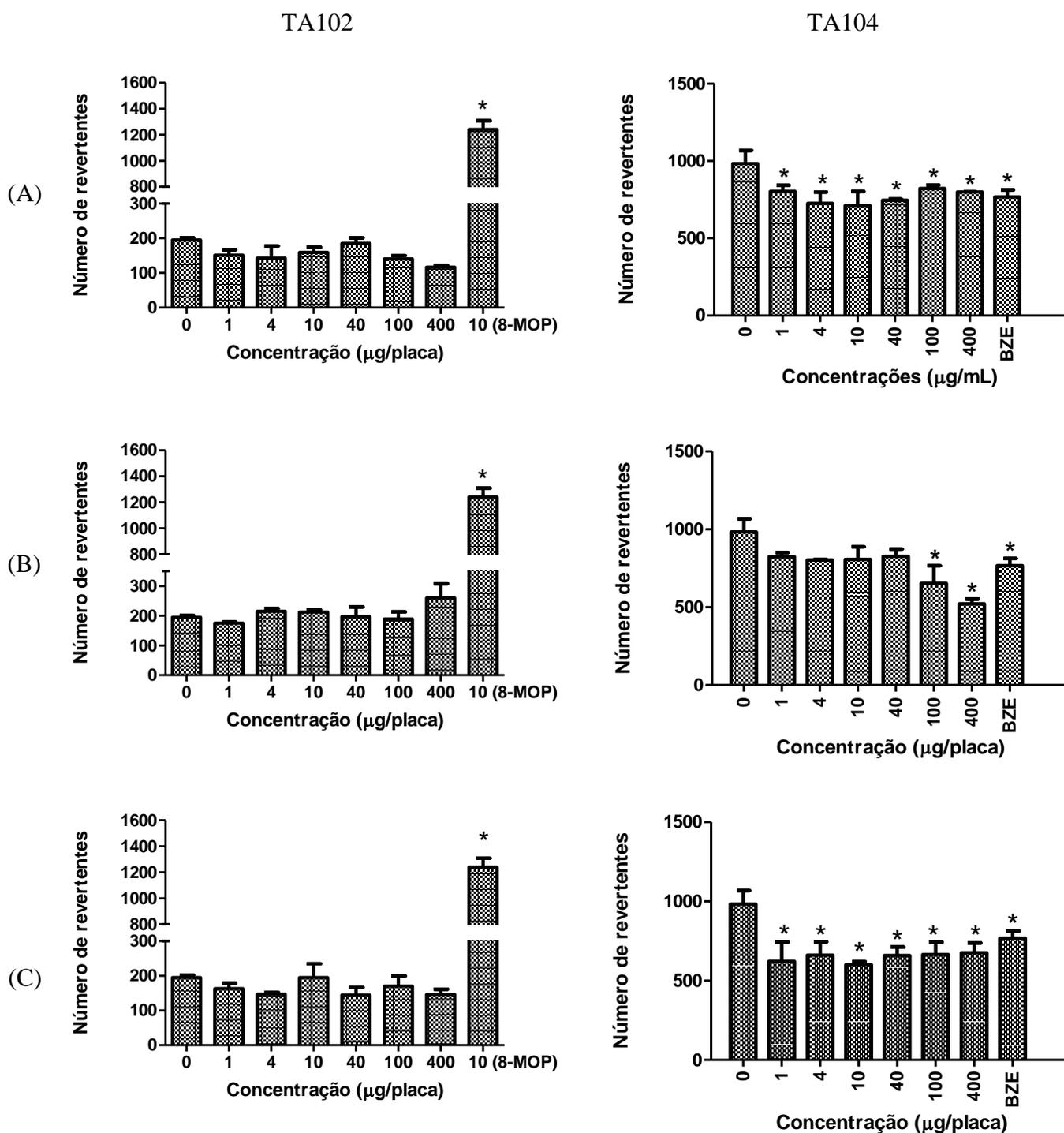
Gráfico 21 - Anti-fotomutagenicidade dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *Holomitriopsis laevifolia* utilizando as cepas TA102 (Dose: 1,3 J/cm² UVA) e TA104 (Dose: 0,04 J/cm² UVA).



Diferenças estatisticamente significativas $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

Legenda: extratos aquoso (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C).

Gráfico 22 - Anti-fotomutagenicidade dos extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Leucobryum laevifolium* utilizando as cepas TA102 (Dose: 1,3 J/cm² UVA) e TA104 (Dose: 0,04 J/cm² UVA).

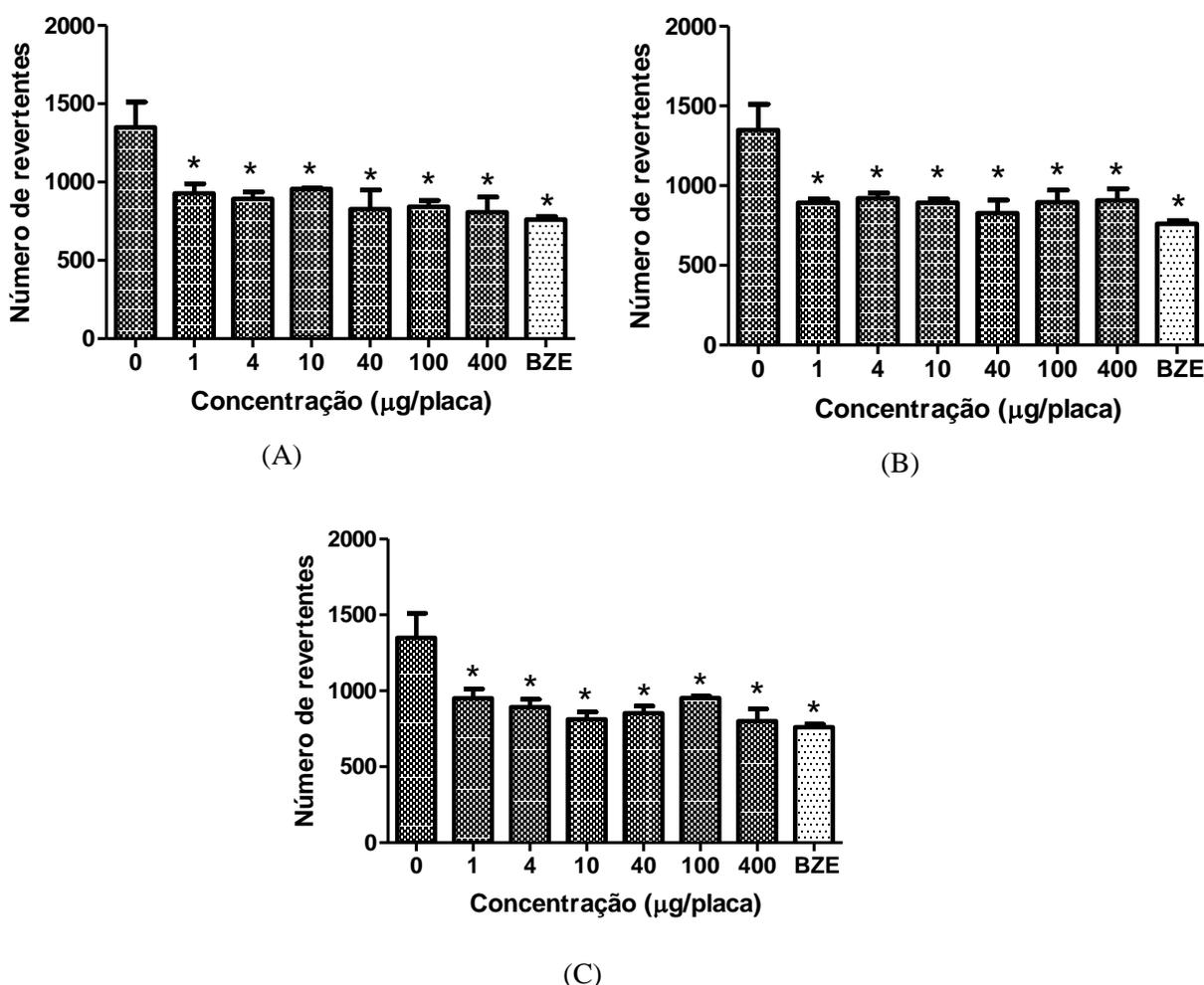


Diferenças estatisticamente significativas $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

Legenda: extratos metanólico (A), aquoso (B) e hidroalcoólico (C).

Uma vez que foram observados efeitos fotoprotetores dos extratos acima descritos para a cepa TA104, um novo ensaio foi realizado para esta cepa, porém na presença de BZE-3, com o propósito de avaliar possibilidades de efeitos sinérgicos. Assim, os gráficos a seguir apresentam relações doses-respostas dos extratos dos musgos *S. uncinata* (Gráfico 23), *H. laevifolia* (Gráfico 24) e *L. laevifolium* (Gráfico 25) na presença de BZE.

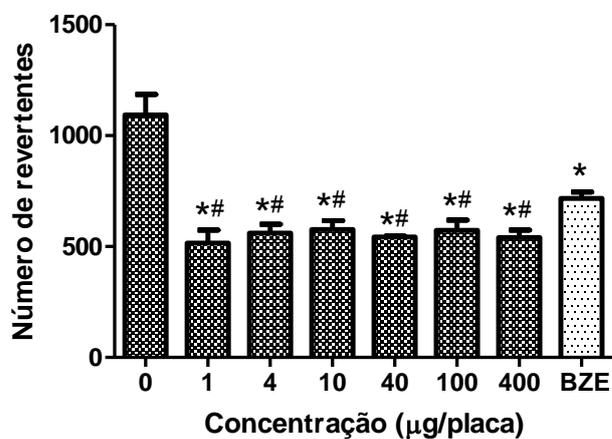
Gráfico 23 - Anti-fotomutagenicidade dos extratos metanólico, hidroalcoólico e etanólico (C) de *Sanionia uncinata* na presença de benzofenona-3 (BZE, 400 µg/placa) utilizando a cepa TA104 (Dose UVA: 0,04 J/cm²).



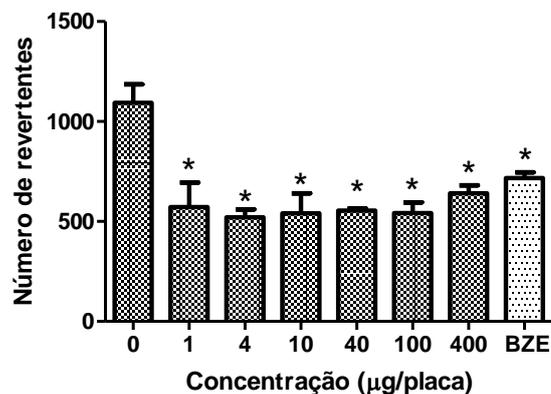
Diferenças estatisticamente significativas $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

Legenda: metanólico (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C).

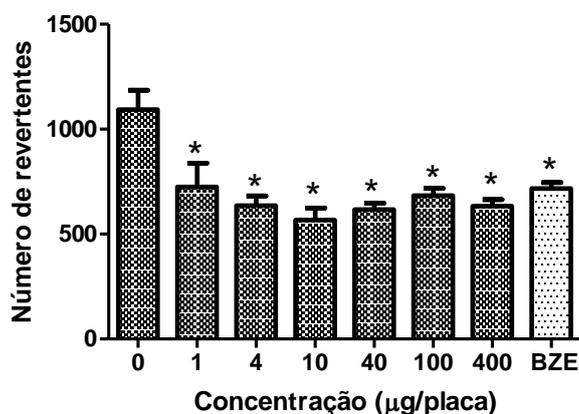
Gráfico 24 - Anti-fotomutagenicidade dos extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *Holomitriopsis laevifolia* na presença de benzofenona-3 (BZE, 400 µg/placa) utilizando a cepa TA104 (Dose UVA: 0,04 J/cm²).



(A)



(B)

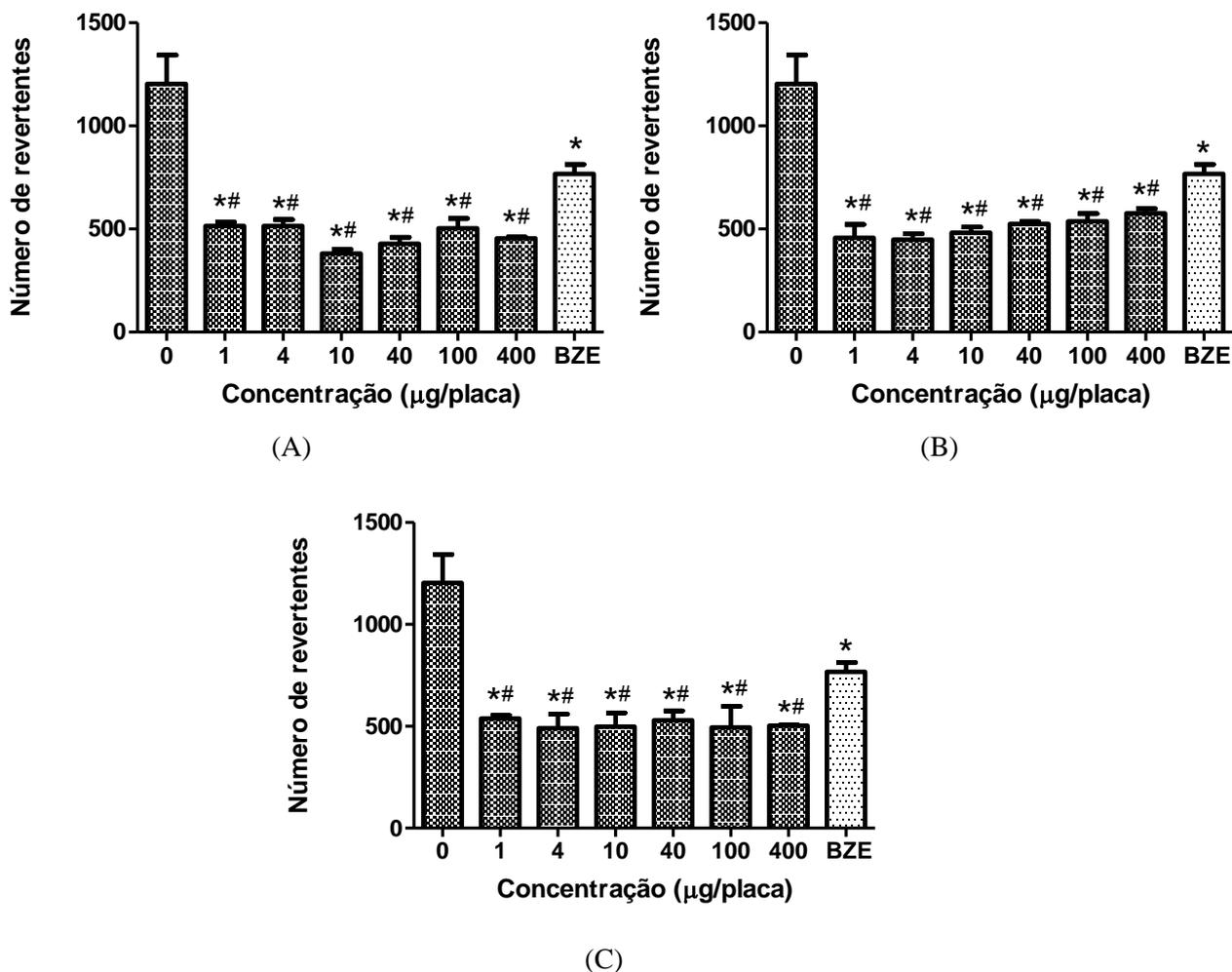


(C)

Diferenças estatisticamente significativas * $P < 0,05$ relativas ao controle negativo, # $P < 0,05$ relativas ao benzofenona-3, por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

Legenda: extratos aquoso (A), hidroalcoólico (B) e etanólico (C).

Gráfico 25 - Anti-fotomutagenicidade dos extratos metanólico, aquoso e hidroalcoólico de *Leucobryum laevifolium* na presença de benzofenona-3 (BZE, 400 µg/placa) utilizando a cepa TA104 (Dose UVA: 0,04 J/cm²).



Diferenças estatisticamente significativas * $P < 0,05$ relativas ao controle negativo, # $P < 0,05$ relativas ao benzofenona-3, por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas.

Legenda: extratos metanólico (A), aquoso (B) e hidroalcoólico (C).

Não foram observados efeitos protetores sinérgicos para os três extratos de *S. uncinata* analisados, pois não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre somente BZE os extratos na presença de BZE e (Gráfico 23). Por outro lado, tais efeitos são observados significativamente ($P < 0,05$) no EA em *H. laevifolia* (Gráfico 24 A) e nos três extratos analisados de *L. laevifolium* (Gráfico 25).

Os efeitos sinérgicos fotoprotetores aqui observados não tem correlação com os efeitos sinérgicos determinados *in vitro* (FPS) e, com isso, alguns extratos passaram a ser mais valorizados, como EA de *L. laevifolium*, pelo potencial efeito fotoprotetor, seja sinérgico ou não, apesar do FPS não ter sido promissor.

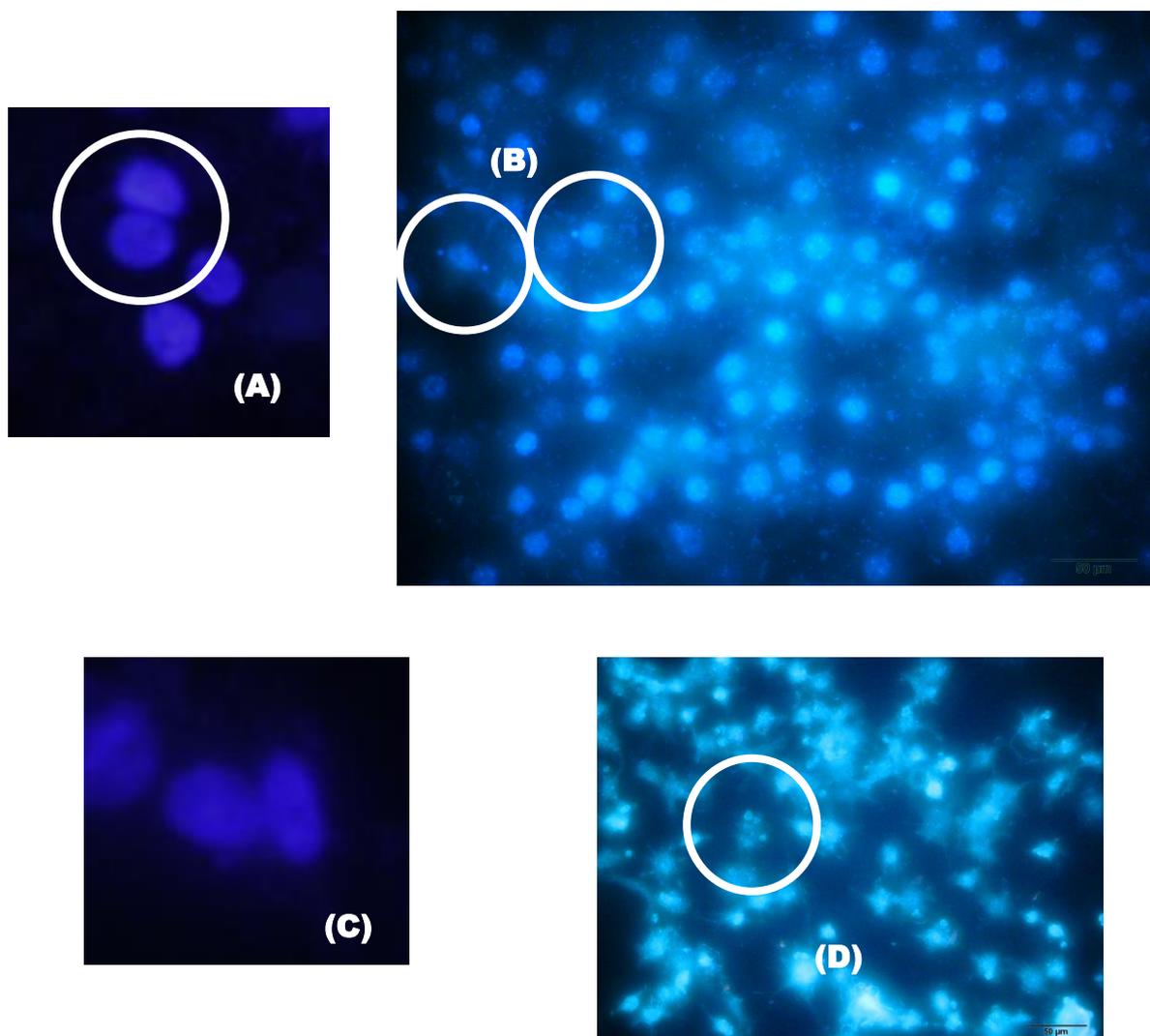
Não foi encontrada correlação entre a diminuição de número de colônias revertentes (efeito anti-fotomutagênico pelos extratos) com citotoxicidade na ausência de metabolização. Isso sugere que tal diminuição não resultou de efeito citotóxico (comparando com *Salmonella/microsoma*) ou fotocitotóxico (comparando com ensaio em maior dose de radiação) na cepa TA104.

Importante destacar que os efeitos protetores dos extratos das três espécies observados sinergicamente ou não, foram encontrados em baixíssimas concentrações, evidenciando que quaisquer que sejam os componentes ativos, basta uma pequena quantidade deles para ter efeitos fotoprotetores significativos.

10.9 Micronúcleo linhagens celulares estabelecidas

Para a realização do teste de MN, podem ser empregados diferentes tipos de células, como as células vegetais, humanas e de outros mamíferos, desde que sejam células capazes de se dividir ou que seja possível induzir a divisão, e que este processo seja conhecido (FENECH e CROTT, 2000). Abaixo seguem imagens dos resultados considerados positivos para os eventos analisados (Figura 12).

Figura 12 - Imagens representativas de células com as alterações avaliadas pelo ensaio do micronúcleo.



Legenda: (A) - Divisão celular; (B) - células micronucleadas; (C) - células em necrose; (D) - células em apoptose.

Fonte: O Autor, 2015.

O ensaio de micronúcleo foi realizado empregando três linhagens celulares:

A linhagem celular RAW 264.7 é proveniente de camundongos Balb/c, adultos machos e sua cultura foi estabelecida a partir do tumor ascídico, induzido pelo vírus da leucemia murina (RASCHK *et al.*, 1978). Para este estudo, esta linha celular foi usada como modelo de baixa atividade metabólica e que ainda conserva as características de macrófagos (GAVONI *et al.*, 1999).

A linhagem celular HegG2 foi originalmente estabelecida em 1979 por ADEN *et al.* (1979), isolada a partir de um hepatoblastoma primário humano. É um modelo de célula metabolicamente competente, pois mantém as atividades das enzimas de fase I (Citocromo

P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B E CYP2E1) e fase II (glutathiona-S-transferases, sulfotransferases, *N*-acetiltransferases e glucuranotransferases), amplamente responsáveis pela ativação e desintoxificação de carcinógenos reativos ao DNA (KNASMÜLLER *et al.*, 2004) e apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático. Além disso, manteve a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas do tecido hepático normal, podendo, portanto, realizar a biotransformação de pró-mutágenos (KNOWLES *et al.*, 1980; BOEHME *et al.*, 2010);

A linhagem de queratinócitos HaCat tem origem em células periféricas distantes de um melanoma da região torácica posterior de um homem e foi isolada espontaneamente (BOUKAMP *et al.*, 1988). É considerada um bom modelo para estudos de queratinócitos de pele e possui alto poder proliferativo (CALÒ *et al.*, 2014).

10.9.2 Micronúcleo em RAW264.7

Os índices mitóticos e percentuais de células micronucleadas (avaliação genotóxica) dos EM, EH e EE de *S. uncinata*; EA, EH e EE de *H. laevifolia*; e EM, EA e EH de *L. laevifolium* estão apresentados na Tabela 11. O ensaio permite ainda analisar outros marcadores de dados citogenéticos, entre eles necrose e apoptose (avaliação citotóxica), e a partir destes calcula-se o percentual de sobrevivência celular. Os resultados destes danos para os mesmos extratos estão apresentados na Tabela 12. Na Tabela 11 observa-se que todos os extratos das três espécies de musgos induziram diminuição significativa ($P < 0,05$) do índice mitótico. A indução foi mais baixa (detectada apenas em doses maiores) para EM e EE da espécie *S. uncinata*. Estes resultados sugerem efeito citostático induzido pelos extratos, ou seja, inibição de crescimento celular. Este fato pode estar induzindo falsos negativos para indução de células micronucleadas. Além disso, parece que ocorreu uma inibição para formação de células micronucleadas no EM e EA de *L. laevifolium*, sugerindo efeito protetor por esses extratos, pois número de células micronucleadas foi significativamente ($P < 0,05$) mais baixo que em presença de DMSO, e não ocorreram diferenças significativas em relação ao controle do ensaio (água).

Ademais, é possível observar um aumento significativo ($P < 0,05$) de células micronucleadas induzidas pelo EE em *S. uncinata* (1000 e 4000 µg/poço) e em *H. laevifolia* (4000 µg/poço) e pelo EH em *L. laevifolium* (1000 e 4000 µg/placa), sugerindo efeito genotóxico.

Na Tabela 12 observa-se indução significativa ($P < 0.05$) do percentual de células em apoptose induzida pelos EH em *S. uncinata* (nas três concentrações testadas), em *H. laevifolia* (4000 µg/poço) e em *L. laevifolium* (≥ 1000 µg/poço); EM de *S. uncinata* (4000 µg/poço); EA e EE de *H. laevifolia* (nas três concentrações testadas e 4000 µg/poço, respectivamente). Também foi observado aumento significativo de células necróticas induzidas pelos EM em *S. uncinata*, EE e EA de *H. laevifolia* e EH de *L. laevifolium*, a 4000 µg/poço (Tabela 12). Tais resultados de indução a morte celular foram confirmados pelo ensaio de viabilidade celular por WST-1, apresentados a seguir. Interessante observar que o EH de *H. laevifolia* nas concentrações de 400 e 1000 µg/poço apresentaram percentuais de necrose menores que em presença de DMSO. Assim parece que os extratos protegeram as células da formação de necrose pelo DMSO. Além disso, observou-se que os EM e EA, em todas as concentrações, e EH de *L. laevifolium* a partir de 1000 µg/poço, também apresentaram número de células necróticas menores que quando em presença de DMSO (controle negativo) e mesmo no controle do ensaio, também sugerindo efeito protetor pelos extratos.

DENARDIN *et al.* (2013) mostraram a relação entre compostos fenólicos e alteração na progressão do ciclo celular e/ou ativação de morte celular via apoptose e ou necrose. Esse trabalho sugere que compostos fenólicos induzem efeito antiproliferativo. A literatura aponta que muitos flavonóides alteram a expressão e atividade de numerosas enzimas envolvidas na regulação do ciclo celular em linhagens celulares cancerígenas (CASAGRANDE e DARBON, 2001; WANG *et al.*, 1999; RUSAK *et al.*, 2005). A propriedade de muitos flavonóides de alterar a expressão e atividades de enzimas envolvidas com regulação de apoptose pode ser a razão das propriedades citostáticas observadas neste estudo quando no ensaio de micronúcleo usando linhagem RAW 264.7. Por exemplo, os flavonóides miricetina, quercetina, isorhamnetina e kaempferol foram apontados como indutores de apoptose em células humanas de leucemia mielóide aguda (HL-60) (RUSAK *et al.*, 2005).

Importante destacar que a apoptose é um processo fisiológico normal e totalmente regulado, sendo benéficas, necessárias ao bom funcionamento e à sobrevivência do organismo. Ao contrário da necrose na apoptose a célula encolhe-se, destaca-se das células vizinhas e começa a apresentar bolhas em sua superfície. A membrana e as organelas mantêm sua estrutura intacta e não há alterações evidentes no citoplasma. O núcleo, entretanto, sofre grandes mudanças, por exemplo, a cromatina é condensada ao longo da membrana nuclear, depois forma esferas em formas crescentes. Subsequentemente a célula é fragmentada em estruturas membranosas compactas chamadas de corpos apoptóticos (EDINGER, 2004).

Já a necrose é a morte patológica. Quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, tais como temperaturas extremas, radiação, traumas, produtos tóxicos e falta de oxigênio. Neste caso, a célula normalmente incha e as organelas do citoplasma são danificadas, mas o núcleo não sofre alterações significativas. Tais lesões internas impedem o controle do equilíbrio interno. Água e alguns íons, normalmente bombeados para fora, fluem livremente para dentro da célula, que incha e rompe-se. Este rompimento libera no meio o conteúdo celular, rico em proteases e outras substâncias tóxicas (EDINGER, 2004).

Tabela 11. Avaliação genotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de macrófago da linhagem RAW 264.7.

	Solução-teste	$\mu\text{g/poço}$	Índice mitótico ^a \pm DP	% Células micronucleadas \pm DP
	DMSO	-	82,6 \pm 14,8	2,4 \pm 0,8
	CONTROLE	-	89,3 \pm 9,5	1,8 \pm 0,0
	MNNG	7,35x10 ⁻²	36,0 \pm 5,0* [#]	15,4 \pm 4,5* [#]
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	400	84,3 \pm 14,0	2,3 \pm 0,6
		1000	52,0 \pm 5,9* [#]	2,1 \pm 0,5
		4000	13,0 \pm 1,0* [#]	2,6 \pm 0,2
	EH	400	14,6 \pm 4,0* [#]	1,8 \pm 0,0
		1000	13,0 \pm 3,0* [#]	2,7 \pm 0,6
		4000	15,0 \pm 4,3* [#]	2,1 \pm 0,7
	EE	400	70,3 \pm 16,2	2,0 \pm 0,4
		1000	27,6 \pm 8,0* [#]	4,8 \pm 0,5* [#]
		4000	20,6 \pm 6,4* [#]	6,0 \pm 0,7* [#]
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	400	23,0 \pm 5,0* [#]	1,8 \pm 0,0
		1000	16,0 \pm 5,2* [#]	2,1 \pm 0,4
		4000	22,3 \pm 5,1* [#]	1,8 \pm 0,4
	EH	400	14,0 \pm 0,0* [#]	1,6 \pm 0,8
		1000	7,3 \pm 3,2* [#]	3,4 \pm 1,6
		4000	4,3 \pm 2,5* [#]	3,5 \pm 0,9
	EE	400	5,3 \pm 3,5* [#]	2,3 \pm 0,4
		1000	12,5 \pm 6,3* [#]	3,7 \pm 0,5
		4000	6,0 \pm 1,7* [#]	14,5 \pm 4,2* [#]
<i>Leucobryum laevifolium</i>	EM	400	42,3 \pm 12,7* [#]	0,8 \pm 0,2* [#]
		1000	25,6 \pm 2,8* [#]	0,4 \pm 0,0* [#]
		4000	24,0 \pm 4,0* [#]	0,7 \pm 0,2* [#]
	EA	400	47,3 \pm 1,1* [#]	0,80 \pm 0,0* [#]
		1000	45,3 \pm 1,5* [#]	0,67 \pm 0,1* [#]
		4000	47,3 \pm 9,4* [#]	0,62 \pm 0,2* [#]
	EH	400	11,0 \pm 4,5* [#]	4,0 \pm 0,8
		1000	7,6 \pm 0,5* [#]	6,7 \pm 1,0* [#]
		4000	6,6 \pm 2,5* [#]	10,7 \pm 1,4* [#]

Os dados estão expressos em média de percentagens \pm desvio padrão (DP). ^aÍndice mitótico por dois mil observações. Controle negativo foi dimetilsulfóxido (DMSO) e positivo 1-metil-2-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG). Diferenças estatisticamente significativas * $P < 0,05$ relativas ao DMSO e # $P < 0,05$ relativas ao controle do ensaio por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas. Legenda: EM: extrato metanólico, EA: extrato aquoso, EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Tabela 12. Avaliação citotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de macrófago da linhagem RAW 264.7.

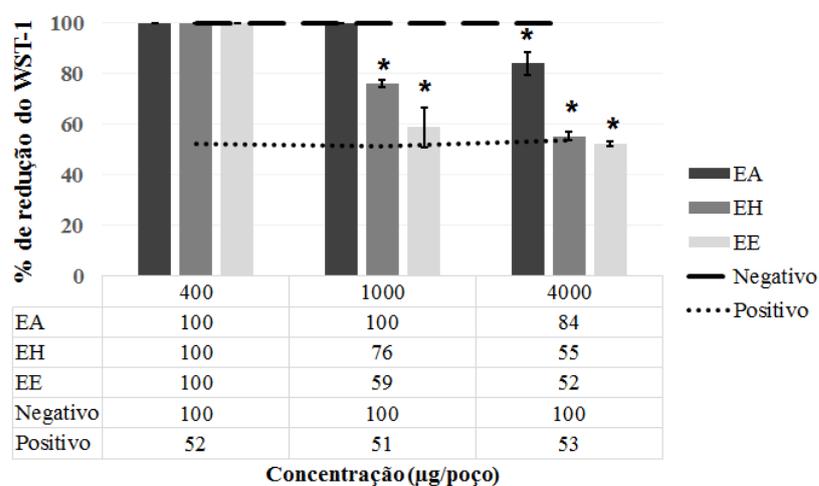
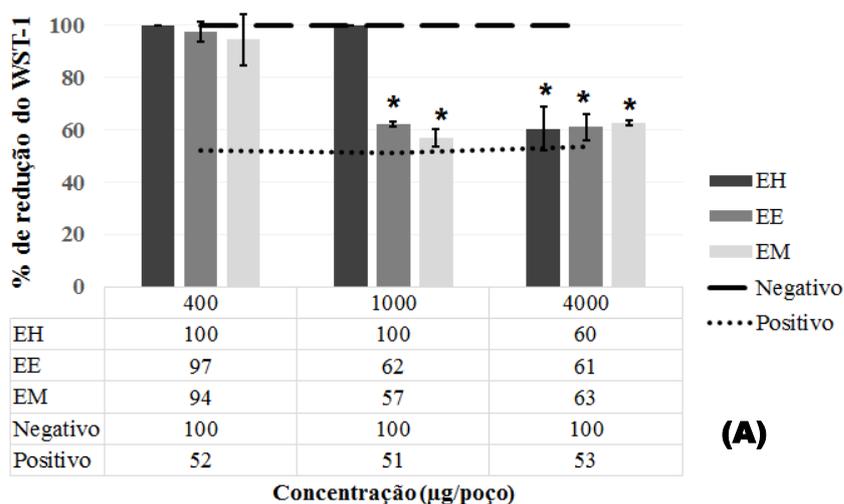
	Solução-teste	µg/poço	% Necrose ± DP	% Apoptose ± DP
	DMSO	-	1,3 ± 0,2 [#]	0,5 ± 0,1
	CONTROLE	-	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1
	MNNG	7,35x-10 ⁻²	5,0 ± 2,8* [#]	2,1 ± 1,2* [#]
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	400	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1
		1000	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,3
		4000	2,6 ± 0,7* [#]	1,6 ± 0,3* [#]
	EH	400	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,3* [#]
		1000	1,4 ± 0,5	1,6 ± 0,0* [#]
		4000	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,2* [#]
	EE	400	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
		1000	1,2 ± 0,0	0,6 ± 0,3
		4000	1,6 ± 0,5	0,2 ± 0,1
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	400	1,2 ± 0,0	1,4 ± 0,3* [#]
		1000	1,2 ± 0,1	1,6 ± 0,0* [#]
		4000	1,8 ± 0,2* [#]	1,5 ± 0,3* [#]
	EH	400	0,8 ± 0,1*	0,8 ± 0,1
		1000	0,9 ± 0,0*	0,6 ± 0,3
		4000	1,3 ± 0,7	3,0 ± 0,5* [#]
	EE	400	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,2
		1000	1,5 ± 0,9	0,3 ± 0,1
		4000	4,1 ± 0,8* [#]	1,6 ± 0,1* [#]
<i>Leucobryum laevifolium</i>	EM	400	0,3 ± 0,1* [#]	0,1 ± 0,0
		1000	0,2 ± 0,1* [#]	0,1 ± 0,0
		4000	0,1 ± 0,0* [#]	0,1 ± 0,4
	EA	400	0,3 ± 0,0* [#]	0,4 ± 0,1
		1000	0,3 ± 0,1* [#]	0,3 ± 0,0
		4000	0,4 ± 0,0* [#]	0,2 ± 0,1
	EH	400	1,8 ± 0,3	0,4 ± 0,1
		1000	2,3 ± 0,7* [#]	4,0 ± 0,5* [#]
		4000	2,6 ± 0,8* [#]	5,2 ± 0,2* [#]

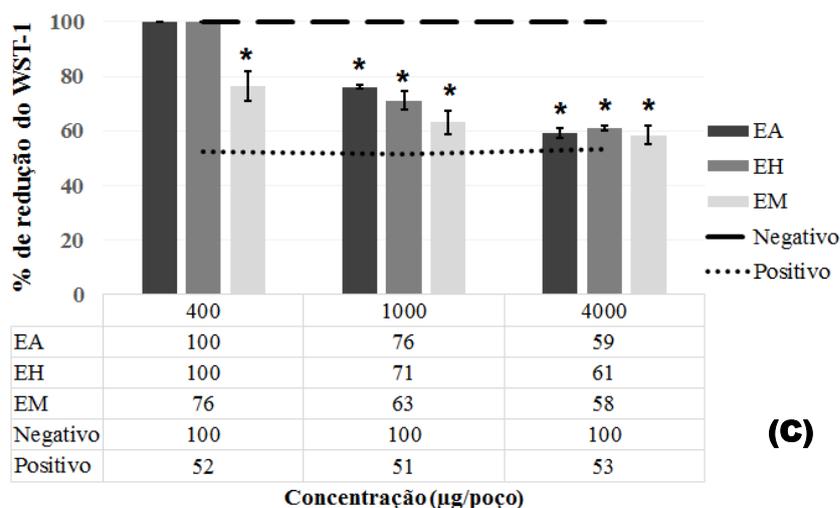
Os dados estão expressos em média de percentagens ± desvio padrão (DP). Controle negativo foi dimetilsulfóxido (DMSO) e positivo 1-metil-2-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG). Diferenças estatisticamente significativas * $P < 0,05$ relativas ao DMSO e # $P < 0,05$ relativas ao controle do ensaio por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas. Legenda: EM: extrato metanólico, EA: extrato aquoso, EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

10.9.2.1 Viabilidade celular de RAW264.7 por WST-1

Em paralelo aos ensaios de genotoxicidade foi realizado o ensaio de viabilidade celular com sal tetrazólio, WST-1, para investigar se as concentrações testadas no ensaio de micronúcleo induzem morte celular. Os resultados do teste de viabilidade utilizando a linhagem RAW264.7 na presença das espécies *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* estão apresentados no Gráfico 26.

Gráfico 26. Viabilidade celular da linhagem celular RAW264.7, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* após 3 horas de incubação.





Estão representadas médias e desvios padrão. Diferenças estatisticamente significativas.

* $P < 0,05$ relativas ao controle negativo por ANOVA e Tukey's HSD estão indicadas. Legenda: *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C).

EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico

A partir do Gráfico 26, observa-se que o EH de *S. uncinata* e EA de *H. laevifolia* induziram morte celular significativa ($P < 0,05$) de RAW 264.7 comparado ao controle negativo, após 3 h de incubação, na maior concentração testada (4000 µg/poço). Este mesmo efeito foi observado para os demais extratos analisados das três espécies de musgos a partir da concentração 1000 µg/poço. Apenas o EM de *L. laevifolium* induziu efeito citotóxico significativo a partir de 400 µg/poço, sugerindo que componentes tóxicos destes extratos para a célula estão mais proeminentes.

Os tratamentos de 24 e 48 h não foram realizados, pois já foram observadas induções de morte celular a partir do tratamento de 3 h. Em todos os ensaios os brancos de reações foram descontados.

10.9.3 Micronúcleo em HepG2

O índice mitótico e percentual de células micronucleadas (avaliação genotóxica) dos EM, EH e EE de *S. uncinata*, EA, EH e EE de *H. laevifolia* e EM, EA e EH e de *L. laevifolium* estão apresentados na Tabela 13.

Na Tabela 13 pode-se observar que os extratos das três espécies de musgos não induziram respostas positivas significativas para aumento de frequência de células micronucleadas, apenas houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o EH de *S. uncinata* na maior concentração e o controle do ensaio (água). O EE de *S. uncinata* induziu aumento de

células necróticas ($P < 0,05$) a partir de 1000 $\mu\text{g/placa}$ em relação ao controle do ensaio e o EM em todas as concentrações, sendo 400 e 1000 $\mu\text{g/placa}$ em relação ao controle do ensaio e 4000 $\mu\text{g/placa}$ em relação ao DMSO e ao controle do ensaio. Demais extratos não induziram respostas citotóxicas significativas, pois não foi observado aumento do percentual de células em apoptose e necrose (Tabela 14). Tais resultados foram confirmados pelo ensaio de viabilidade celular por WST-1, apresentados a seguir.

A ausência de diferenças estatisticamente significativas na frequência de células micronucleadas indica que, sob as condições ensaiadas neste estudo, a exposição aos agentes-teste não resultou em aumento significativo de danos cromossômicos na população de HepG2. Aparentemente, a avaliação do teste de micronúcleo usando uma célula com capacidade de metabolismo diminuiu os efeitos genotóxicos e citotóxicos observados quando na presença de uma célula com baixa capacidade de metabolização como RAW 264.7. As moléculas que induziram efeito no aumento da frequência de micronúcleos, assim como aumento no percentual de necrose e apoptose na célula de macrófago, parecem ter sido desintoxicadas em sistema metabolicamente competente, como na célula HepG2. O mesmo efeito de desintoxificação em um sistema metabolicamente ativo foi também observado em modelo bacteriano (ensaio de *Salmonella*/microssoma), no qual foram encontradas diversas respostas citotóxicas inibidas com a exposição ao sistema S9 de metabolização exógena.

Tabela 13. Avaliação genotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de macrófago da linhagem HepG2.

	Solução-teste	µg/poço	Índice mitótico^a ± DP	% Células micronucleadas ± DP
	DMSO	-	106,3 ± 26,1	0,7 ± 0,0
	CONTROLE	-	116,6 ± 5,7	0,4 ± 0,1
	MNNG	7,35x10 ⁻²	118,4 ± 7,2	7,8 ± 1,3* [#]
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	400	74,6 ± 13,5	0,5 ± 0,0
		1000	84,6 ± 6,1	0,7 ± 0,1
		4000	104,0 ± 18,6	0,7 ± 0,1
	EH	400	124,3 ± 38,4	0,5 ± 0,1
		1000	124,6 ± 14,0	0,5 ± 0,1
		4000	131,0 ± 3,0	0,9 ± 0,2 [#]
	EE	400	128,0 ± 11,5	0,6 ± 0,0
		1000	103,3 ± 23,1	0,6 ± 0,3
		4000	102,0 ± 19,1	0,5 ± 0,1
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	400	81,3 ± 7,0	0,9 ± 0,0
		1000	73,0 ± 18,3	0,6 ± 0,0
		4000	135,6 ± 32,6	0,8 ± 0,2
	EH	400	138,0 ± 44,4	0,5 ± 0,1
		1000	138,0 ± 12,4	0,5 ± 0,0
		4000	137,0 ± 31,1	0,6 ± 0,1
	EE	400	98,6 ± 27,6	0,6 ± 0,2
		1000	104,6 ± 23,1	0,8 ± 0,3
		4000	92,0 ± 3,6	0,7 ± 0,1
<i>Leucobryum laevifolium</i>	EM	400	114,6 ± 10,6	0,7 ± 0,1
		1000	109,6 ± 30,6	0,6 ± 0,2
		4000	100,0 ± 12,0	0,6 ± 0,1
	EA	400	107,0 ± 1,0	0,5 ± 0,0
		1000	106,3 ± 1,5	0,5 ± 0,0
		4000	100,6 ± 14,5	0,5 ± 0,1
	EH	400	102,2 ± 24,6	0,5 ± 0,1
		1000	138,0 ± 37,9	0,7 ± 0,3
		4000	76,3 ± 9,0	0,6 ± 0,0

Rodapé: vide Tabela 11.

O percentual de células em necrose e apoptose (avaliação citotóxica), assim como os valores de sobrevivência celular estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Avaliação citotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de macrófago da linhagem HepG2.

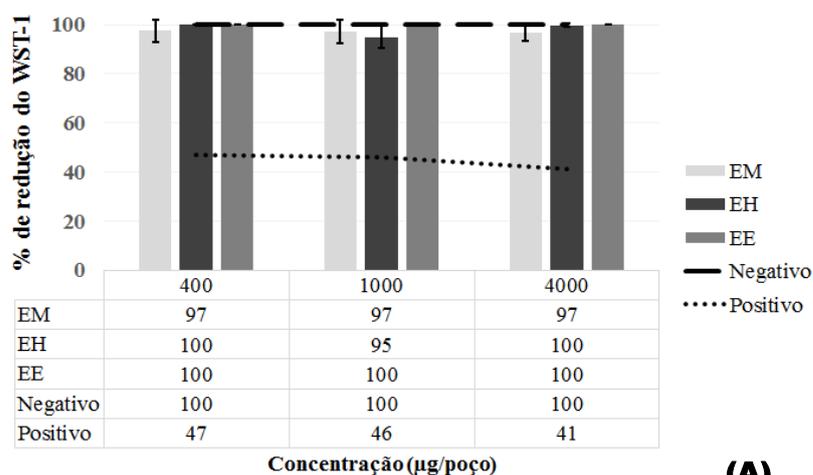
Solução-teste		$\mu\text{g/poço}$	% Necrose \pm DP	% Apoptose \pm DP
DMSO		-	$1,1 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,0$
CONTROLE			$0,6 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$
MNNG		$7,35 \times 10^{-2}$	$8,7 \pm 0,4^{* \#}$	$0,3 \pm 0,0^{* \#}$
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	400	$1,6 \pm 0,2^{\#}$	$0,1 \pm 0,0$
		1000	$1,6 \pm 0,1^{\#}$	$0,1 \pm 0,0$
		4000	$2,1 \pm 0,4^{* \#}$	$0,1 \pm 0,0$
	EH	400	$0,7 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$
		1000	$0,8 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$
		4000	$0,8 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$
	EE	400	$0,9 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$
		1000	$1,6 \pm 0,5^{\#}$	$0,0 \pm 0,0$
		4000	$1,5 \pm 0,1^{\#}$	$0,0 \pm 0,0$
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	400	$0,7 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,0$
		1000	$0,7 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$
		4000	$0,8 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,1$
	EH	400	$0,8 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,0$
		100	$0,8 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$
		4000	$0,8 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,2$
	EE	400	$0,8 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$
		1000	$0,7 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$
		4000	$0,7 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$
<i>Leucobryum laevifolium</i>	EM	400	$0,6 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$
		1000	$0,7 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$
		4000	$0,7 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,1$
	EA	400	$0,6 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,1$
		1000	$0,7 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$
		4000	$0,8 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$
	EH	400	$0,7 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$
		1000	$0,6 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,0$
		4000	$0,7 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,1$

Rodapé: vide Tabela 12.

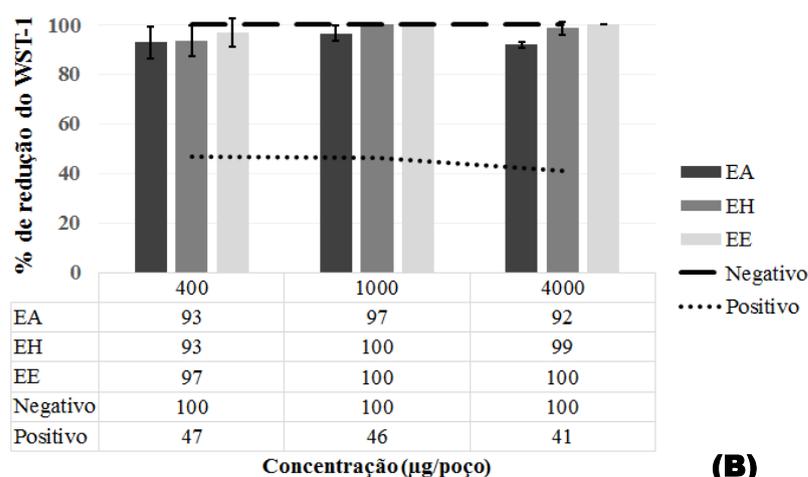
10.9.3.1 Viabilidade celular de HepG2 por WST-1

Os resultados do teste de viabilidade utilizando a linhagem HepG2 na presença das espécies *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* com tratamento de 3 h (Gráfico 27), 24 h (Gráfico 28) e 48 h (Gráfico 29) estão apresentados a seguir.

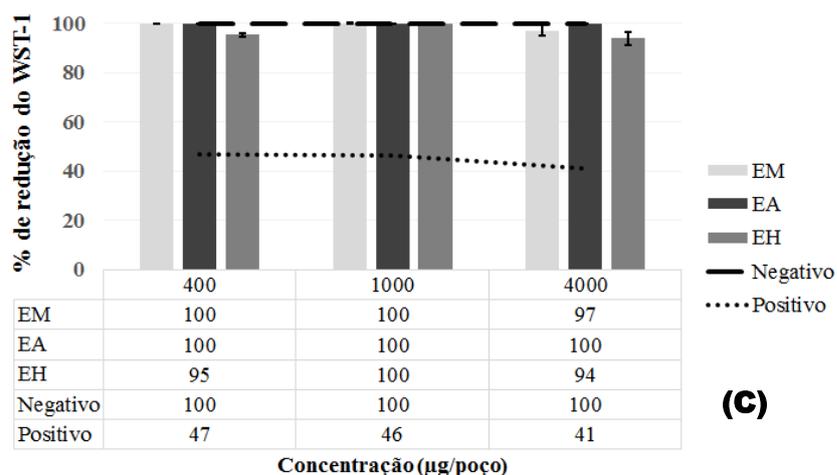
Gráfico 27. Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* após 3 horas de incubação.



(A)



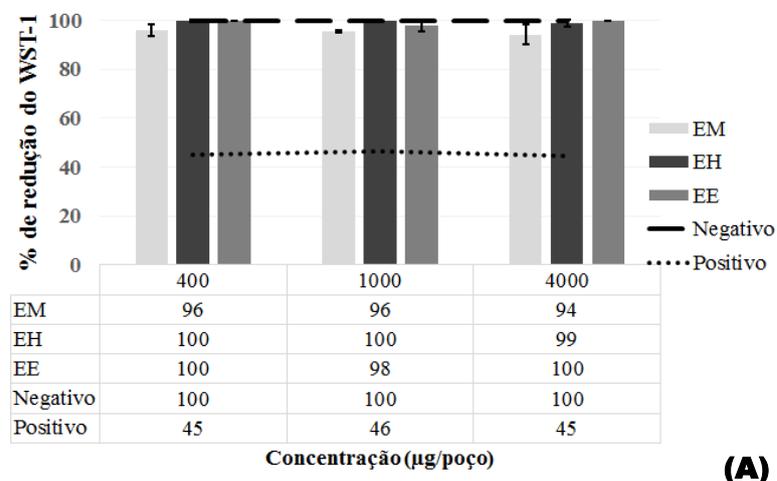
(B)

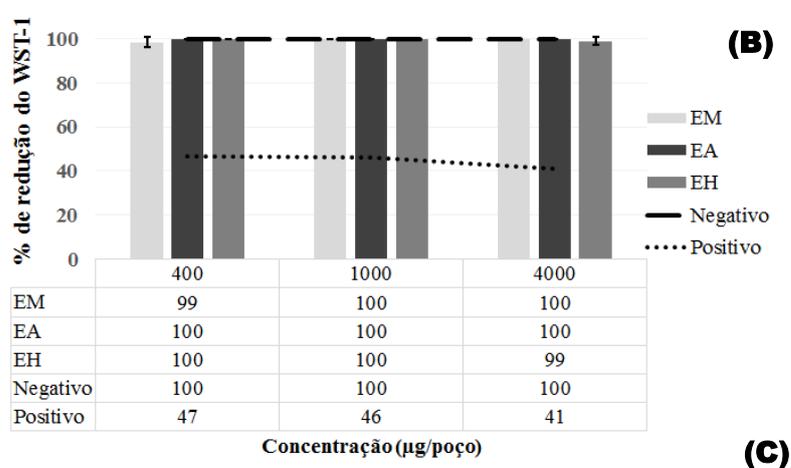
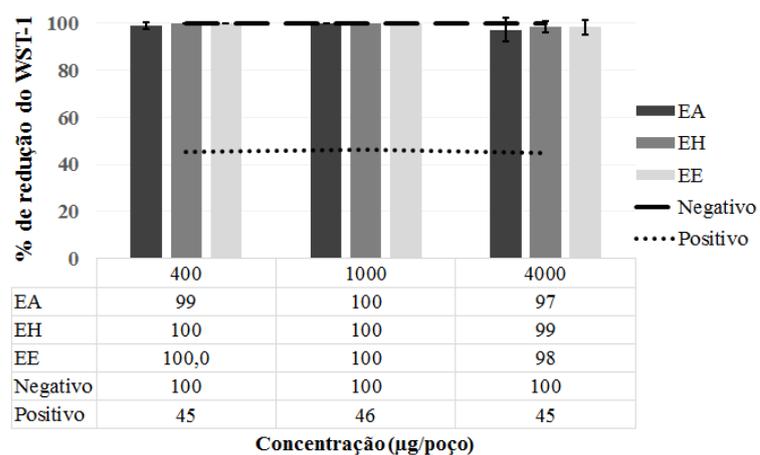


Estão representadas médias e desvios padrão.

Legenda: *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C). EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Gráfico 28. Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* após 24 horas de incubação.

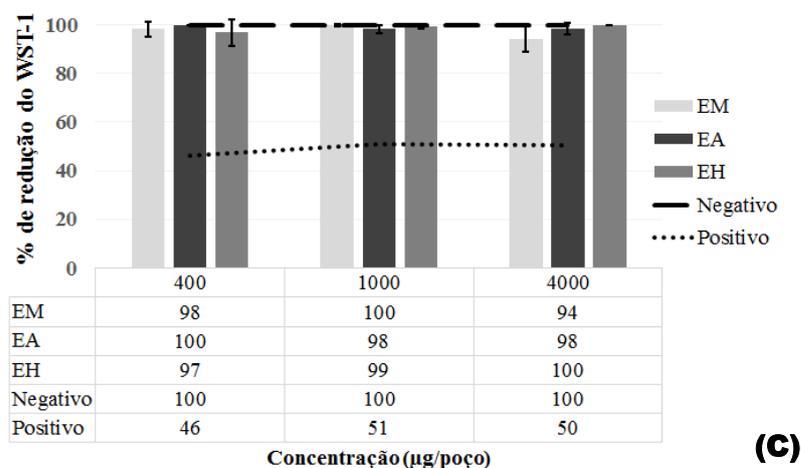
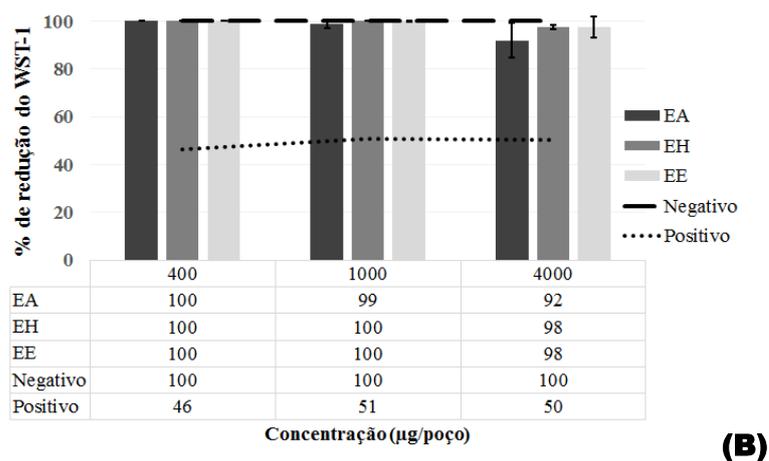
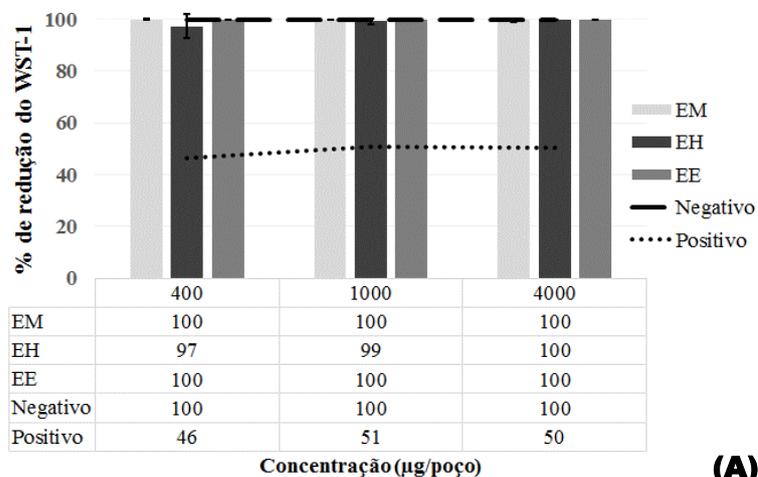




Estão representadas médias e desvios padrão.

Legenda: *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C). EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Gráfico 29. Viabilidade celular da linhagem celular HepG2, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C) após 48 horas de incubação.



Estão representadas médias e desvios padrão.

Legenda: *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C) EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Os extratos das três espécies de musgos não induziram morte celular significativa, pelo ensaio de viabilidade celular usando WST-,1 em HepG2, nos tratamentos de 3, 24 e 48 h. Em todos os ensaios os brancos de reações foram descontados.

Estes resultados reforçam a ausência da atividade citotóxica em sistema de metabolização, uma vez que demonstra a integridade do sistema biológico no ensaio de MN.

10.9.4 Micronúcleo em HaCat

Os índices mitóticos e os percentuais de células micronucleadas (avaliação genotóxica) dos EM, EH e EE de *S. uncinata*, EA, EH e EE de *H. laevifolia*, e EM, EA e EH de *L. laevifolium* estão apresentados na Tabela 15. O percentual de células em necrose e apoptose (avaliação citotóxica), assim como os valores de sobrevivência celular estão apresentados na Tabela 16. A exceção do EM de *S. uncinata* em sua maior concentração, os extratos das três espécies de musgos não induziram respostas positivas significativas para aumento de frequência de células micronucleadas. Também foi observado aumento significativo do número de micronúcleo induzido pelo EA de *H. laevifolia*, EM de *L. laevifolium* e *S. uncinata* nas maiores concentrações, comparado ao controle do ensaio. Foi observado também que EA e EH de *H. laevifolia* induziram diminuição significativa ($P < 0,05$) do índice mitótico nas três concentrações testadas. Estes resultados sugerem efeito citostático o qual pode estar relacionado a presença de compostos fenólicos presentes nestes extratos. Os mesmos apresentaram teor de polifenóis totais maiores que 3 mg/g de equivalente de catecol. Demais extratos não induziram efeitos citotóxicos, exceto para o EM de *S. uncinata* que nas duas maiores concentrações induziram aumento significativo do número de células em apoptose. Além disso em 4000 µg/placa observou-se que o EE de *S. uncinata* induziu aumento de células necróticas, quando comparada ao controle do ensaio. A ausência de resposta citotóxica é interessante numa célula de origem epidérmica, pois sendo os extratos promissores para uma possível aplicação como componentes cosméticos de proteção ao UV, as células epidérmicas são as primeiras a manter contato com produtos de ação dérmica. Formulações antissolares não devem, entre outras características, apresentar ação tóxica ou fotocitotóxica. Por outro lado, os resultados positivos em genotoxicidade induzidos por alguns extratos promissores, como o EE de *H. laevifolia* e EH de *L. laevifolium*, sobre células de macrófagos, chamam a atenção para uma rigorosa recomendação sobre futuros testes de penetração e absorção cutânea, em formulações antissolares contendo componentes desses materiais, devido a seus riscos iminentes, apesar das formulações atuais não permitirem a

penetração de filtros solares na pele ou mucosas. Importante considerar também a concentração aplicado do material nas formulações cosméticas, para não induzir danos ao material, mas que seja efetiva na proteção.

Tabela 15. Avaliação genotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de queratinócito da linhagem HaCat.

	Solução-teste	µg/poço	Índice mitótico ^a ± DP	% Células micronucleadas ± DP
	DMSO	-	96,0 ± 7,8	0,6 ± 0,1
	CONTROLE	-	107 ± 3,0	0,4 ± 0,1
	MNNG	7,35x-10 ⁻²	47,5 ± 3,5* [#]	4,6 ± 0,9* [#]
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	400	125,0 ± 18,5	0,8 ± 0,1
		1000	93,0 ± 6,9	0,9 ± 0,3
		4000	106,0 ± 27,1	1,8 ± 0,7* [#]
	EH	400	112,3 ± 13,6	0,5 ± 0,1
		1000	90,3 ± 9,0	0,6 ± 0,0
		4000	83,6 ± 5,6	0,5 ± 0,2
	EE	400	96,3 ± 25,1	0,7 ± 0,2
		1000	91,0 ± 18,1	0,8 ± 0,3
		4000	113,6 ± 29,5	0,9 ± 0,3
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	400	66,6 ± 15,2* [#]	0,6 ± 0,1
		1000	55,6 ± 7,2* [#]	0,9 ± 0,3
		4000	64,6 ± 11,3* [#]	1,2 ± 0,4 [#]
	EH	400	54,0 ± 2,6* [#]	0,5 ± 0,0
		1000	53,6 ± 14,8* [#]	0,4 ± 0,0
		4000	63,6 ± 11,8* [#]	0,4 ± 0,1
	EE	400	102,6 ± 11,2	1,1 ± 0,4
		1000	95,3 ± 6,8	0,7 ± 0,1
		4000	104,0 ± 27,0	0,6 ± 0,1
<i>Leucobryum laevifolium</i>	EM	400	92,6 ± 6,4	0,8 ± 0,3
		1000	100,6 ± 7,3	0,6 ± 0,2
		4000	108,0 ± 19,0	1,1 ± 0,0 [#]
	EA	400	97,3 ± 11,9	0,5 ± 0,1
		1000	104,0 ± 18,5	0,5 ± 0,2
		4000	76,3 ± 10,9	0,5 ± 0,1
	EH	400	117,6 ± 17,2	0,9 ± 0,2
		1000	99,3 ± 22,2	0,7 ± 0,2
		4000	102,3 ± 15,3	1,1 ± 0,4

Rodapé: vide Tabela 11.

Tabela 16. Avaliação citotóxica pelo ensaio de Micronúcleo após 3 horas de tratamento dos extratos selecionados das três espécies de musgos em células de queratinócito da linhagem HaCat.

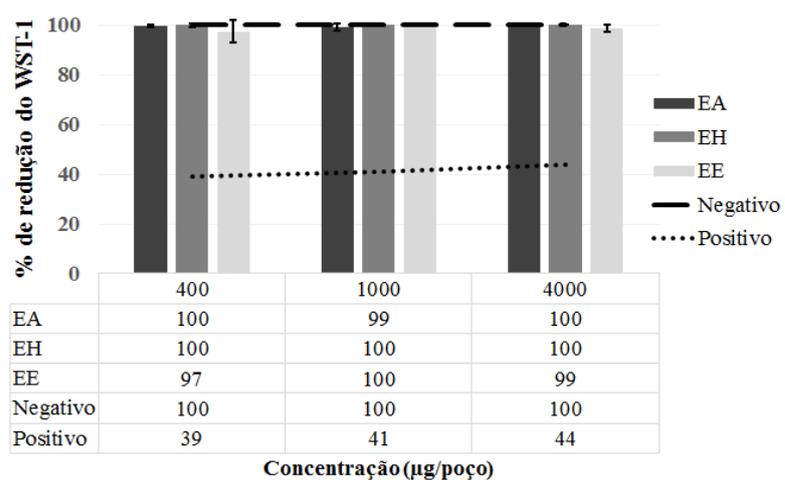
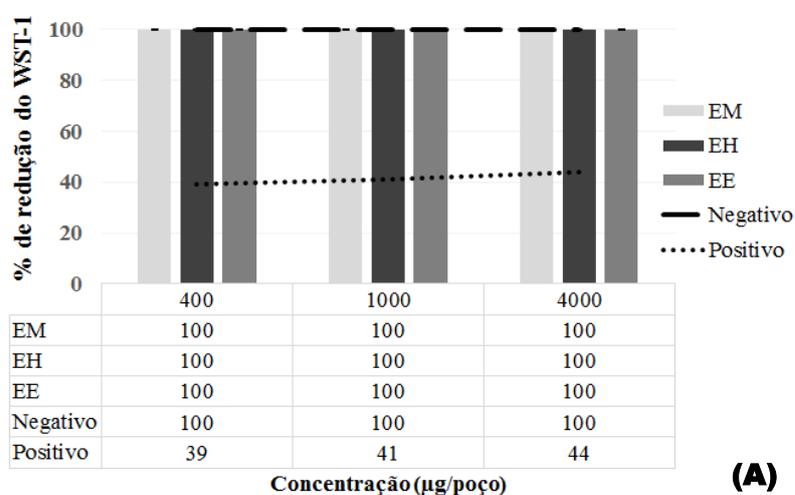
	Solução-teste	µg/poço	% Necrose ± DP	% Apoptose ± DP
	DMSO	-	1,5 ± 0,6	0,1 ± 0,0
	CONTROLE	-	1,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	MNNG	7,35x10 ⁻²	1,2 ± 0,4	0,1 ± 0,0
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	400	2,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1
		1000	1,9 ± 0,1	0,7 ± 0,0*#
		4000	2,0 ± 0,4	0,8 ± 0,1*#
	EH	400	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,0
		1000	0,9 ± 0,3	0,1 ± 0,0
		4000	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,0
	EE	400	1,1 ± 0,6	0,2 ± 0,0
		1000	1,1 ± 0,5	0,2 ± 0,0
		4000	2,5 ± 0,5 [#]	0,3 ± 0,0
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	400	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
		1000	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1
		4000	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,1
	EH	400	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,0
		100	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1
		4000	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0
	EE	400	1,1 ± 0,3	0,1 ± 0,0
		1000	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1
		4000	1,1 ± 0,2	0,2 ± 0,0
<i>Leucobryum laevifolium</i>	EM	400	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1
		1000	1,2 ± 0,3	0,1 ± 0,0
		4000	1,1 ± 0,6	0,2 ± 0,1
	EA	400	1,0 ± 0,3	0,1 ± 0,5
		1000	1,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
		4000	0,8 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	EH	400	1,1 ± 0,5	0,0 ± 0,0
		1000	2,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0
		4000	2,3 ± 0,9	0,1 ± 0,0

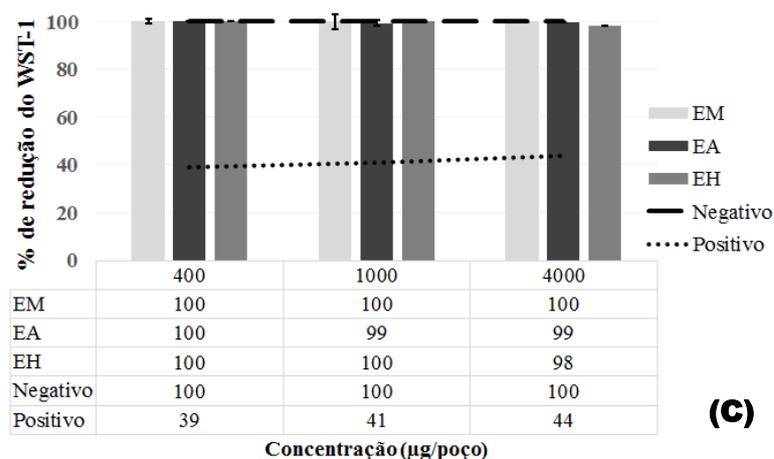
Rodapé: vide Tabela 12.

10.9.4.1 Viabilidade celular de HaCaT por WST-1

Os resultados do teste de viabilidade utilizando a linhagem HaCat na presença das espécies *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* com tratamento de 3 h (Gráfico 30), 24 h (Gráfico 31) e 48 h (Gráfico 32) estão apresentados a seguir.

Gráfico 30. Viabilidade celular da linhagem celular HaCat, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de dos extratos de *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* após 3 horas de incubação.

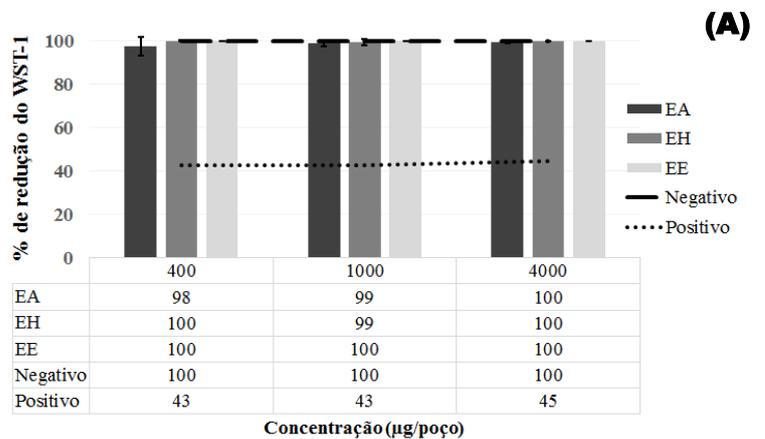
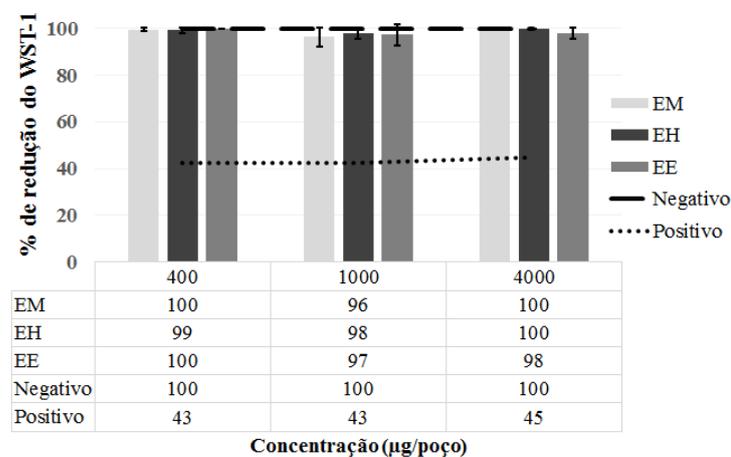


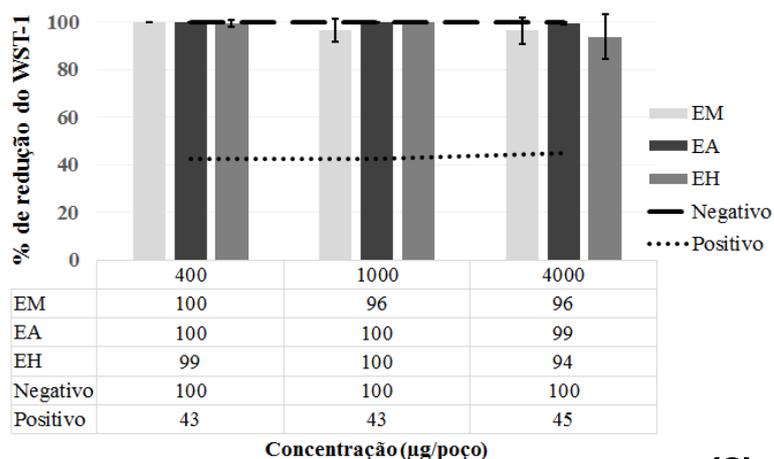


Estão representadas médias e desvios padrão.

Legenda: *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C). EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Gráfico 31. Viabilidade celular da linhagem celular HaCat, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de dos extratos de *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* após 24 horas de incubação.



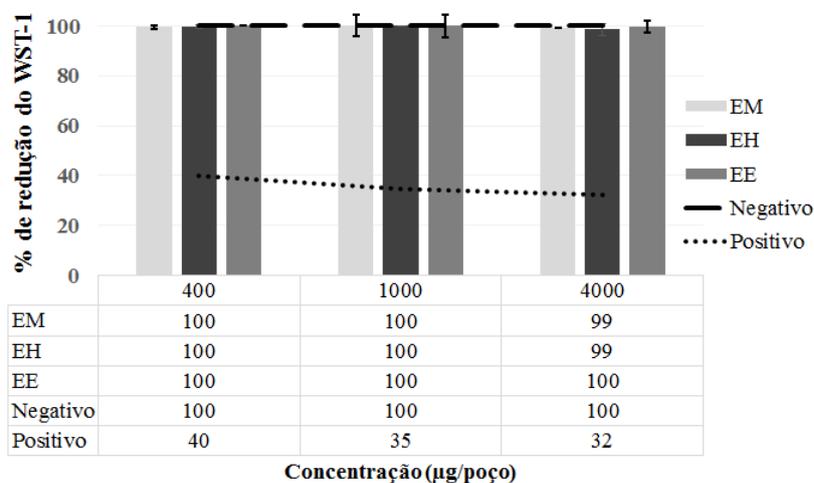


(C)

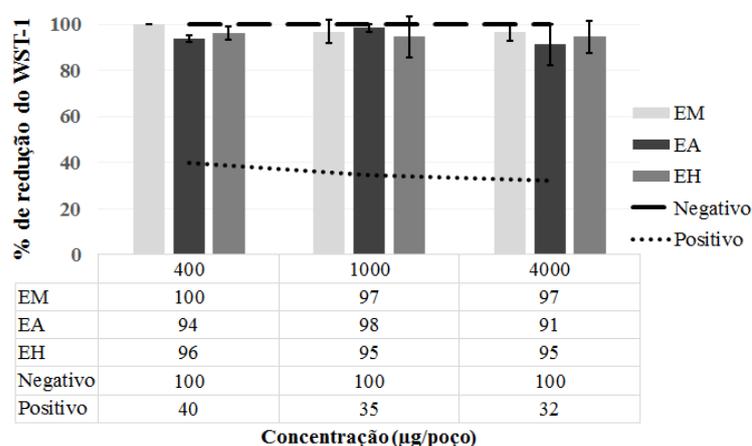
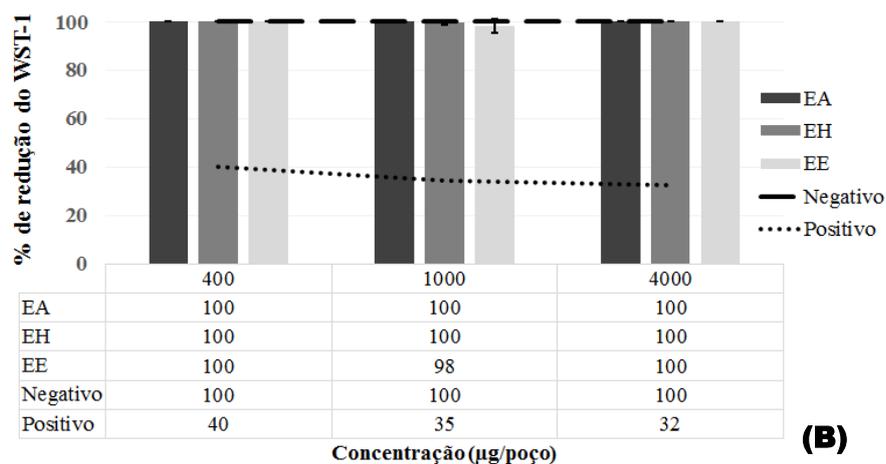
Estão representadas médias e desvios padrão.

Legenda: *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C). EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Gráfico 32 - Viabilidade celular da linhagem celular HaCat, usando WST-1 em diferentes concentrações dos extratos de dos extratos de *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* após 48 horas de incubação.



(A)



Estão representadas médias e desvios padrão.

Legenda: *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C). EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Os extratos das três espécies de musgos não induziram morte celular significativa, pelo ensaio de viabilidade celular usando WST-1 em HaCat, nos tratamentos de 3, 24 e 48 h. Em todos os ensaios os brancos de reações foram descontados. Estes resultados demonstram a viabilidade desta linhagem para estudos mais específicos, como a fotomutagenicidade.

10.10 Fotomicronúcleo usando HaCat

O protocolo SCC (LOPRIENO, 1991) também estabelece que o ensaio de fotomicronúcleo seja incluído na bateria mínima de testes exigidos para avaliação de uma substância com potencial aplicação em cosméticos. Assim, este teste foi realizado com os extratos promissores em fotoproteção das três espécies de musgos estudadas, na indução por radiação UVA e UVB, usando a linhagem celular HaCat. Seu uso justifica-se por ser um tipo de célula proveniente do epitélio humano, os queratinócitos, que constitui a maior parte da

epiderme, camada externa da pele, e por isso, representa um sistema biológico com maior exposição natural à radiação UV.

10.10.1 Ultravioleta A

Os índices mitóticos e percentuais de células micronucleadas (avaliação fotogenotóxica) dos EM, EH e EE de *S. uncinata*, EA, EH e EE de *H. laevifolia*, e EM, EA e EH de *L. laevifolium* após radiação com UVA estão apresentados na Tabela 17. O percentual de células em necrose e apoptose (avaliação citotóxica) estão apresentados na Tabela 18. As concentrações 400, 1000 e 4000 µg/poço dos extratos das três espécies não foram apresentados nas Tabelas 17 e 18, pois induziram morte celular significativa (vide item 10.10.3), exceto os extratos aquosos de *H. laevifolia* e *L. laevifolium*, cujos resultados com as concentrações de 400 e 1000 µg/poço foram apresentados nas Tabelas.

Observa-se que após a irradiação por UVA (Tabela 17) não foram encontradas respostas positivas no ensaio de fotomicronucleo sobre células HaCat tratadas com os extratos das três espécies de musgos, em todas as concentrações testadas. Exceto para o EA de *H. laevifolia*, cuja concentração de 1000 µg/placa induziu significativo ($P < 0,05$) aumento na frequência de células micronucleadas, sugerindo efeito fotogenotóxico. Também para o EA dessa espécie foi encontrado diferenças significativas entre o controle do ensaio e a concentração de 400 µg/placa. Essas diferenças também foram observadas no EH de *H. laevifolia* e *L. laevifolium* (10 e 40 µg/placa), mas não diferindo do controle negativo, sugerindo o DMSO pode estar interferindo na indução da formação de micronúcleos. Interessante observar que EM de *S. uncinata*, nas três concentrações, o EA até 40 µg/placa e o EH a 1 µg/placa em *H. laevifolia* e todos os extratos de *L. laevifolium* (exceto o EH nas duas maiores concentrações) foram encontrados percentuais de células micronucleadas menores que no controle negativo (DMSO), sugerindo efeitos fotoprotetores por esses extratos sobre a indução de fotomicronucleos. Além disso, foi observado aumento no percentual de células necróticas nos EM (todas as concentrações) e EH/EE (40 µg/placa) de *S. uncinata*; EA (a partir de 400 µg/placa), EH (40 µg/placa) e EE (a partir de 10 µg/placa) de *H. laevifolia*; e EA (1000 µg/placa) e EH (10 e 40 µg/placa) de *L. laevifolium* (Tabela 18). Demais concentrações dos extratos nas três espécies não induziram efeito fotocitotóxico significativo ($P > 0,05$). A análise de Cluster mostrou que, excetuando-se o EH de *L. laevifolium*, os extratos com maior atividade captadora de radicais livre induziram menos necrose na incidência por UVA (r Pearson = -0,96, $P < 0,001$). Assim, pode-se inferir que se a fotocitotoxicidade de HaCat por UVA se dá pela

geração de radicais livres, estaria explicado esta correlação. O EE de *L. laevifolium* foi o único extrato de desta espécie com composição muito variada de componentes polifenólicos pela CLAE.

10.10.2 Ultravioleta B

Os índices mitóticos e percentuais de células micronucleadas (avaliação fotogenotóxica) dos EM, EH e EE de *S. uncinata*, EA, EH e EE de *H. laevifolia*, e EM, EA e EH de *L. laevifolium* após radiação com UVB estão apresentados na Tabela 19. Os percentuais de células em necrose e apoptose (avaliação citotóxica) estão apresentados na Tabela 20. Resultados a partir das concentrações 400, 1000 e 4000 µg/poço dos extratos das três espécies não foram apresentados nas Tabelas 19 e 20, pois induziram morte celular (vide item 10.10.3.1), exceto os extratos aquosos de *H. laevifolia* e *L. laevifolium*, cujas concentrações de 400 e 1000 µg/placa e o EH de *S. uncinata* e *L. laevifolium* a 400µg/placa foram apresentados nas Tabelas.

Pela Tabela 19, percebe-se que, após a irradiação de UVB, não foram encontradas respostas positivas pelo ensaio de fotomicronúcleo nas células HaCat tratadas com os extratos das três espécies de musgos, nas demais concentrações testadas. Exceto para o EH de *L. laevifolium*, cuja concentração de 400 µg/placa induziu significativo ($P < 0,05$) aumento na frequência de células micronucleadas, sugerindo efeito fotogenotóxico. Além disso, foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) no percentual de células necróticas nos EH de *S. uncinata* (400 µg/placa), *H. laevifolia* (10 e 40 µg/placa) e *L. laevifolium* (40 µg/placa). Demais extratos das três espécies não induziram efeito fotocitotóxico estatisticamente significativo (Tabela 20).

Tabela 17 - Fotomicronúcleo após exposição UVA (320 a 400 nm) em células de queratinócito da linhagem HaCat com extratos de três espécies de musgos.

	Solução-teste	µg/poço	Índice mitótico ^a ± DP	% Células micronucleadas ± DP
	DMSO	-	87,0 ± 1,7	0,8 ± 0,0 [#]
	CONTROLE	-	95,3 ± 3,5	0,4 ± 0,0
	8-MOP	1 x 10 ⁻³	74,3 ± 7,5	3,6 ± 0,6 ^{*#}
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	1	88,3 ± 2,8	0,3 ± 0,1*
		10	95,3 ± 5,0	0,1 ± 0,0*
		40	82,3 ± 3,7	0,3 ± 0,1*
	EH	1	75,3 ± 5,5	0,6 ± 0,1
		10	86,0 ± 3,4	0,7 ± 0,1
		40	85,6 ± 6,0	0,6 ± 0,0
	EE	1	85,0 ± 5,0	0,7 ± 0,1
		10	102,3 ± 12,1	0,6 ± 0,1
		40	97,6 ± 13,2	0,5 ± 0,1
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	1	82,0 ± 6,2	0,2 ± 0,0*
		10	88,6 ± 11,0	0,2 ± 0,0*
		40	75,6 ± 5,1	0,3 ± 0,0*
		400	89,0 ± 10,1	0,9 ± 0,1 [#]
		1000	90,6 ± 10,0	2,0 ± 0,1 ^{*#}
	EH	1	72,3 ± 7,5	0,4 ± 0,0*
		10	78,3 ± 7,6	0,7 ± 0,0 [#]
		40	82,0 ± 3,4	0,6 ± 0,0 [#]
	EE	1	85,3 ± 5,0	0,5 ± 0,1
		10	91,6 ± 3,7	0,6 ± 0,1
		40	81,3 ± 6,5	0,7 ± 0,1
	<i>Leucobryum laevifolium</i>	EM	1	100,5 ± 5,0
10			115,0 ± 5,5	0,4 ± 0,0*
40			100,6 ± 13,8	0,5 ± 0,1*
EA		1	121,6 ± 25,4	0,2 ± 0,1*
		10	83,3 ± 10,4	0,1 ± 0,0*
		40	121,3 ± 16,0	0,1 ± 0,0*
		400	96,3 ± 14,4	0,2 ± 0,0*
EH		1	94,0 ± 4,5	0,1 ± 0,0*
		10	111,0 ± 11,5	0,8 ± 0,1 [#]
		40	109,6 ± 9,5	0,9 ± 0,1 [#]
		1000	83,6 ± 4,0	0,4 ± 0,1*

Rodapé: vide Tabela 11. Controle positivo: 8-metoxipsoraleno (8-MOP). Legenda: EM: extrato metanólico, EA: extrato aquoso, EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Tabela 18 - Avaliação citotóxica após exposição UVA (320 a 400 nm) em células de queratinócito da linhagem HaCat com extratos de três espécies de musgos.

	Solução-teste	µg/poço	% Necrose ± DP	% Apoptose ± DP
	DMSO	-	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	CONTROLE	-	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	8-MOP	1x10 ⁻³	1,9 ± 0,1* [#]	0,6 ± 0,1* [#]
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	1	0,7 ± 0,0* [#]	0,0 ± 0,0
		10	1,3 ± 0,1* [#]	0,0 ± 0,0
		40	2,1 ± 0,0* [#]	0,0 ± 0,0
	EH	1	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0
		10	0,6 ± 0,1 [#]	0,0 ± 0,0
		40	0,8 ± 0,0* [#]	0,0 ± 0,0
	EE	1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0
		10	0,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0
		40	1,8 ± 0,3* [#]	0,0 ± 0,0
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	1	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0
		10	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0
		40	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0
		400	0,8 ± 0,1* [#]	0,2 ± 0,0
		1000	0,8 ± 0,0* [#]	0,0 ± 0,0
	EH	1	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0
		10	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0
		40	2,0 ± 0,1* [#]	0,0 ± 0,0
	EE	1	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10		0,7 ± 0,0* [#]	0,0 ± 0,0	
40		1,6 ± 0,1* [#]	0,0 ± 0,0	
<i>Leucobryum laevifolium</i>	EM	1	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0
		10	0,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0
		40	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	EA	1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0
		10	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0
		40	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0
		400	0,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0
		1000	1,1 ± 0,1* [#]	0,0 ± 0,0
	EH	1	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0
10		1,0 ± 0,0* [#]	0,0 ± 0,0	
40		0,9 ± 0,0* [#]	0,0 ± 0,0	

Rodapé: vide Tabela 12. Controle positivo: 8-metoxipsoraleno (8-MOP) Legenda: EM: extrato metanólico, EA: extrato aquoso, EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Tabela 19 - Fotomicronúcleo após exposição UVB (280 a 320 nm) em células de queratinócito da linhagem HaCat com extratos de três espécies de musgos.

	Solução-teste	µg/poço	Índice mitótico ^a ± DP	% Células micronucleadas ± DP	
	DMSO	-	92,6 ± 4,5	0,7 ± 0,1	
	CONTROLE	-	105,0 ± 5,0	0,6 ± 0,1	
	8-MOP	1x10 ⁻³	89,6 ± 12,6	3,0 ± 0,3* [#]	
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	1	77,6 ± 9,2	0,7 ± 0,0	
		10	96,6 ± 14,4	0,5 ± 0,1	
		40	93,0 ± 4,0	0,7 ± 0,1	
	EH	1	102,0 ± 9,6	0,9 ± 0,0	
		10	93,0 ± 9,8	0,7 ± 0,0	
		40	75,3 ± 4,0	0,6 ± 0,0	
		400	106,3 ± 19,5	0,5 ± 0,2	
	EE	1	79,6 ± 7,5 [#]	0,5 ± 0,0	
		10	84,3 ± 4,5 [#]	0,6 ± 0,1	
		40	85,0 ± 5,0 [#]	0,5 ± 0,1	
	<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	1	89,0 ± 7,8	0,6 ± 0,0
			10	109,3 ± 10,0	0,9 ± 0,0
40			76,0 ± 6,0	0,8 ± 0,0	
400			85,0 ± 5,2	0,5 ± 0,1	
1000			83,6 ± 1,1	0,8 ± 0,0	
EH		1	95,6 ± 9,7	0,4 ± 0,1	
		10	83,6 ± 9,0	0,5 ± 0,0	
		40	98,3 ± 10,4	0,6 ± 0,1	
EE		1	82,6 ± 2,3	0,5 ± 0,1	
		10	100,6 ± 4,0	0,5 ± 0,0	
		40	84,0 ± 1,0	0,6 ± 0,0	
<i>Leucobryum laevifolium</i>		EM	1	101,6 ± 18,9	0,5 ± 0,0
	10		88,8 ± 6,5	0,6 ± 0,1	
	40		93,0 ± 6,0	0,8 ± 0,0	
	EA	1	89,3 ± 9,2	0,6 ± 0,1	
		10	78,6 ± 7,7	0,6 ± 0,0	
		40	94,0 ± 5,5	0,7 ± 0,0	
		400	78,3 ± 6,6	0,5 ± 0,0	
		1000	86,6 ± 15,4	0,5 ± 0,0	
	EH	1	83,6 ± 4,7	0,7 ± 0,1	
		10	98,0 ± 2,6	0,5 ± 0,1	
		40	87,6 ± 9,2	0,5 ± 0,0	
		400	91,0 ± 10,3	1,1 ± 0,1*	

Rodapé: vide Tabela 11. Controle positivo: 8-metoxipsoraleno. Legenda: EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

Tabela 20 - Avaliação citotóxica após exposição UVB (280 a 320 nm) em células de queratinócito da linhagem HaCat com extratos de três espécies de musgos.

	Solução-teste	µg/poço	% Necrose ± DP	% Apoptose ± DP	
	DMSO	-	0,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0	
	CONTROLE	-	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
	8-MOP	1x10 ⁻³	1,3 ± 0,0* [#]	0,7 ± 0,0* [#]	
<i>Sanionia uncinata</i>	EM	1	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		10	0,8 ± 0,3	0,0 ± 0,0	
		40	0,8 ± 0,1	0,0 ± 0,0	
	EH	1	0,5 ± 0,2	0,0 ± 0,0	
		10	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	
		40	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		400	1,5 ± 0,1* [#]	0,0 ± 0,0	
	EE	1	0,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	
		10	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		40	0,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	
	<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	EA	1	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0
			10	0,8 ± 0,1	0,0 ± 0,0
40			0,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	
400			0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	
1000			0,9 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
EH		1	0,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0	
		10	1,4 ± 0,1*	0,0 ± 0,0	
		40	1,5 ± 0,4*	0,0 ± 0,0	
EE		1	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		10	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	
		40	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
<i>Leucobryum laevifolium</i>		EM	1	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	10		0,8 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
	40		0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0	
	EA	1	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	
		10	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		40	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		400	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		1000	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
	EH	1	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		10	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
		40	0,9 ± 0,0* [#]	0,0 ± 0,0	

Rodapé: vide Tabela 12. Controle positivo: 8-metoxipsoraleno. Legenda: EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

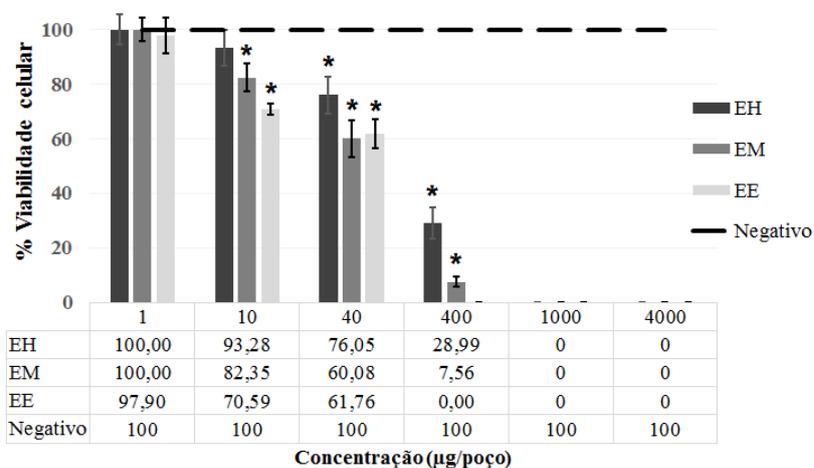
10.10.3.1 Viabilidade celular de HaCat após a radiação por UVA e UVB pelo método de exclusão por azul de tripan

Abaixo segue os resultados do teste de viabilidade pelo método de exclusão por azul de tripan e utilizando a linhagem HaCat na presença das espécies *S. uncinata*, *H. laevifolia* e *L. laevifolium* após radiação por UVA (Gráfico 34) e por UVB (Gráfico 35). Este método é o mais comum para avaliar a viabilidade das células estabelecidas. Fundamenta-se no fato de que as células mortas permitem a entrada do corante, devido a permeabilidade da membrana plasmática, tornando-se azul e as células viáveis permanecem sem coloração (TENNANT, 1964).

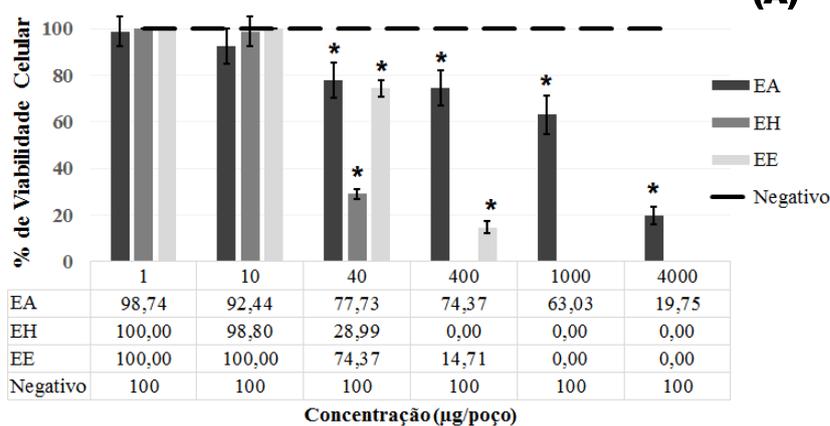
Pelo Gráfico 33 pode-se observar morte celular significativa ($P < 0,05$), após irradiação com UVA, a partir da concentração 10 µg/placa pelo EM e EE de *S. uncinata* e a partir de 40 µg/placa para EH de *S. uncinata* e demais extratos de *H. laevifolia* e *L. laevifolium*. Interessante observar que esta diminuição celular pode estar associada ao aumento de células necrosadas encontradas no ensaio de fotomicronúcleo (veja Tabela 17), sendo que a morte celular para os EA de *H. laevifolia* e *L. leucobryum* e EH de *L. laevifolium*, pelo ensaio de viabilidade celular por azul de tripan, foram detectadas a partir da concentração de 40 µg/placa.

Observando o Gráfico 34 percebe-se que a partir da concentração 40 µg/placa o EE de *S. uncinata*, EH de *H. laevifolia* e EM de *L. laevifolium* induziram significativamente ($P < 0,05$) diminuição da viabilidade celular da célula HaCat após a irradiação com UVB. Este mesmo efeito foi observado para os demais extratos das três espécies a partir da concentração de 400 µg/placa, exceto para os EA nos quais o efeito citotóxico foi observado a partir de 1000 µg/placa. Comparando estes resultados com os obtidos no ensaio de fotomicronúcleo é possível observar, de modo geral, um notável aumento de células necrosadas à medida que aumenta a concentração dos extratos (Tabela 20), apesar de ter sido encontrado aumento estatisticamente significativo de células necrosadas apenas nos EH de *S. uncinata* e *H. laevifolia*. Assim, sugere-se que a morte celular da linha HaCat, nas maiores concentrações, após a irradiação por UVB, conforme encontrada no ensaio de viabilidade celular por exclusão de azul de tripan, seja por necrose.

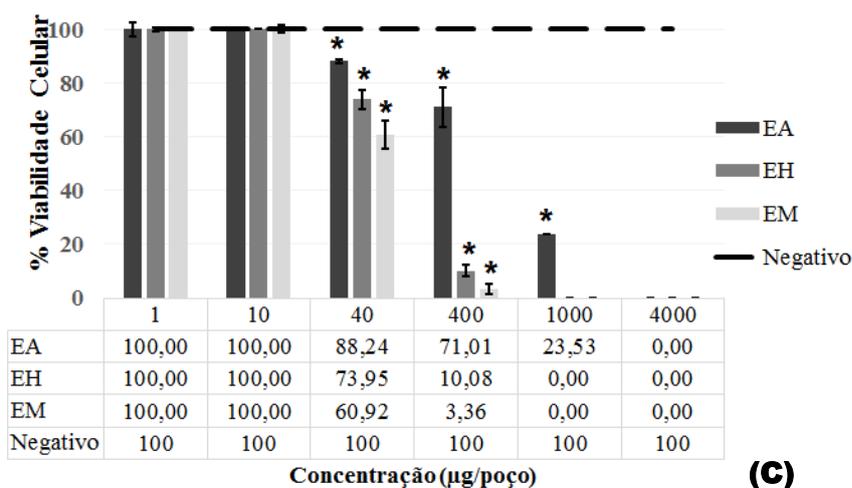
Gráfico 33 - Viabilidade celular de diferentes concentrações dos extratos de *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* pelo método de exclusão por azul de tripan, usando a célula HaCat, após irradiação por UVA.



(A)



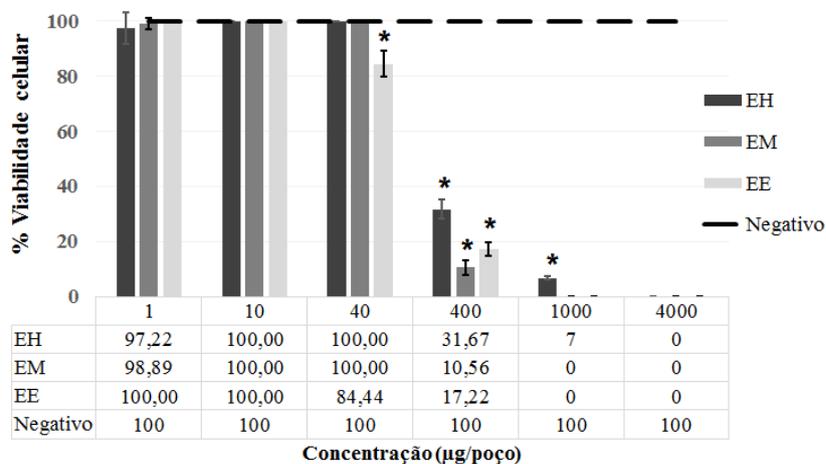
(B)



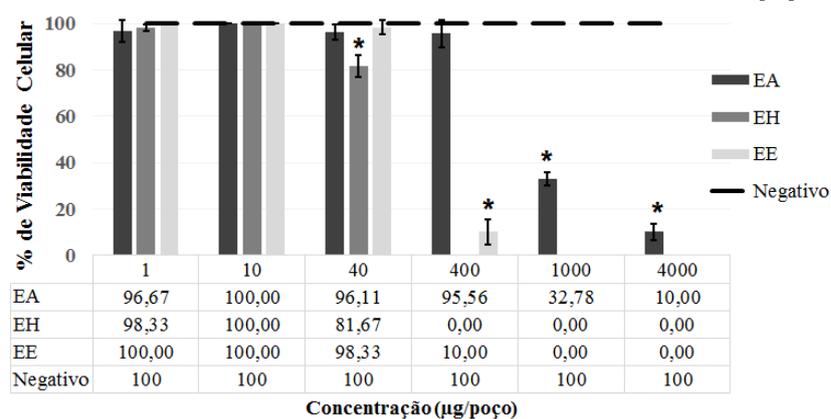
(C)

Estão representadas médias e desvios padrão. Diferenças estatisticamente significativa $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por Dunnett's estão indicadas. Legenda: *Sanionia uncinata* (A) *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C). EM: extrato metanólico, EA: extrato aquoso, EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

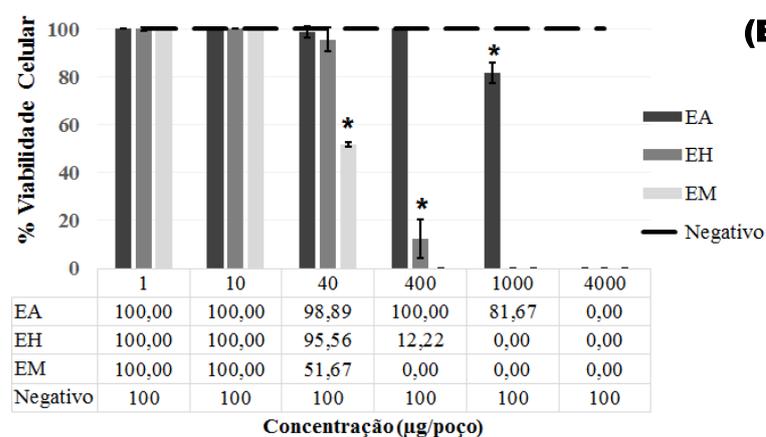
Gráfico 34 - Viabilidade celular de diferentes concentrações dos extratos de *Sanionia uncinata*, *Holomitriopsis laevifolia* e *Leucobryum laevifolium* pelo método de exclusão por azul de tripan, usando a célula HaCat, após irradiação por UVB.



(A)



(B)



(C)

Estão representadas médias e desvios padrão. Diferenças estatisticamente significativa $*P < 0,05$ relativas ao controle negativo por Dunnett's estão indicadas. Legenda: *Sanionia uncinata* (A), *Holomitriopsis laevifolia* (B) e *Leucobryum laevifolium* (C). EM: extrato metanólico; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroalcoólico e EE: extrato etanólico.

CONCLUSÕES

A partir da avaliação do conjunto de ensaios, assim como dos resultados obtidos, conclui-se que alguns extratos investigados possuem atividades fotoprotetoras e antioxidantes e que os extratos se apresentaram bastante singulares devido a sua composição química. Até o momento, a maioria dos trabalhos da literatura que estuda musgos e seus mecanismos de proteção à radiação UV, parece focar principalmente em briófitas que habitam a Antártica e o círculo polar Antártico. O presente trabalho fez a comparação de uma espécie de musgo da Antártica com outros musgos de outras regiões. Vale ressaltar, que os extratos dos musgos *H. laevifolia* e *L. laevifolium*, coletados no Morro dos Seis Lagos (Amazonas) apresentaram os resultados mais promissores em fotoproteção quando comparados aos extratos de *S. uncinata*, coletada na Antártica. A maior fotoproteção dos extratos dos musgos amazônicos pode ser devido à incidência de radiação UV e as condições ambientais as quais esses musgos são expostos. *H. laevifolia* e *L. laevifolium* habitam uma região próxima a linha do Equador, região que sofre com a incidência constante de radiação solar na maior parte do ano. Assim, para estas espécies que vivem nesta região, torna-se necessária aumento da síntese constitutiva de metabólitos secundários. O musgo *S. uncinata* habita a região da Antártica que tem duas estações bem marcantes ao longo do ano: verão e inverno. E é no inverno, devido a uma série de fatores, entre elas frio intenso e presença de nuvens polares estratosféricas (menos de -80°C) retendo cloro, que ocorre a diminuição da camada de ozônio e, por isso, há maior incidência de radiação UV, quando comparada ao verão. Porém, neste mesmo período a vegetação fica coberta por neve e esta condição meteorológica favorece a proteção das vegetações e, por isso, menor síntese de metabólitos secundários.

Portanto, os resultados deste trabalho vêm a contribuir de forma significativa na ampliação do conhecimento das atividades fotoprotetoras e antioxidantes de extratos de musgos expostos a altas incidências de radiações UV e que habitam diferentes regiões do globo terrestre.

REFERÊNCIAS

- ADEN, D. P. et al. Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, v. 282, p. 615-617, 1979.
- ADIMOOLAM, S.; FORD, J. M. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 20, p. 12985-12990, 2002.
- AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 508, p. 144-151, 2011.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietetic flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, v. 2, p. 875 – 877, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, K. R.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review Plant Biotechnology*, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ATHAR, M. Oxidative stress and experimental carcinogenesis. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 40, n. 5, p. 656-667, 2002.
- BALMAIN, A.; HARRIS, C. C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*, v. 21, n. 3, p. 371-377, 2000.
- BASU-MODAK, S.; TYRREL, R. M. Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene. *Cancer Research*, v. 53, n.19, p. 4505-4510, 1993.
- BERRA, C. M. *Estudo de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo em lesões oxidativas em células de mamíferos*. 2008. 41 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 21, p. 167-223, 2001.
- BOEHME, K. et al. Activation of P53 in HepG2 cells as surrogate to detect mutagens and promutagens *in vitro*. *Toxicology Letters*, v. 198, p. 272–281, 2010.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BOTELLA-PAVIA, P.; RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*, v. 126, p. 369-381, 2006.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human Keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, v. 106, n. 3, p. 761-771, 1988.

BOWDEN, G.T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 1, p. 23–35, 2004.

BHATTARAI, H. D. et al. Antioxidant activity of *Sanionia uncinata*, a polar moss species from King Island, Antarctica. *Phytotherapy Research*, v. 22, p. 1635-1639, 2008.

BRAGA, A. C. C. et al. Atividade antioxidante e quantificação de compostos bioativos em frutos de abricó (*Mammea americana*). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2010.

BRASIL, Resolução n° 30, de 1 de Junho de 2012, Aprova Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br>>

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA – Resolução – RDC n° 47 de 16 de março de 2006. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 mar. 2006. Disponível em:<<http://www.e-legis.anvisa.gov.br>>

CALÒ, R. MARABINI, L. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCat cells). *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, v. 132, p. 27-35, 2014.

CADET, J. et al. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research*, v. 531, p. 5-23, 2003.

CASAGRANDE, F.; DARBON, J. M. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology*, v. 61, n. 10, p. 1205–1215, 2001.

CAVERZAN, A. *Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (Oryza sativa) nas interações entre estresse oxidativo e estresse abiótico*. 2008. 91 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

CHECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1997.

COCKELL, C. S.; KNOWLAND, J. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Review*, v. 74, p. 311–345, 1999.

- COOKE M. S. et al. Recommendations for standardized description of and nomenclature concerning oxidatively damaged nucleobases in DNA. *Chemical Research in Toxicology*, v. 23, p. 705–707, 2010.
- COLIPA. Sun protection factor test method. COLIPA Publication. Ref 94/289. October 1994.
- DAHLBACK, A. et al. Biological UV-doses and the effect of an ozone layer depletion. *Photochemistry and Photobiology*, v. 49, n. 5, p.621-625, 1989.
- DE GRUIJL, F. R. Skin cancer and solar UV radiation. *European Journal of Cancer*, v. 35, n. 14, p. 2300-2309, 1999.
- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 274, p. 532-538, 1989.
- DENARDIN. C. C. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract on activated hepatic stellate cells. *Cell Biochemistry and Function*, v. 32, n. 1, p. 16-23, 2014.
- DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, v. 16, n. 3, p. 437- 441, 1995.
- DUNN, J. L.; ROBINSON, S. A. Ultraviolet B screening potential is higher in two cosmopolitan moss species than in a co-occurring Antarctic endemic moss: implications of continuing ozone depletion. *Global Change Biology*, v. 12, p. 2282–2296, 2006.
- EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell BiologyI*, v. 16, p. 663-669, 2004.
- EDLICH, R. F. et al. Photoprotection by sunscreens with topical antioxidants and systemic antioxidants to reduce sun exposure. *Journal of long-term Effects of Medical Implants*, v. 14, n. 4, p. 317- 340, 2004.
- ENGELSEN, O. et al. Daily duration of vitamin D synthesis in human skin with relation to latitude, total ozone, altitude, ground cover aerosol and cloud thickness. *Photochemistry and Photobiology*, v. 81, p. 1278-1290, 2005.
- FAUCONNEAU, B.; WAFFO, T. P. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Science*, v. 61, p. 2103-2110, 1997.
- FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for rakage – fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, A. S. et al. Effects of *Sanionia uncinata* extracts in protecting against and inducing DNA cleavage by reactive oxygen species. *Redox Report*, v. 16, n. 5, p. 201-207, 2011a.

FERNANDES, A. S. et al. Effects of *Sanionia uncinata* extracts on photochemical thymine dimerization and on DNA cleavage by Fenton-like reactions. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE, TERATOGENESE AMBIENTAL, 11., 2011, São Pedro. *Resumos...* São Paulo: SBMCTA, 2011b. CD

FERNANDES, A. S. et al. Avaliação da atividade fotoprotetora e toxicológica de extratos do musgo *Sanionia uncinata* coletado na Antártica. In: WORKSHOP DA ASSOCIAÇÃO DE PESQUISADORES POLARES EM INICIO DE CARREIRA (APECS: BRASIL): PERSPECTIVAS E OPORTUNIDADES, 1., 2010. *Resumos...*Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010. p. 56.

FERNANDES, A.S. *Avaliação da atividade fotoprotetora e toxicológica de extratos de Sanionia uncinata*. 2010; 122 f. Dissertação (mestrado em Biociências) – Programa de Pós Graduação em Biociências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FERNANDES, A. S. et al. Avaliação da atividade antioxidante de extratos do musgo *Sanionia uncinata* na indução de quebra do DNA plasmidial e efeito da presença de indutores, inibidores e coadjuvantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE, TERATOGENESE AMBIENTAL, 11., 2009, Ouro Preto. *Resumos...* Minas Gerais: SBMCTA, 2009a. CD

FERNANDES, A. S. et al. Photoprotective effect and genotoxic potential by extracts from the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL MUTAGENS, 10., 2009, Firenze. *Resumos...* Itália: ICEM, 2009b.

FERNANDES, A. S. et al. Fotoproteção e potencial genotóxico de extratos do musgo *Sanionia uncinata* proveniente da Antártica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE, TERATOGENESE AMBIENTAL, 11., 2009, Ouro Preto. *Resumos...* Minas Gerais: SBMCTA, 2009c. CD

FERREIRA, M. M. F.; OLIVEIRA, A. H. C.; SANTOS, N. S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre a estrutura química e função biológica. *Revista Agroambiental (on line)*, v. 2, n. 2, p. 57-60, 2008.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Department of Health and Human Services, FDA. USA: *Sunscreen Drug Product for Over-the-Counter Human Use, Tentative Final Monograph*. Federal Register. v. 58, n. 90, p. 27693-28194, 1993.

FONTANA, J. D. et al. *Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity*. In: New Jersey: Humana press, 2004. p. 203-218.

FREDERICK, J. E.; QU, Z.; BOOTH, C. R. Ultraviolet radiation at sites on the Antarctic coast. *Photochemistry and Photobiology*, v. 68, p. 183–190, 1998.

FRIEDBERG, E. C. et al. *DNA repair and Mutagenesis*. 2^a ed. Washington D. C: Ed. ASM Press, 2006.

GABRIELSKA, J.; SOCZYŃSKA-KORDALA, M.; PRZESTALSKI, S. Antioxidative effect of kaempferol and its equimolar mixture with phenyltin compounds on UV-irradiated liposome membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 1, p. 76-83, 2005.

GARCIA, S. et al. Avaliação do Fator de Proteção Solar por método “in vitro”. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 72, n. 2, p. 39-41, 1991.

GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 343, n. 1-2, p. 181-189, 2007.

GEHRKE, C. Effects of enhanced UV-B radiation on production-related properties of a *Sphagnum fuscum* dominated subarctic bog. *Functional Ecology*, v. 12, p.940–947, 1998.

GOCKE, E. Considerations on 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. Phototoxicity and photogenotoxicity of nine pyridone derivatives. *Mutation Research*, v. 535, p. 43–54, 2003.

GODAR, D. UV doses worldwide. *Photochemistry and Photobiology*, v. 81, p. 736-749, 2005.

GOOGLE. Disponível em: < <https://www.google.com.br/maps>>. Acesso em: Mar. 2013.

GOVONI, G, et al. Functional expression of Nramp 1 *in vitro* in the murine macrophage line RAW264.7. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 5, p. 2225-2232, 1999.

GRASSELLI, J. G. *CRC Atlas spectral data and physical constants for organic compounds*. Cleveland Ohio: Ed. Cleveland, CRC Press, 1973.

GREEN, T. G. A. et al. UV-A protection in mosses growing in continental Antarctica. *Polar Biology*, v. 28, n. 11, p. 822-827, 2005.

GUARATINI, T. et. al. New chemical evidence for the ability to generate radical molecular ions of polyenes from ESI and HR-MALDI mass spectrometry. *Analyst*, v. 129, p. 1223-1226, 2004.

GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interação entre o setor produtivo e centros de pesquisa. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.

GUÉRARD, M.; ZELLER, A.; SINGER, T.; GOCKE, E. *In vitro* genotoxicity of neutral red after photo-activation and metabolic activation in the Ames test, the micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research*, v. 746, p. 15-20, 2012.

- GWYNN-JONES, D.; JOHANSON, U.; PHOENIX, G. *UV-B impacts and interactions with other co-occurring variables of environmental change: an Arctic perspective*. In: *Stratospheric Ozone Depletion: the Effects of Enhanced UV-B Radiation*. Backhuys Publishers, Leiden: Ed. Rozema J., p. 187–201, 1999.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press, 1999. 543 p.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.
- HEDENÄS, L. The genus *Sanionia* (Musci) in Northwestern Europe, a taxonomic revision. *Annales Botanici Fennici*, v. 26, p. 399-419, 1989.
- HERALD, T. J.; GADGIL, P.; TILLEY, M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 92, p. 2326-2331, 2012.
- HOEIJMAKERS, J. H. J. Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast. *Trends in Genetics*, v. 9, n. 5, p. 173-177, 1993.
- HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, n. 9-10, p. 937-942, 1999.
- HORINOUCHEA, M.; ARIMOTO-KOBAYASHI, S. Photomicronucleus assay of phototoxic and pseudophotoclastogenic chemicals in human keratinocyte NCTC2544 cells. *Mutation Research*, v. 723, p. 43–50, 2011.
- HORI, M.; KOJIMA, S. Effect of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) on Ray-induced micronucleous frequency in RAW264.7 cells. *Pteridines*, v. 17, n. 3, p. 74-81, 2006.
- HORN, R. C.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology in Vitro*, v. 22, n. 4, p. 1043-1049, 2008.
- HOSTETTMANN, K. K. ; QUEIROZ, E. F. ; VIEIRA, P. C. *Principios ativos em plantas superiores*. São Carlos: Edufscar, 2003. 151 p.
- HUTTUNEN, S.; KINNUNEN, H.; LAAKSO, K. Impact of increased UV-B on plant ecosystems. *Chemosphere*, v. 36, p. 829-833, 1998.
- HUTTUNEN, S.; LAPPALAINEN, N. M.; TURUNEN, J. UV-absorbing compounds in subarctic herbarium bryophytes. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 303-314, 2005a.
- HUTTUNEN, S. et al. Environmental specimen bank samples of *Pleurozium schreberi* and *Hylocomium splendens* as indicators of the radiation environment at the surface. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 315- 326, 2005b.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em Mar. 2014.

INCA - Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em Jun. 2014.

INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Disponível em: <<http://www.jbrj.gov.br>>. Acesso em Mar. 2014.

KANASHIRO, A. et al. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 1, p. 61-65, 2004.

KAEZER, A. R. et al. Antimutagenic effect and phenolic content of green and roasted yerba mate beverages in different packages available in the Brazilian market. *Journal of Food*, v. 10, n. 2, p.1-8, 2012.

KNASMÜLLER, S. et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, v. 198, p. 315-328, 2004.

KATZ, E.D. *High performance liquid chromatography: principles and methods in biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1994. 328 p.

KIRALP, S.; TOPPARE, L. Polyphenol content in selected Turkish wines, an alternative method of detection of phenolics. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 1, p. 236-239, 2006.

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; ECHER, E. Erythema UV-B exposure near the Antarctic Peninsula and comparison with an equatorial site. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 60, p. 102-107, 2001.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, v. 209, p. 497-499, 1980.

KRUTMANN, J. Therapeutic photoimmunology: photoimmunological mechanisms in photo(chemo)therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 44, p. 159-164., 1998.

KRAEMER, K. et al. Xeroderma pigmentosum, trichothidystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience*, v. 145, n. 4, p. 1388-1396, 2007.

LECCIA, M. T. et al. Zinc protects against ultraviolet A1-induced DNA damage and apoptosis in cultured human fibroblast. *Biological Trace Element Research*, v. 69, n. 3, p. 177-190, 1999.

LEFFELL, D. J.; BRASH, D. E. Sunlight and skin cancer. *Scientific American*, v. 275, n. 1, p. 52-53, 1996.

LEE, A. M. et al. The impact of the mixing properties within the Antarctic stratospheric vortex on ozone loss in spring. *Journal of Geophysical Research*, v. 106, p. 3202-3211, 2001.

- LEHMANN, A. R. DNA repair-deficient, Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, v. 85, n. 11, p. 1101-1111, 2003.
- LE PAGE, et al. Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis*, v.16, n. 11, p. 2779- 2784, 1995.
- LIN, J. et al. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, v. 24, n. 2, p. 61-66, 2008.
- LJUNGMAN, M.; ZHANG, F. Blockage of RNA polymerase as a possible trigger of UV light-induced apoptosis. *Oncogene*, v. 13, n. 4, p. 823-831, 1996.
- LOPEZ, P. A.; ROJANO, B. A.; ECHEVERRI, T. L. *Actividad antioxidante en musgos*. Scientia et Technica, Año XIII, n. 33, 2007.
- LOPRIENO N. *In vitro* assay systems for testing photomutagenic chemicals. *Mutagenesis*, v. 6, p.331–333, 1991.
- LOUREIRO, A. N.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.
- LOVELOCK, C. E.; ROBINSON, S. A. Surface reflectance properties of Antarctic moss and their relationship to plant species, pigment composition and photosynthetic function. *Plant, Cell and Environment*, v. 25, n. 10, p. 1239–1250, 2002.
- LUD, D. *et al.* DNA damage and photosynthesis in Antarctic and Arctic *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske under ambient and enhanced levels of UV-B radiation. *Plant, Cell and Environment*, v. 25, n. 12, p. 1579-1589, 2002.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin: Ed. Springer, 1970, p. 41-169.
- MAMBRO, V. M. D.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 37, p. 287-295, 2005.
- MANSUR, J. S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 195, n. 3, p. 298-308, 2004
- MARKHAM, K. R. et al. Historical Antarctic ozone level trends from herbarium specimen flavonoids. *Bulletin de Liaison-Groupe Polyphenols*, v.15, p. 230-235, 1990.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, v. 113, p. 173-215, 1983.
- MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College Nutrition*, v. 21, p. 1-13, 2002.

MENCALHA, A. L. et al. LLL3, a stat3 inhibitor, represses BCR-ABL-positive cell proliferation, activates apoptosis and improves the effects of Imatinib mesylate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 65, p. 1039-1046, 2010.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, v.15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MERWALD, H. et al. UVA-induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.79, p. 197-207, 2005.

MEZADRI, T. et al. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, v, 21, p. 282-290, 2008.

MORTELMANS, K.; ZEIGER E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, v. 455, p. 29-60, 2000.

MUKHTAR, H.; ELMETS, C. A. Photocarcinogenesis: mechanisms, models and human health implications. *Photochemistry and Photobiology*, v. 63, n. 4, p. 356-357, 1996.

NASA -National Aeronautics and Space Administration 2010. Total Ozone Mapping Spectrophotometer. Disponível em: <http://toms.gsfc.nasa.gov>, acessado em Mar. 2013.

NEWSHAM, K. K. et al. Response of two Antarctic bryophytes to stratospheric ozone depletion. *Global Change Biology*, v. 8, p. 972-983, 2002.

NEWTON, A. E.; ROBINSON, H. The structure of the leaf and peristome of *Holomitriopsis laevifolia* (Broth.) H. Robins. illustrated with electron microscopy. *Tropical Bryology*, v. 9, p. 111-116. 1994.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives Dermatological Research*, v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010.

OCHYRA, R. *The Moss Flora of King George Island, Antarctica*. Polish Academy of Science, Institute of Botany, Cracow. 1998. 279 pp.

OECD – Guide for the testing of chemicals- 487, *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test. 2010. Organisation for Economic Co-operation and Development, France.

OECD – Guide for the testing of chemicals - 471, Bacterial Reverse Mutation Test. 1997. Organisation for Economic Co-operation and Development, France.

PEREIRA, M. A. *Perfil cromatográfico de substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação do seu poder antioxidante*. 2010. Monografia (Licenciatura em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

PEREIRA, B. K. et al. Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 96, n. 2, p. 117-129, 2009.

PIN-DER-DUH, X., PIN-CHAN-DU, X., COW-CHIN YEN, X. 1999. Action of methanolic extract of mung hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 1055–1061, 1999.

PINTO, L. F. R. ; FELZENSZWALB. I. (2003) *Genética do câncer humano*. In : Ribeiro, L. R.; Salvador, D. M. F.; Marques, E. K. (Orgs.) *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 356 p.

POPIM, R. C. et al. Câncer de pele: uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 13, n. 4, p.1331-1336, 2008.

PORTAL BRASIL. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br>>. Acesso em Mar. 2014.

POST, A. Photoprotective pigment as an adaptative strategy in the Antarctic moss *Ceratodon purpureus*. *Polar Biology*, v. 10, n. 4, p. 241-245, 1990.

PRETSCH, E.; BUHLMANN, P.; AFFOLTER, C. *Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Data*. 3^aed. Berlin: Springer-Verlag, 2000, 397p.

RAMOS, M. S. F. et al. Preliminary studies towards utilization of various plant extrates as antisolar agents. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 18, p. 87-101, 1996.

RANGEL, V. L. B. I.; CORRÊA, M. C. Fotoproteção. *Cosmetics & Toiletries*, v.14, p. 88-95, 2002.

RASCHKE, W. C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, v. 15, p. 261-267, 1978.

REGO, D. et al. Evaluation of a sunscreen during a typical beach period. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, v. 2, n. 1, p. 47-50, 2010.

RIBEIRO, R. P. *Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS in vitro em formulações fotoprotetoras comerciais*. 2004. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

RIBEIRO, L. R. (2003) *Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo*. In : Ribeiro, L. R.; Salvador, D. M. F.; Marques, E. K. (Orgs.) *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 356 p.

ROBINSON, S. A.; WASLEY, J.; TURNBULL, J. *Antarctic moss coping with the ozone hole*. 12th International Congress on Photosynthesis, Brisbane, CSIRO Publishing, Australia, 2001.

- ROBINSON, S. A.; WASLEY, J.; TOBIN, A. K. Living on the edge – plants and global change in continental and maritime Antarctica. *Global Change Biology*, v. 9, p. 1681-1717, 2003.
- ROBINSON, S. A.; TURNBULL, J. D.; LOVELOCK, C. E. Impact of changes in natural ultraviolet radiation on pigment composition, physiological and morphological characteristics of the Antarctic moss, *Grimmia antarctici*. *Global Change Biology*, v. 3, n. 11, p. 476-489, 2005.
- ROESLER R. et al. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 110, p. 711-717, 2008.
- RUSAK, G.; GUTZEIT, H. O.; MÜLLER, J.L. Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. *Nutrition Research*, v. 25 n. 2, p. 143–155, 2005.
- SANTOS, E. P. et al. *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 21, p. 1-5, 1999.
- SAKAKIBARA, H. et al. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 571-578, 2003.
- SAVIAN, A.L. et al. Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 91, n.2, p. 24-30, 2010.
- SAYRE R. M. et al. A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas. *Photochemistry and Photobiology*, v. 29, n. 3, p. 559-66, 1979.
- SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 27, n. 9, p. 483-486, 2002.
- SCOTT, A. I. *Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products*. Pergamon Press: Ed. New York, vol. 7, 1964. 443p.
- SHAHIDI F., NACKZK, M. *Phenolic in food and nutraceuticals*. Boca Raton London New York: CRC, 2004. 558 p.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Science*, v. 167, n. 3, p. 541-550, 2004.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1994. 299 p.
- SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5^aed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS/Editora da Universidade da UESC, 2004. 1102 f.

- SINHA, R. P.; HÄDER, D. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Science*, v. 1, p. 225-236, 2002.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1: 71-81, 2002.
- SOLOMON, S. Stratospheric ozone depletion: A review of concepts and history. *Reviews of Geophysics*, v. 37, n.3, p. 275-316, 1999.
- SOLOMON, S. On the depletion of Antarctic ozone. *Nature*, v. 321, p. 755-758, 1986.
- SOUZA, J. E. B. *Brasil na Antártica – 25 anos de História*. São Carlos - São Paulo: Vento Verde Editora, 2008. 167 f.
- SPENCE, R.A.J.; JONHSTON, P.G. *Oncology*; ed. Oxford University Press: Oxford, p. 1-14, 121-132, 2001.
- STARY, A.; ROBERT, C.; SARASIN, A. Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells. *Mutation Research*, v. 383, p. 1-8, 1997.
- STAFFORD, H. A. Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology*, v. 96, n. 3, p. 680-685, 1991.
- SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y. The French paradox and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 32, n. 4, p. 314-318, 2002.
- SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Repub.* v.150, p. 25-38, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3a edição, Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719 p.
- TAYLOR, R. M.; TOBIN, A. K.; BRAY, C. M. *DNA damage and repair in plants*. In: *Plants and UV-B. Responses to Environmental Change*. Cambridge University Press: ed. Lumsden P. J., 1997, p. 53–76.
- TEIXEIRA, S. P. Fotoproteção. *Revista Brasileira Médica*, v. 67, n. 4, p. 115-122, Jul. 2010.
- TENNANT, J. R. Evaluation of the Trypan Blue Technique for determination of cell viability. *Transplantation*, v. 2, n. 6, p. 685-815, 1964.
- TEVINI, M.; TERAMURA, A. UV-B effects on terrestrial plants. *Photochemistry and Photobiology*, v. 50, p. 479–487, 1989.
- TORNALETTI, S.; PFEIFER, G. P. UV damage and repair mechanism in mammalian cells. *BioEssays*, v. 18, p. 221-228, 1996.
- UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. *Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para*

mamíferos. In: Ribeiro, L. R.; Salvador, D. M. F.; Marques, E. K. (Orgs.) *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 356 p

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

VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutation Research*, v. 319, p. 31-45, 1993.

VELASCO, M. V. R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (*in vitro*) – revisão. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n. 1, p. 27-34.

VESSECCHI, R. et al. Radical ion generation processes of organic compounds in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 75-87, 2007.

VICTORIA, F. C. *Composição e distribuição das formações de musgos das áreas de degelo adjacentes à Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica*. 2005. 94 f. Dissertação (mestrado em Botânica) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Programa de Pós graduação em Botânica, Escola Nacional de Botânica Tropical. 2005.

VILA, F. C. et al. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, n. 5, p. 903-908, 2008.

VIOLANTE, I. M. P. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p. 452-457, 2009.

WANG, I. K.; LIN-SHIAU, S.Y.; LIN, J. K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *European Journal of Cancer*, v. 35, n.10, p. 1517–25, 1999.

WANG, L. et al. Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. *Mutation Research*, v. 530, p. 19–26, 2003.

WATANABE-AKANUMA, M.; INABA, Y. OHTA, T. Mutagenicity of UV-irradiated maltol in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis*, v. 22, n. 1, p. 43–47, 2007.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *The British Journal of Dermatology*, v. 157, n. 5, p. 874 -887. 2007

YADAV, L. D. S. *Organic Spectroscopy*. 1ªed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2005, p. 13-14, 18-19.

YANG, I.; JI-AE, S.; CHO, S. Pycnogenol induces nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and caspase-independent apoptosis in MC-3 human mucoepidermoid carcinoma cell line. *Journal Cancer Prevention*, v. 19, n. 4, p. 267-272, 2014.

YOUNG, A.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 385, n. 1, p. 20-27, 2001.

APÊNDICE - Artigo Publicado na Revista Pharmacognosy Magazine em Janeiro de 2015



ISSN : 0973-1296

January - March 2015 | Volume 11 | Issue 41

PubMed
Included

Pharmacognosy Magazine

Publication of Pharmacognosy Network Worldwide

www.phcog.com

Impact Factor® for 2012: 1.525

Phcog.Net - Bringing Medicinal Plant Researchers Together

Wolters Kluwer Health | Medknow

CAS Abstracts, Cengage, Chemical Abstracts, CNKI (China National Knowledge Infrastructure), CSA databases, DCAJ, EBSCO Publishing's Electronic Databases, Emerald ArticleFirst / Emerald Journals, Emerald Journals, Google Scholar, Health & Wellness Research Center, Health Reference Center Accessible, Hinet, Index Coperticus, Indian Science Abstracts, Journal Citation Reports, National Science Library, OpenJGate, PubMed Central, ProQuest, Publmed, Publmed Central, Science Citation Index Expanded, Scopus-Journal Ranking, SCOLCAR, SCOPUS, SDC-databases, Summa by Serial Solutions, Ulrich's International Periodical Directory and Web of Science.

Photoprotective and toxicological activities of extracts from the Antarctic moss *Sanionia uncinata*

Andréia da Silva Fernandes, Alexandre Santos Alencar, Heitor Evangelista, José Luiz Mazzei¹, Israel Felzenszwalb

Department of Biophysics and Biometry, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, Rio de Janeiro State University, ¹Platform of Analytical Chemistry, Farmanguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Submitted: 17-01-2014

Revised: 27-04-2014

Published: 21-01-2015

ABSTRACT

Background: The Antarctic moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske has shown high ultraviolet (UV)-absorbers content after exposition to high levels of UV-B radiation and can be an important source of antioxidants. **Objective:** The aim was to investigate photoprotection and mutagenicity by the aqueous extract (AE) and hydroethanolic extract (HE) from the Antarctic moss *S. uncinata*. **Materials and Methods:** Photoprotective activities were determined through survival curves of *Escherichia coli* strains, after UV irradiation in an aqueous solution of thymine and *in vitro* sun protection factor (SPF). The *Salmonella*/microsome assays were applied to assess the mutagenicity. **Results:** Both extracts induced photoprotection against UV-C radiation. The AE showed a higher protection than the hydroethanolic one against UV-induced thymine dimerization. The SPFs were low in both extracts. In association to benzophenone-3 a significant increase in the SPF was detected for the AE, and a significant decrease was induced by the HE. No mutagenicity was found in the both extracts. Furthermore, it was observed absence of cytotoxicity. **Conclusion:** Water-extractable compounds seem to contribute on photoprotection of this Antarctic moss.

Key words: Moss, mutagenicity, photoprotection, sun protection factor, thymine-dimer inhibition

Access this article online

Website:

www.phcog.com

DOI:

10.4103/0973-1296.149701

Quick Response Code:

