



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**AMANDA LEAL DA SILVA**

**ESTUDO BIOLÓGICO DO MUSGO ANTÁRTICO *SANIONIA  
UNCINATA* (HEDW.) LOESKE (AMBLYSTEGIACEAE)**

**SÃO PAULO  
2022**

**AMANDA LEAL DA SILVA**

**ESTUDO BIOLÓGICO DO MUSGO ANTÁRTICO *SANIONIA  
UNCINATA* (HEDW.) LOESKE (AMBLYSTEGIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, soborientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Barbosa Suffredini.

**SÃO PAULO  
2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Amanda Leal da.

Estudo biológico do musgo antártico *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske (Amblystegiaceae) / Amanda Leal da Silva. – 2022.

72 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Prospecção de atividade farmacológica a partir de produtos naturais de plantas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivana Barbosa Suffredini.

1. Antártica. 2. Antimicrobianos. 3. Radicais livres.  
4. Inibidores enzimáticos. 5. Antitumoral. I. Suffredini, Ivana Barbosa (orientadora). II. Título.

**AMANDA LEAL DA SILVA**

**ESTUDO BIOLÓGICO DO MUSGO ANTÁRTICO *SANIONIA  
UNCINATA* (HEDW.) LOESKE (AMBLYSTEGIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental, soborientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Barbosa Suffredini.

APROVADA EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada  
Universidade Católica de Brasília - UCB

Prof. Dr. Paulo Eduardo Aguiar Saraiva Câmara  
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Mateus Luís Barradas Paciencia  
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Dr. Welber Senteio Smith  
Universidade Paulista – UNIP

### **DEDICATÓRIA**

Dedico à minha avó, Oracina Leonel (*in memoriam*) por ensinar a unir pessoas e construir uma família. Seus ensinamentos me marcaram profundamente. E àquele que me torna mãe e está no meu ventre, a essa vida que gera movimento e mais vida. Dedico ao meu pequenino ou pequenina que virá.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus. A Fé e a Razão nunca foram questões de conflito e sim, cada uma, a sua forma, responde perguntas que me auxiliam a dar passos com esperança e caridade.

Agradeço imensamente aos meu pais, Alzira Leal da Silveira e Valter Ribeiro da Silva, que incondicionalmente me deram apoio, colo, acreditando nos meus sonhos e me ensinando a sonhar. Hoje eu finalizo mais uma etapa da vida na presença dessas duas pessoas que são inspiração de família, dedicação, amor e unidade. Eu tenho muita sorte em ser filha de vocês!

Ao Marcelo Alves Teodoro, que me dá um olhar cheio de esperança para o futuro, que inspira virtudes de forma leve e cuida com tanto carinho de mim e, hoje, de nós. Ao escrever me alegro em estar construindo uma família com você e desejo muito mais! Te amo!

Aos amigos espalhados por tantos lugares, à Alexandra Araújo, Natália Coriolano, Julia Mundim, Erika Costa, Lorena Nunes, Bruna Castellan, Fellipe Muniz, Ednéia Ramos, Wagner Santos, Daniel Aparecido, Ana Flávia Vieira e Felipe de Camargo. Agradeço as infinitas partilhas da vida, as escutas de reclamações e por vibrarem com minhas conquistas e, também, partilharem das suas.

Aos familiares, tios, tias, primos e primas que acompanham de longe mas apoiam tanto quanto. E a família do Marcelo, Dona Eliana, Seu Valdete e Valiana por cuidarem e me tornar família.

Aos que me acolheram em São Paulo, Augusto Rotta e sua família, as meninas do Condado Católico, em todas as formações, mas em especial à Alice Lima, Thaís Helena e Nildes Pereira. Vocês foram casa por três anos, de forma física e no coração, trazendo leveza nas dificuldades, sustento e muitas risadas. A Sibila Pacheco, Mariana Bernardes e Lavínia Pacheco por me darem um espacinho numa casa tão cheia de luz e a oportunidade de ser cuidada e cuidar.

Agradeço as pessoas que foram intermédio de tantas coisas boas nesse período, através do *Opus Dei*, os padres e seus membros que através da amizade interligam pessoas e os sonhos de Deus.

A Rede de Missão *Campus Fidei* que é um lugar de descanso e impulso para a alma. Me sustenta e me ajuda a entender o melhor de Deus. Aos amigos dessa Rede que tanto torcem e intercedem por mim, aos padres que rezaram e

rezam e por serem seta para o céu.

Aos amigos do laboratório NPBio, Jefferson de Souza, Karen Maldonado, Sérgio Frana, Mateus Paciencia, Luciella Ramos dos Santos e Evanete Alves da Cruz, por facilitarem o trabalho e alegrar a rotina. E aos demais colegas que dividem o laboratório por compartilharem dessa jornada.

A Professora Dra. Ivana Barbosa Suffredini, por todo o acolhimento, ensinamentos e por ser tão incrível nesse processo de doutorado, como conselheira, orientadora, professora e inspirar com tanta verdade e carinho. Você é inspiradora!

Aos amigos antárticos, que conheci nas expedições OPXXXVIII e OPXL e aos amigos da APECS-Brasil. A ciência polar é exigente mas cheia de contatos que ensinam sobre esse lugar encantador e fantástico.

A Marinha do Brasil pelo apoio logístico. Ao Projeto Briotech e pessoas envolvidas, na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Ramada e ao Bryoantar, que tem como coordenador o Prof. Dr. Paulo Câmara, por me permitirem trabalhar no lugar mais incrível do mundo que já pisei e tive a oportunidade de conhecer. A FioCruz e seus pesquisadores pelo auxílio com as coletas ao chegarem no Rio de Janeiro.

Aos professores e equipe da Unip, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, agradeço todo conhecimento ofertado e, também, aos colegas de jornada da pós.

Por fim, agradeço a CAPES - PROSUP e a Universidade Paulista – UNIP por concederem as bolsas PROSUP e de Isenção para realização do projeto de pesquisa de Doutorado, sem a qual não seria possível a execução.



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

“De toda dor nasce um dom”.  
Jerônimo Laurício



## ESTUDO BIOLÓGICO DO MUSGO ANTÁRTICO *SANIONIA UNCINATA* (HEDW.) LOESKE (AMBLYSTEGIACEAE)

AUTORA: Amanda Leal da Silva

RESUMO: A vegetação antártica é predominantemente composta por briófitas que se destacam pela sua abundância e por apresentarem alta capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, sugerindo uma taxa de adaptabilidade metabólica elevada. São conhecidas cerca de 116 espécies antárticas, a maioria das quais restrita à região da Península Antártica. Alguns organismos antárticos já foram estudados quanto aos compostos químicos isolados e à atividade biológica, entre eles o musgo *Polytrichastrum alpinum* (Hedwig) G.L.Smith, embora o conhecimento relacionado a outras espécies seja escasso. *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske foi escolhida como espécie alvo para o projeto por ser amplamente distribuída na região. A fim de se investigar o potencial farmacológico dessa planta, extratos etanólicos de espécimes coletados em diferentes localidades na Península Keller foram obtidos por maceração e submetidos a ensaios de avaliação antimicrobiana, antioxidante e de ação inibidora enzimática e, também, citotóxica em modelos *in vitro* de bioautografia, em meio líquido. Os extratos apresentaram atividade antibacteriana somente contra *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva, embora tenha sido testada contra *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Isso demonstra a importância da investigação, visto que a bactéria cuja atividade foi identificada é de grande preocupação da OMS e instituições sanitárias. Verificou-se a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e, também, atividade citotóxica contra as células de câncer de mama. Além de inibição da acetilcolinesterase, uma enzima importante na patofisiologia do mal de Alzheimer. Ainda que os resultados sejam promissores, há a necessidade de se avaliar o perfil químico dos extratos vegetais obtidos da espécie antártica, tanto dos que apresentaram atividade como os que não apresentaram, para um melhor entendimento dos resultados obtidos.

Palavra-chave: Antártica, antimicrobianos, radicais livres, inibidores enzimáticos, antitumoral.

## BIOLOGICAL STUDY OF ANTARCTIC MOSS

AUTOR: Amanda Leal da Silva

**ABSTRACT:** The Antarctic vegetation is predominantly composed of bryophytes that stand out for their abundance and for having a high capacity to adapt to different environmental conditions, suggesting a high rate of metabolic adaptability. About 116 Antarctic species are known, most of which are restricted to the Antarctic Peninsula region. Some Antarctic organisms have already been studied in terms of isolated chemical compounds and biological activity, including the moss *Polytrichastrum alpinum* (Hedwig) G.L.Smith, although knowledge related to other species is scarce. *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske was chosen as the target species for the project because it is widely distributed in the region. In order to investigate the pharmacological potential of this plant, ethanolic extracts from specimens collected in different locations in the Keller Peninsula were obtained by maceration and submitted to antimicrobial, antioxidant and enzymatic inhibitory action assays, as well as cytotoxicity in in vitro models of bioautography, in broth medium. The extracts showed antibacterial activity only against *Staphylococcus aureus*, a Gram-positive bacterium, although it was tested against *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. This demonstrates the importance of the investigation, since the bacterium whose activity was identified is of great concern to WHO and health institutions. Antioxidant and free radical scavenging activity and also cytotoxic activity against breast cancer cells were verified. In addition to inhibition of acetylcholinesterase, an important enzyme in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Although the results are promising, there is a need to evaluate the chemical profile of plant extracts obtained from the Antarctic species, both those that showed activity and those that did not, for a better understanding of the results obtained.

**Key-words:** Antarctica, antimicrobials, free radicals, enzyme inhibitors, antitumor.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Localização e limites da região Antártica. Fonte: Adaptado Landsat Image Mosaic of Antarctica (LIMA) - U.S. Geological Survey (<http://lima.usgs.gov/>, acessado em 18/06/2022). 4

**Figura 2:** Pontos de coleta da OPXXXVIII na Península Keller, Antártica. 17

**Figura 3:** **A:** Habitat; **B** e **C:** Coleta de material vegetal; **D:** *Sanionia uncinata* com esporófitos. Fotos A, B e D arquivo pessoal; Foto C Denni Morais. 19

**Figura 4:** Processo de extração das amostras. **A:** Plantas trituradas; **B:** Identificação amostras; **C:** Maceração em percolador; **D:** Amostras para evaporação. Fotos: arquivo pessoal. 21

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Descrições das coletas referentes a cada amostra de *Sanionia uncinata* que deu origem ao extrato correspondente. 18

**Tabela 2:** Identificação das amostras de extrato obtidas de *Sanionia uncinata*. 22

## **LISTA DE ABREVIações**

**AA** – Atividade Antioxidante

**Ach** – Acetilcolina

**AchE** – Acetilcolinesterase

**APP** – proteína precursora do amiloide

**ATCM** – Reunião dos Membros Consultivos do Tratado da Antártica (sigla em inglês)

**BioU** – Bioautografia unidimensional

**cm** – centímetros

**DA** – Doença de Alzheimer

**DeB** – Difusão em Bioautografia

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**DNA** – ácido desoxorriboncléico

**D.O.** – densidade óptica

**DPPH** – Difenilpicrilhidrazil

**DTNB** ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

**EACF** – Estação Antártica Comandante Ferraz

**FioCruz** – Fundação Oswaldo Cruz

**GPS** - Sistema de Posicionamento Global (sigla em inglês)

**H-41** – Navio Polar Almirante Maximiano

**HPLC-DAD** – cromatografia líquida de alta eficiência hifenado com espectrofotômetro por arranjo de diodos

**IARC** – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (sigla em inglês)

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer

**LAT** – Latitude

**LONG** – Longitude

**mg** - miligramas

**mL** – mililitros

**MTT** - brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

**NaPo** – Navio Polar

**NIH** – Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (sigla em inglês)

**nm** - nanometro

**NPBio** – Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OPERANTAR** – Operação Antártica

**OPXXXVIII** – 38ª Operação Antártica

**OPXXXIX** – 39ª Operação Antártica

**OPXL** – 40ª Operação Antártica

**PROANTAR** – Programa Antártico Brasileiro

**RNA** – ácido ribonucléico

**ROS** – espécies reativas de oxigênio

**SCAR** – Comitê Científico de Pesquisa Antártica (sigla em inglês)

**SNC** – sistema nervoso central

**TNT** – Tecido não-tecido

**UCB** – Universidade Católica de Brasília

**UnB** – Universidade de Brasília

**UNIP** – Universidade Paulista

**µL** – microlitros

**µg** – microgramas



**SUMÁRIO**

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
EPIGRAFE	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIÇÕES	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
2.1 Antártica	4
2.2 Vegetação Antártica	6
2.3 <i>Sanionia uncinata</i> (Hedw.) Loeske	9
2.4 Estudo biológico e químico em briófitas	10
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
3.1 Objetivo Geral	15
3.2 Objetivos Específico	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1 Composição da equipe de pesquisa	16
4.2 Estudos realizados com a espécie <i>S. uncinata</i>	16
4.2.1 Coleta da espécie vegetal antártica	16
4.2.2 Procedimentos de coleta	17
4.2.3 Obtenção dos extratos de <i>S. uncinata</i>	20
4.2.4 Preparo das amostras de extrato de <i>S. uncinata</i> a serem testadas nos ensaios biológicos	21
4.2.5 Análise da atividade antimicrobiana para <i>S. uncinata</i>	23
4.2.5.1 Extratos vegetais	23
4.2.5.2 Difusão em Bioautografia - DeB	23
4.2.5.3 Bioautografia unidimensional - BioU	24
4.2.6 Análise da atividade antioxidante para <i>S. uncinata</i>	25
4.2.6.1 Extratos vegetais	25
4.2.6.2 Ensaio do $\beta$ -caroteno em autografia	25
4.2.6.3 Ensaio do $\beta$ -caroteno em meio líquido	26
4.2.6.4 Ensaio do $\beta$ -caroteno para determinação da atividade antioxidante 50 %	26
4.2.6.5 Ensaio do DPPH em autografia	26
4.2.6.6 Ensaio do DPPH para determinação da atividade sequestradora de radicais livres	27
4.2.6.7 Teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu	27
4.2.7 Análise da atividade inibidora de acetilcolinesterase	28
4.2.7.1 Extratos vegetais	28
4.2.7.2 Método de Ellman, modificado por Rhee, para cromatografia em camada delgada - autografia	28
4.2.7.3 Método de Ellman para determinação da atividade inibitória enzimática 50 %	29
4.2.8 Ensaio da Atividade citotóxica contra células de tumor de mama e de próstata humanos	29



4.2.8.1 Extratos vegetais.....	29
4.2.8.2 Avaliação da citotoxicidade com células de tumor de próstata.....	30
<b>4.3 Análises estatísticas.....</b>	<b>31</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>88</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As briófitas são um grupo de plantas datadas do Ordoviciano Médio, há mais de 475 milhões de anos (WELLMAN e GRAY, 2003). Assim, um excelente argumento que justifica seu sucesso em se manter entre as espécies que compõem a flora atual é a presença de compostos biologicamente ativos, que protegem essas plantas de diversos micro-organismos (FERNANDÉZ, 2009), assim como estão envolvidos na proteção contra a ação deletéria de raios ultravioleta, que podem promover o aparecimento de espécies reativas de oxigênio (ROS), e de luz no comprimento de ondas do visível (FERREYRA; SERRA e CASATI, 2021).

A demanda mundial por novos fármacos a serem usados e em diferentes patologias é o principal foco do presente trabalho. O mesmo contribui, de forma inédita, com a análise do potencial biotecnológico de musgos Antárticos como fontes de moléculas de interesse para a saúde humana, animal e vegetal. O conhecimento recém produzido gera um impacto transversal importante para estudos de Taxonomia, Fisiologia Vegetal, Evolução, dentre outras áreas, que visam entender as razões da conquista da Península e do Continente Gelado por algumas espécies de musgos.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta que o câncer é a segunda causa de morte no mundo, e que, sem considerar o câncer de pele não melanoma, o mais frequente, os cânceres de pulmão, próstata, de cólon, estômago e fígado são os mais comuns em homens, enquanto que os de mama, cólon, pulmão, cervical e de tireoide são os mais comuns em mulheres (IARC, 2020; OMS, 2021). Em 2020, o câncer de mama tornou-se o mais diagnosticado no mundo (IARC, 2020). Em 2018, cerca de dez milhões de pessoas morreram de câncer, no mundo e 18 milhões de novos casos foram diagnosticados. A estimativa, em escala global, é de que em 2040 serão de 29 a 37 milhões de novos casos (OMS, 2020).

O câncer é a doenças mais caras de se tratar, sendo assim, uma das principais causas do aumento dos gastos na saúde (DA SILVA GOMES *et al.*, 2021). De acordo com o National Cancer Institute (NIH), nos Estados Unidos, no ano de 2019, as despesas com o tratamento de câncer alcançaram mais de 21 bilhões de dólares (YABROFF *et al.*, 2021. Já para o Brasil, em 2018, tratamentos oncológicos custaram cerca de 3.5 bilhões de reais, segundo o INCA (2022).

Na busca por novos fármacos, os produtos naturais são uma importante via de investigação (SUFFREDINI *et al.*, 2006). O corpo dos animais abriga uma vasta quantidade de micro-organismos, que estão dispostos naturalmente em diferentes ecossistemas complexos, favoráveis e necessários, quando em harmonia com o sistema imune. Frente ao desequilíbrio do sistema imune, infecções oportunistas causadas por micro-organismos podem ocorrer, causando doenças (MUSZER *et al.*, 2015). Por conta de fatores como o uso indiscriminado de antibióticos, do aparecimento de cepas multirresistentes e da capacidade de alguns micro-organismos formarem biofilme, há a necessidade de se introduzir novos antibióticos que sejam eficazes em seu combate. Os produtos naturais se mostram uma importante fonte de antibióticos potenciais.

Os processos bioquímicos usuais produzem uma elevada quantidade de radicais livres, que dentro de um organismo em homeostase são neutralizados por enzimas especializadas. Já quando ocorre um desequilíbrio, ou seja, quando há a produção exacerbada de radicais livres, ou quando há uma falha na neutralização enzimática destes, moléculas importantes como os ácidos nucleicos – ácido ribonucleico (RNA, da sigla em inglês) e ácido desoxirribonucleico (DNA, da sigla em inglês), enzimas, proteínas e lipídeos de membrana podem sofrer alterações que decorrem em mutações, funcionamento fisiológico inadequado ou perda de estruturas teciduais. Como consequência, o aparecimento precoce de doenças como tumores e aterosclerose, ou mesmo o envelhecimento precoce podem ocorrer. Métodos preventivos devem, assim, ser adotados.

Com o aumento da expectativa de vida da população, doenças que antes não eram conhecidas foram sendo diagnosticadas entre os indivíduos. A Doença de Alzheimer (DA) é uma enfermidade neurodegenerativa e é caracterizada pela perda progressiva de memória e outras funções cognitivas, afetando atividades ocupacionais e sociais (FORLENZA, 2005; WELLER e BUDSON, 2018), o primeiro relato deu-se em 1907 com o médico Alois Alzheimer e, hoje, já existem vias de tratamento (ABRAZ, 2022).

A DA é responsável por 80 % dos diagnósticos de demência no mundo (CROUS-BOU *et al.*, 2017). Não se sabe ainda como a doença ocorre, mas são

conhecidas lesões cerebrais características (ABRAZ, 2022). Os diagnósticos estão relacionados ao sistema colinérgico, dessa forma, a acetilcolina (Ach) é um mediador químico de sinapses do sistema nervoso central (SCN) e periférico e é responsável pela síntese de neurotransmissão colinérgica (FORLENZA, 2005; VENTURA *et al.*, 2010). As mudanças cerebrais características da DA são nas placas senis e emaranhados neurofibrilares. Onde a primeira é obtida do metabolismo anormal da proteína precursora do amiloide (APP) resultando à formação de agregados do peptídeo  $\beta$ -amilóide. Já nos emaranhados neurofibrilares são formados do colapso do citoesqueleto neuronal, que acontece em virtude da hiperfosforilação da proteína tau (FORLENZA, 2005).

Diante do quadro descrito, da demanda mundial e do interesse em se descobrir novos fármacos antimicrobianos, antioxidantes e antitumorais, foram realizados experimentos biológicos em extratos de plantas antárticas e analisado o seu desempenho frente a diferentes micro-organismos. Além disso, o perfil fitoquímico da planta poderá apontar os compostos responsáveis por tais atividades. A mesma contribuirá com a análise do potencial biotecnológico de musgos Antárticos como fontes de moléculas de interesse para a saúde humana, animal e vegetal.

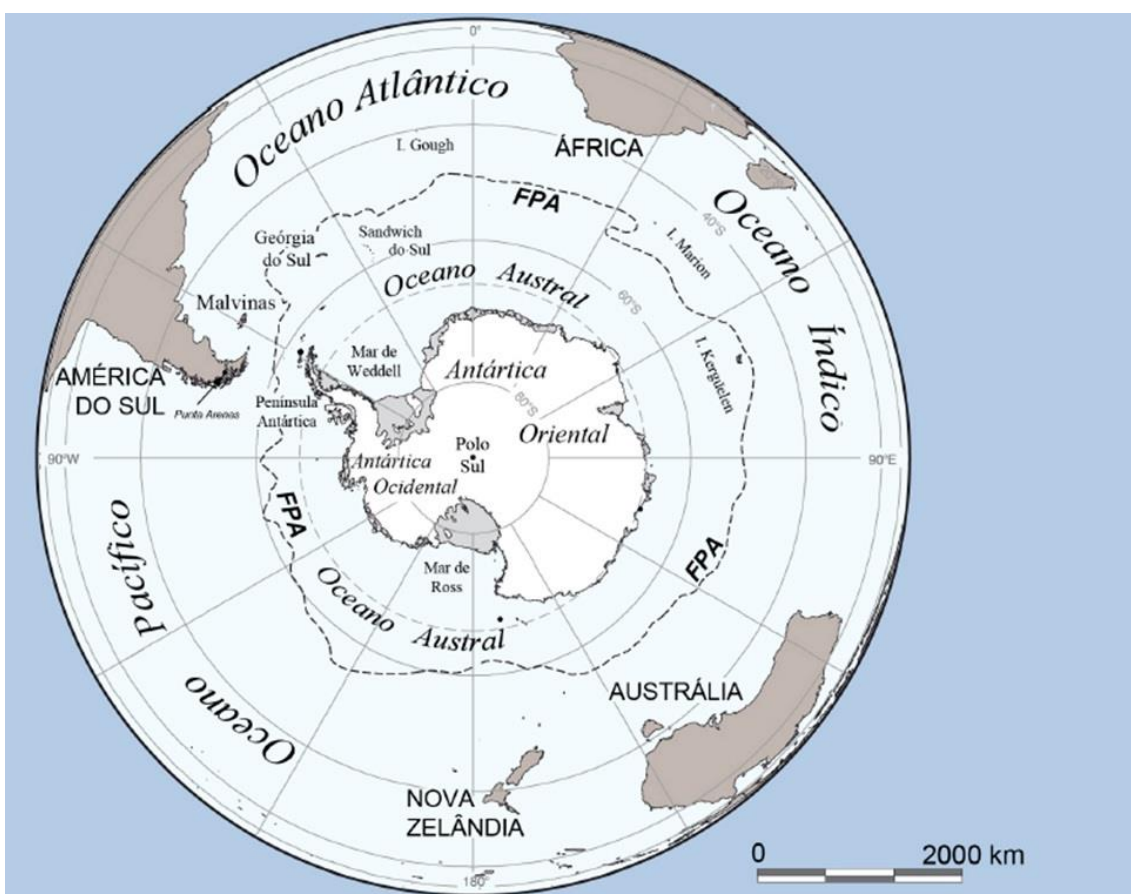
A contribuição científica do presente projeto soma-se às demais iniciativas de pesquisa Antártica, suportadas pelo governo através do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), cujo principal objetivo é dar suporte ao estabelecimento do Brasil como um dos líderes científicos no *Scientific Committee on Antarctic Research* (SCAR).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antártica

O continente antártico está centrado no Polo Sul Geográfico da Terra (Figura 1), sendo o quinto maior em relação à sua extensão. Conhecido por suas condições extremas, é intitulado como o continente dos superlativos: é um dos locais mais frios, mais secos, mais altos, mais ventosos, mais remotos, mais desconhecidos e, também, mais preservados (BARGAGLI, 2005; MACHADO & BRITO, 2009; CÂMARA *et al.*, 2021).

Figura 1: Localização e limites da região Antártica.



Fonte: Adaptado Landsat Image Mosaic of Antarctica (LIMA) - U.S. Geological Survey (<http://lima.usgs.gov/>, acessado em 18/06/2022)

Cerca de 90 % do gelo e 70 % da água doce do mundo estão na Antártica. As formas de vida existentes nesse local evoluíram sob condições extremas e o fato de o continente ser isolado dos outros também contribui para o estabelecimento de espécies que lá ocorrem (MACHADO e BRITO, 2009), de forma endêmica, o que tem possibilitado descobertas científicas significativas em diversas áreas, como Botânica (CÂMARA *et al.*, 2021; CARVALHO-SILVA *et al.*, 2021); Climatologia (TONELLI *et al.*, 2021); Glaciologia (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021); Microbiologia (DE MENEZES *et al.*, 2021), entre outras temáticas exploradas.

Trata-se do único continente que não tem uma divisão geopolítica e é regido por um tratado internacional, denominado de Tratado Antártico, assinado em 1º de dezembro de 1959. Nesse documento, ratificado inicialmente por 12 países, está definido que a Antártica é um lugar destinado para fins pacíficos, que garante a liberdade para o desenvolvimento de pesquisas científicas que visam à colaboração entre os países em esforços destinados à preservação e à busca do aprofundamento do conhecimento do continente gelado (TRATADO ANTÁRTICO, 1959, BRASIL, 2016).

Em 1991 foi assinado o Protocolo ao Tratado da Antártica, conhecido como Protocolo de Madri, documento em referência à proteção ao meio ambiente, que desde 1998, ano que entrou em vigor, concede proteção integral ao continente antártico pelos 50 anos seguintes à sua assinatura. Assim, a Antártica recebeu o status de “Reserva Natural Internacional Dedicada à Ciência e à Paz” (GANDRA e SIMÕES, 2013; BRASIL, 2016).

Anualmente, acontece a Reunião dos Membros Consultivos do Tratado da Antártica / *The Antarctic Treaty Consultative Meeting* (ATCM) e fazem parte do Tratado 53 países, sendo 29 membros consultivos e 24 membros não consultivos (MACHADO e BRITO, 2009). O Brasil aderiu ao Tratado em 1975, ano em que se tornou um dos membros consultivos, o que significa que tem poder de voz e de veto perante às decisões que envolvem o continente gelado. Já em 1982, foi criado o Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) (BRASIL, 2016), cuja missão é manter constante, viabilizar e dar suporte aos diversos projetos científicos desenvolvidos desde então. A Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), está localizada na

Ilha Rei George, na orla antártica marítima. Isso possibilita ao Brasil uma posição privilegiada para desenvolver as pesquisas nas diversas áreas da ciência (MACHADO e BRITO, 2009).

Por fim, é parte imprescindível dos termos do Tratado Antártico que os países signatários desenvolvam ciência e se comprometam em preservar o meio ambiente antártico. Dessa forma, a contribuição do Brasil nas atividades científicas daquela região se faz necessária, em termos estratégicos, econômicos e científicos (MACHADO e BRITO, 2009), uma vez que o Brasil é o sétimo país mais próximo da Antártica, cuja influência climática relacionada às massas polares e correntes marítimas sobre as regiões mais ao sul é importante para o agronegócio, para o turismo e outras atividades econômicas do país (ALVES *et al.*, 2017).

## **2.2 Vegetação Antártica**

As briófitas, principais residentes antárticos vegetais, destacam-se pela sua representatividade, em termos de abundância e variedade de espécies, bem como pela sua composição florística. O número de trabalhos na área é crescente (e.g., SEPPELT e GREEN, 1998; BEDNAREK-OCHYRA *et al.*, 2000; OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008; KURBATOVA e OCHYRA, 2012; CANNONE *et al.*, 2013; BRAMLEY-ALVES *et al.*, 2014; CÂMARA *et al.*, 2017; DE FREITAS *et al.*, 2018; HENRIQUES *et al.*, 2018; MUNDIM *et al.*, 2020), o que tem aumentado o impacto de conhecimento taxonômico, sistemático e biogeográfico no meio científico.

As briófitas integram um grupo parafilético composto por três filos, dos quais apenas dois estão representados na Antártica: Bryophyta, que compreende os musgos, e Marchantiophyta, que são as hepáticas (SEPPELT e GREEN, 1998; BEDNAREK-OCHYRA *et al.*, 2000; PEAT, CLARKE e CONVEY, 2007; OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008; HENRIQUES *et al.*, 2018).

Briófitas são o segundo grupo mais diverso de plantas terrestres, e fica atrás apenas das angiospermas. Estima-se que haja, no mundo, de 15.000 a 18.000 espécies (GOFFINET, BUCK e SHAW, 2009). As briófitas apresentam alta capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, podendo sobreviver

nos mais variados ecossistemas, sobre os mais diversos tipos de substratos, como troncos de árvores (corticícolas), solo (terrícola), rochas (rupícolas), folhas (epífilas) e mesmo sobre troncos em decomposição (epíxilas) (SILVA e PÔRTO, 2007; COSTA e LUIZI-PONZO, 2010).

O continente antártico tem uma área com mais de 14 milhões de km<sup>2</sup>, sendo apenas 0.3 % com ausência de gelo durante o verão, isso permite com que o solo exposto seja um potencial substrato para a vegetação (FOX e COOPER, 1994). Assim, a Antártica apresenta um bioma único, com uma ampla variedade de indivíduos, entre líquens, fungos e algas, que também estão lá presentes, além das briófitas (OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008). A vegetação do continente é formada, ainda, por duas espécies nativas de fanerógamas, *Deschampsia antarctica* Desv. e *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., além de *Poa annua* L., uma espécie de gramínea invasora (OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008).

A vegetação antártica é constituída principalmente pelos musgos que formam o que se considera a “floresta de briófitas” (OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008; CHWEDORZEWSKA *et al.*, 2015; HENRIQUES *et al.*, 2018; CÂMARA *et al.*, 2019), cujas espécies pertencem a 113 taxa, distribuídos em 17 famílias e 55 gêneros (OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008; CÂMARA *et al.*, 2021). Somada aos musgos, são descritas, ainda, 27 espécies para as hepáticas (BEDNAREK-OCHYRA *et al.*, 2000).

Com relação à evolução e à adaptação das plantas, as briófitas representam um importante passo na transição do ambiente aquático para o terrestre, uma vez que são uma das mais antigas linhagens de plantas terrestres (GOFFINET, BUCK e SHAW, 2009). Conhecidas por não apresentarem vasos condutores de seiva, se reproduzem por esporos e apresentam esporângios efêmeros. Os gametângios são perenes e os gametas formados por estruturas especializadas denominadas anterídios, onde se desenvolvem os gametas masculinos, e arquegônios, os femininos. Uma importante característica dessas plantas é que sua reprodução sexuada é dependente da água (SCHOFIELD, 1985; FRAHM, 2003).

São os principais componentes da flora Antártica e a maioria das espécies é



restrita à região denominada Península Antártica (OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008). A importância relativa da diversidade biológica abrigada pela área verifica-se através da ocorrência de 96,5 % de todos os musgos encontrados no continente gelado. A Península Antártica corresponde à porção de território mais próxima à América do Sul. Em sua costa ocidental e arquipélagos contíguos ocorrem derretimentos regulares durante o verão, maior precipitação de chuvas e clima mais ameno quando comparado às áreas do Platô Antártico.

A riqueza de espécies da flora de musgos da Antártica diminui significativamente com o aumento da latitude, o que fica bastante evidente ao se comparar a riqueza de espécies entre a Antártica Marítima, que inclui diversas ilhas como Ilhas Sandwich do Sul, Bouvetoya, Ilhas Órcadas do Sul, Ilhas Shetland do Sul e o lado oeste da Península Antártica, até a latitude 72° S, e a Continental, que abrange o lado oriental da Península Antártica, ao sul de 63° S, mais o restante do Continente (OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008; BEDNAREK-OCHYRA *et al.*, 2000; CÂMARA *et al.*, 2017). Assim, a Península Antártica e o grupo de ilhas que a circundam comportam não só a maior parte da riqueza de espécies de briófitas, mas também de todos os animais e plantas terrestres existentes no continente gelado (CONVEY, 2001).

As espécies vegetais antárticas adaptaram-se às condições climáticas extremas, caracterizadas pela baixa temperatura, ventos fortes, baixa disponibilidade de nutrientes e alta incidência de radiação solar, de forma que seu sistema de regulação genética e consequentes alterações de vias metabólicas podem ter levado à formação de compostos com estruturas químicas peculiares. Por se tratar de um ambiente extremo, condições adaptativas únicas compõem os organismos que habitam na Antártica (MELO *et al.*, 2014). Alguns organismos antárticos já foram estudados quanto aos compostos químicos isolados e à atividade biológica (TIAN, LI e ZHAO, 2017). Assim, pode-se destacar actinomicetas, fungos marinhos, líquens, esponjas e outros, bem como o musgo *Polytrichastrum alpinum* (Hedwig) G.L.Smith (Polytrichaceae Schwägr.).

### **2.3 *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske (Amblystegiaceae Kindb.)**

A espécie é conhecida por apresentar maior dominância no Continente Antártico e, também, ser mais bem distribuída. Há registros de ocorrência dessa planta em outras regiões no Hemisfério Norte (Europa, Ásia, América do Norte e Ártico) e no Hemisfério Sul (África e América do Sul) (SMITH, 1996; PARK *et al.*, 2018). É uma espécie que cobre grandes extensões, e que se trata de um musgo pleurocárpico capaz de formar densos e extensos tapetes, sendo essa uma estratégia que está relacionada a evitar a perda de água (TORRES-MELLADO, JAÑA e CASANOVA-KATNY, 2011; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Pode ser encontrada sozinha ou em associação com outras espécies de briófitas, como *Ditrichum hyalinocuspdatum* Cardot. e *Dicranella hookeri* (Müll. Hal.) Cardot (OCHYRA, LEWIS-SMITH e BEDNAREK-OCHYRA, 2008).

Cresce em áreas de gelo livre e tolera condições de grande instabilidade, como alta desidratação, contornando essa condição através da retenção de umidade em seus tecidos por um longo período de tempo, assim como baixa disponibilidade de concentração de nutrientes (HEBEL *et al.*, 2018). No ambiente antártico é raro encontrar musgos que produzem esporófitos, por conta das condições climáticas, da intensidade de luz, entre outros fatores. Assim, *S. uncinata* apresenta altas taxas de uniformidade genética, ou seja, é esperado encontrar grandes populações com baixa variabilidade genética, já que sua reprodução é vegetativa (LEWIS SMITH, 1984; HEBEL *et al.*, 2018).

*S. uncinata* é utilizada como bioindicador de contaminação de metais como Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Na, Ni, Pb, V e Zn, em plantas que crescem sobre suporte de rocha, na região antártica (SAMECKA-CYMERMAN *et al.*, 2010), assim como outras espécies também são estudadas com esse objetivo, na Antártica (KOLON *et al.*, 2020).

Estudos prévios realizados com a espécie demonstram que a fração aquosa tem capacidade de absorver raios no comprimento de onda da luz ultravioleta e apresenta baixa toxicidade a zebra fish e a cultura de células, e que é um material em potencial para ser usado como fotoprotetor (FERNANDES *et al.*, 2019a). O mesmo grupo ainda avaliou a fototoxicidade, genotoxicidade e fez um perfil químico

do extrato com a técnica de HPLC-DAD; concluíram a ausência de mutação induzida por luz e a presença indicativa de ácidos fenólicos, catequinas, ácidos caféico e ferúlico, orientina, homoorientina, rutina, quercetina, flavanonas e flavonas em extrato hidroalcólico (FERNANDES *et al.*, 2017, 2015). Em outro estudo, o grupo reporta a presença de carotenoides (FERNANDES *et al.*, 2011). Outros autores estudaram a capacidade antioxidante de extratos obtidos desta espécie, assim como calcularam o teor de compostos fenólicos totais, discutidos posteriormente neste trabalho (BAHTTARAI *et al.*, 2008).

## 2.4 Estudo biológico e químico em briófitas

Os compostos químicos ativos de plantas - e de animais – são também conhecidos como “compostos secundários” ou “metabólitos secundários”. Essas definições, embora usuais, conferem a esses compostos uma importância fisiológica diferente daquela conferida aos açúcares, lipídios e proteínas, que são imprescindíveis para a manutenção estrutural e fisiológica dos organismos (SIMÕES *et al.*, 2010). Porém, estudos na área de fisiologia vegetal apontam que esses compostos apresentam papel fundamental para a planta em seu meio ambiente, uma vez que são usados para auxiliar a reprodução, como mecanismo de defesa contra predadores, micro-organismos e parasitas, bem como servem como um fator de resposta da planta às condições climático-edáficas.

Embora sejam conhecidas mais de 14.000 espécies de briófitas (musgos), o número de táxons que já foram estudados em termos químicos é muito insipiente (ASAKAWA, 1995). Destaca-se estudos como os realizados com *Plagiomnium cuspidatum* (Lindb.) T.J. Kop. (Mniaceae), por Kozlowski em 1921, que registraram o primeiro flavonoide em musgos, uma saponarina. Esse composto foi isolado inicialmente de uma *Saponaria officinalis* L., que trata-se de uma angiosperma, referente a outro grupo de plantas (GEIGER *et al.*, 1997;). Os flavonoides são constituintes universais nessas plantas. Outros estudos demonstram compostos aromáticos simples como benzaldeído, álcool benzílico, ácido benzóico e ácido cinâmico e seus derivados identificados em muitos musgos. Um total de 73 flavonoides, incluindo seus glicosídeos, foram isolados ou detectados em várias espécies (ASAKAWA, 1995). Desde então, outros novos tipos de compostos

aromáticos foram isolados de musgos e Asakawa, Ludwiczuk e Nagashima os especificam em seu livro *Chemical Constituents Bryophyte* (2013).

A utilização de modelos biológicos que empregam ensaios de citotoxicidade, ensaios antimicrobianos, antioxidantes e de inibição enzimática, bem como a obtenção do perfil químico destes extratos vegetais auxiliam na explicação do papel destes compostos para a planta (SIMÕES *et al.*, 2010).

Compostos naturais, como óleos essenciais, taninos, triterpenos e flavonoides, são produzidos pelas plantas como uma das estratégias de defesa contra micro-organismos, parasitas e outros animais (KERBAUY, 2008). Esses compostos podem ser usados como medicamentos, em humanos e animais. Para isso, estudos da atividade antimicrobiana de produtos naturais têm sido feitos a partir de modelos experimentais *in vitro*, com um número extenso de micro-organismos, como bactérias, fungos e vírus. Desses estudos, alguns dos compostos mais importantes a serem introduzidos na terapêutica foram identificados, como paclitaxel, alcaloides da vinca – vincristina e vimblastina, e camptotecina foram descobertas (CRAGG e PEZZUTTO, 2016) e introduzidas na terapêutica antitumoral para o tratamento de diversos tipos de cânceres como de ovário, mama, pulmão, e demonstram que a importância dos produtos naturais ainda é significativa, e a busca por novas moléculas ativas é uma necessidade (NEWMAN e CRAGG, 2014).

Uma quantidade significativa de compostos ativos de plantas já foi reportada, porém, os estudos com briófitas ainda carecem de mais investigações. Contudo, é de conhecimento da comunidade científica que esse grupo de plantas possui princípios ativos variados e interessantes, do ponto-de-vista químico e medicinal (FERNANDÉZ, 2009). A curiosidade em analisar a composição química das briófitas foi um pouco tardia em relação a outros grupos, talvez pelo fato de serem espécies vegetais com pouca massa e de difícil identificação taxonômica. Somente a partir de 1970 que biólogos, químicos e farmacêuticos começaram a investigar e, daquilo que já se sabe, as briófitas contêm um armazém de compostos naturais (ASAKAWA, 1981; FERNÁNDEZ e SERRANO, 2009).

Muitos dos resultados significativos relativos a atividades biológicas encontradas para as briófitas se devem ao grupo das hepáticas, em virtude de seus oleocorpos (ASAKAWA, 1981), mas os musgos também apresentam prósperos resultados, como os observados para a família Mniaceae Schwägr. (ASAKAWA, 1990), cuja presença de sesquiterpenos induziu o aparecimento de dermatites alérgicas, ou a espécie *Polytrichum juniperinum* Hedw., cujos compostos apresentaram ação citotóxica e citostática (BELKIN e FITZGERALD, 1952).

O número de trabalhos que representam estudos químicos e potencial biológico de organismos antárticos e de briófitas de outras partes do mundo é crescente. Em McCleary e Sypherd analisaram 12 espécies de musgos e seu potencial antibiótico em nove microorganismos, em 1960. Basile e colaboradores, em 1999, demonstraram atividade antibacteriana a partir de flavonoides obtidos de musgos pertencentes aos gêneros *Atrichum*, *Dicranum*, *Mnium*, *Polytrichum* e *Sphagnum*, também abordados em McCleary e Sypherd, 1960. Asakawa que é um dos autores com maior contribuição de estudos químicos com brófitas, desde os anos 80 até os dias atuais, entre outros autores.

De *P. alpinum* foram isoladas duas benzonaftocantenonas denominadas ohioensinas F e G, além de outras duas conhecidas como ohioensinas A e C; todas elas são agentes inibidores não competitivos da proteína tirosina fosfatase 1B, um regulador negativo da via de sinalização da insulina (SEO *et al.*, 2008). Este último é um dos alvos atuais de possíveis novos tratamentos para o diabetes tipo 2 e pode estar, também, envolvido em algumas formas de câncer de mama. As ohioensinas A e C também já foram testadas como agentes antioxidantes (BHATTARAI *et al.*, 2009).

Outras substâncias, incluindo quatro biflavonoides, ácido p-cumárico, vanilina, p-hidroxi-benzaldeído e ácido trans-ferúlico foram isoladas do musgo cosmopolita *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. (Ditrichaceae Limpr.), e foram testadas quanto à atividade antioxidante (WATERMAN *et al.*, 2017).

Por fim, sanioninas foram isoladas de *Sanionia georgicouncinata* (Müll.Hal.) Ochyra & Hedenäs (Amblystegiaceae Kindb.), uma espécie de musgo cujos extratos apresentaram atividade anti-inflamatória e antibacteriana (IVANOVA *et al.*,

2007), como também atividade citotóxica contra células HeLa (KRZACZKOWSKI *et al.*, 2009).

A importância de focar estudos relativos às briófitas diz respeito à sua preservação e avaliação do potencial econômico. Algumas briófitas, como *Bryum cellulare* Hook. (Bryaceae Schwägr.), fazem parte da Lista Vermelha e estão em situação de vulnerabilidade. Há poucos especialistas nesse grupo de plantas, bem como é reduzido o número de estudos disponíveis, em comparação com outros, como as fanerógamas. Sendo assim, é de extrema importância entender a complexidade relativa à sua capacidade de adaptação e sobrevivência, estratégias de vida e plasticidade necessárias para ocupar diferentes habitats pelo mundo.

Em particular na região antártica, hoje vista como um sítio de pesquisas e um reservatório natural propício para entender o comportamento desses organismos e avaliar seu potencial, é preciso intensificar os estudos com a finalidade de prospectar novas substâncias com atividade biológica.

A importância de se estudar a presença de compostos ativos em briófitas antárticas se dá não só pelo entendimento da relação das espécies com o seu meio, como também para a identificação de compostos secundários que podem vir a ser usados em tratamento de doenças de interesse humano e veterinário.

Diante de um vasto cenário e com demandas urgentes em diversas áreas é possível entender sobre o conceito de Saúde Única (*One Health*). Aqui, percebe-se que a saúde de seres humanos, animais, plantas e o próprio ambiente em si estão conectadas e são interdependentes (CARNEIRO e PETTAN-BREWER, 2021). O conceito foi proposto em 2008 pela OMS em colaboração com demais organizações, essa visão unificada é extrema importância para o cumprimento de objetivos da Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável (ONU, 2020).

Trata-se de uma iniciativa interdisciplinar, abordada nos últimos 15 anos, porém desde final do século 19 alguns médicos e estudiosos já entendiam esse contexto interligado (KHAN, 2007). Tudo isso retrata a importância de colaborações entre diferentes áreas, além de conversa entre temáticas que, a primeira vista, parecem distantes mas estão relacionadas. Tudo isso tem tamanha importância na

formulação de políticas de saúde e estratégias para uma gestão pública mais eficiente e melhor governança (CARNEIRO e PETTAN-BREWER, 2021).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliação de atividades biológicas de extratos vegetais oriundos da espécie *Sanionia uncinata*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Utilizar extratos vegetais obtidos de briófitas antárticas para:

- Verificar a atividade antimicrobiana contra diferentes micro-organismos;
- Analisar sua capacidade antioxidante e captadora de radicais livres nos modelos de  $\beta$ -caroteno e difenilpicrilhidrazila;
- Avaliar a citotoxicidade contra células de tumor humano de mama e de próstata;
- Investigar a capacidade de inibição enzimática em modelos de acetilcolinesterase.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Composição da equipe de pesquisa**

Os envolvidos na pesquisa são a aluna de Doutorado Amanda Leal da Silva, a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Barbosa Suffredini e Dr. Mateus Luís Barradas Paciencia, da Universidade Paulista - UNIP, que trabalham em colaboração com o projeto Briotech, que tem como coordenador o Prof. Dr. Marcelo Ramada, da Universidade Católica de Brasília (UCB), e com o pesquisador Prof. Dr. Paulo Eduardo Saraiva Câmara, da Universidade de Brasília (UnB), coordenador do Projeto Bryoantar.

### **4.2 Estudos realizados com a espécie *S. uncinata***

#### **4.2.1 Coleta da espécie vegetal antártica**

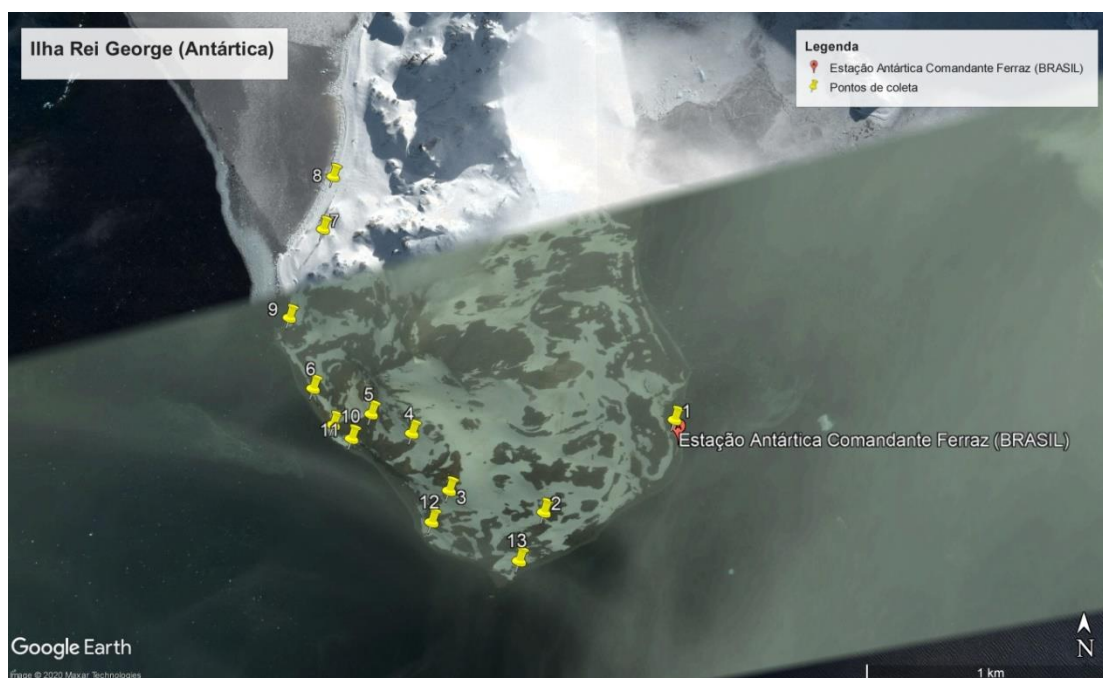
A coleta feita em campo (dezembro de 2019 – 3<sup>a</sup> fase da OPXXXVIII) foi realizada com o apoio da Marinha do Brasil, através do Navio Polar Almirante Maximiano (H-41) e de suas dependências, como o laboratório para processamento das amostras.

As amostras, encontradas sobre rocha e solo, foram coletadas na Ilha Rei George, na Península Keller, nas Shetlands do Sul. Foram obtidas amostras coletadas em 13 pontos distintos, cujas localidades foram registradas por Sistema de Posicionamento Global, ou da sigla em inglês, GPS (GPS Garmin Etrex 10 Portátil), conforme visto na Figura 2 (figura desenvolvida utilizando o Google Earth). Cerca de 13 km foram percorridos, que contemplaram áreas em diferentes altitudes, sujeitas a descongelamento da neve, como também localidades próximas a áreas com ação de spray e gotículas de água do mar.

As amostras foram retiradas de seus substratos e acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT) e identificadas com dados usuais relativos às condições de coleta e às observações peculiares, como substrato, condição de luminosidade, exposição ao vento, influência da água do mar, associação com outras espécies, entre outros. Exsicatas foram depositadas no Herbário UB, na Universidade de Brasília, onde a identificação botânica foi feita.

O material coletado foi limpo e resíduos de terra foram retirados. As amostras destinadas à extração foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  no laboratório do NaPo Almirante Maximiano, onde permaneceu até o seu retorno para o Brasil. Já as plantas separadas para exsiccatas foram depositadas em envelopes de papel, secas à temperatura ambiente dentro do laboratório (cerca de  $25^{\circ}\text{C}$ ) e reservadas no NaPo Almirante Maximiano. Novas coletas, foram realizadas durante a OPXL, executada no verão antártico de 2021/2022, em que foi possível revisitar os pontos de coleta de 2019 e, também, fazer novas coletas em outras áreas da Enseada Martel. Essa OPERANTAR ocorreu após o adiamento da ida dos pesquisadores na OPXXXIX, suspensa em virtude da pandemia do SARS-COV-2.

**Figura 2.** Pontos de coleta da OPXXXVIII na Península Keller, Antártica.



Fonte: Google Earth

#### 4.2.2 Procedimentos de coleta

Foi realizada uma ida ao campo para coleta da espécie alvo *S. uncinata*. A coleta (Figura 3) foi feita no mês de dezembro de 2019, no verão Antártico (primeira quinzena de dezembro) e realizada em um único dia, em virtude da programação

da 3ª fase da OPERANTAR e dos demais projetos que estavam programados para receberem suporte do NaPo Almirante Maximiano, cumprindo, assim, a programação de coleta para o projeto em questão. Após a coleta, as amostras foram mantidas em freezer a -80°C no NaPo Almirante Maximiano até sua chegada no Rio de Janeiro e, depois, seguiu para as dependências da Fundação Oswaldo Cruz - FioCruz, na mesma cidade. Os coletores responsáveis são Amanda Leal da Silva, Stephan Machado Dohms e Denni Moraes, os vouchers seguem com as descrições na Tabela 1 e Figura 3.

**Tabela 1:** Descrições das coletas referentes a cada amostra de *Sanionia uncinata*, da família das Amblystegiaceae, que deram origem aos extratos correspondentes.

Coleta	Substrato	Lat (S)	Long (O)	Elevação (m)
ADS02	Sobre rocha	62,0888	58,40255	34
ADS04	Sobre rocha	62,0888	58,40255	34
ADS06	Sobra rocha	62,0888	58,4101	57
ADS08	Sobre rocha	62,0864	58,4065	129
ADS09	Sobre rocha	62,0864	58,4065	129
ADS10	Sobre Rocha	62,0850	58,4167	39
ADS11	Sobre rocha	62,0864	58,4065	129
ADS12	Sobre rocha	62,0840	58,4216	3
ADS13	Sobre rocha	62,0858	58,413	94
ADS14	Sobre rocha	62,0775	58,4216	13
ADS16	Sobre rocha	62,0752	58,4210	1
ADS18	Sobre rocha	62,0812	58,4239	6
ADS20	Sobre rocha	62,0812	58,4239	6
ADS21	Sobre rocha	62,0812	58,4239	6
ADS22	Sobre rocha	62,0812	58,4239	6
ADS24	Sobre rocha	62,0855	58,4197	0
ADS26	Sobre solo	68,0850	58,4193	1

ADS28	Sobre rocha	62,0891	58,4115	4
ADS30	Sobre rocha	62,0891	58,4115	4
ADS32	Sobre rocha	62,0891	58,4115	4
ADS34	Sobre rocha	62,0891	58,4115	4
ADS36	Sobre solo	62,0905	58,4045	11
ADS38	Sobre solo	62,0905	58,4045	11
ADS40	Sobre solo	62,0905	58,4045	11

Após o período da quarentena imposta pelo SARS-COV-2, foi possível a busca das plantas e, assim, ter acesso ao material coletado e em mãos, já nas dependências do Laboratório de Extração do Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade - NPBio, na UNIP, foi possível viabilizar e dar continuidade aos trabalhos e obtenção dos extratos.

**Figura 3:** A: Habitat; B e C: Coleta de material vegetal; D: *Sanionia uncinata* com esporófitos.



Fonte: A, B e D arquivo pessoal; Foto C Denni Morais

#### 4.2.3 Obtenção dos extratos de *S. uncinata*.

Por conta desse material ter sido obtido na Antártica e em pequena quantidade, respeitando-se a biomassa disponível, foi realizado um estudo prévio com outro musgo, *Campylopus trachyblepharon* (Müll. Hal.) Mitt. (Dicranaceae Schimp.), mais abundante e de fácil acesso, para se determinar a melhor estratégia para a obtenção dos extratos e, assim, testar seu comportamento nos ensaios biológicos determinados. Os dados obtidos para esta espécie perfazem um trabalho similar ao realizado para *S. uncinata*, que constam no Apêndice 1.

Uma vez que o processo de extração (Figura 4) foi determinado com *C. trachyblepharon*, o material vegetal antártico foi seco por liofilização (liofilizador VirTis, modelo Unitop FM-25 XL) e em seguida, triturado com liquidificador. Depois, foi submetido à obtenção do extrato vegetal, pela técnica de maceração (BRASIL, 2019) de 24 h, por quatro vezes consecutivas, em um total de 96 h, com a utilização de etanol P.A. como líquido extrator. Posteriormente, um segundo processo de maceração por 24 h, por 2 vezes seguidas, foi realizado com a biomassa antártica utilizando uma mistura de hexano e acetato de etila (1:1) como sistema de solventes extratores. Os extratos foram devidamente identificados (Tabela 2), tendo sido obtidos 24 extratos etanólicos e 24 extratos a partir da mistura de hexano:acetato de etila (1:1), e foram mantidos em refrigeração a -20°C, até seu uso posterior nos ensaios biológicos.

**Figura 4:** Processo de extração das amostras. **A:** Plantas trituradas; **B:** Identificação amostras; **C:** Maceração em percolador; **D:** Amostras para evaporação.



Fonte: arquivo pessoal

Para todos os ensaios desenvolvidos nesse estudo, a título de conhecimento, os extratos etanólicos foram os utilizados nos experimentos, sendo os extratos resultado das extrações com hexano:acetato de etila depositados na extratoteca da UNIP para futuras análises.

**Tabela 2:** Identificação das amostras de extrato obtidas de *Sanionia uncinata*

Solvente extrator	ID amostras
Etanol P.A.	ADS 02, ADS 04, ADS 06, ADS 08, ADS 09, ADS 10, ADS 11, ADS 12, ADS 13, ADS 14, ADS 16, ADS 18, ADS 20, ADS 21, ADS 22, ADS 24, ADS 26, ADS 28, ADS 30, ADS 32, ADS 34, ADS 36, ADS 38 e ADS 40
Hexano e acetato de etila (1:1)	HAC 02, HAC 04, HAC 06, HAC 08, HAC 09, HAC 10, HAC 11, HAC 12, HAC 13, HAC 14, HAC 16, HAC 18, HAC 20, HAC 21, HAC 22, HAC 24, HAC 26, HAC 28, HAC 30, HAC 32, HAC 34, HAC 36, HAC 38 e HAC 40

4.2.4 Preparo das amostras de extratos de *S. uncinata* a serem testadas nos ensaios biológicos

Para a bioautografia, foram pesados 40 mg de cada extrato de *S. uncinata*, aos quais foram adicionados 400 µL de uma mistura de solventes composta por dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol (2:8), para se obter as soluções-mãe com concentração de 100 mg/mL. Os solventes foram evaporados, antes da adição dos meios de cultura inoculados, para não interferirem na análise, após os extratos terem sido aplicados sobre a placa cromatográfica.

Para os ensaios de citotoxicidade, antioxidante e de inibição de acetilcolinesterase, os extratos foram preparados na concentração de 40 mg/mL (SUFFREDINI *et al.*, 2007a, 2007b), a partir da solução preparada para os ensaios em bioautografia. Para tanto, 80 µL da solução feita para a análise de bioautografia foram transferidos para frascos de 1,5 mL, e foram liofilizados, para a retirada completa dos solventes. Depois disso, o resíduo foi diluído em 200 µL de dimetilsulfóxido 50 % em água, de modo a resultar em uma solução de concentração de 40 mg/mL.

#### 4.2.5 Análise da atividade antimicrobiana para *S. uncinata*.

##### 4.2.5.1 Extratos vegetais

Para os ensaios em bioautografia, os extratos foram preparados em uma concentração de 100 mg/mL, com a observação de que os solventes foram evaporados antes do acréscimo do meio de cultura inoculado sobre a placa de cromatografia.

##### 4.2.5.2 Difusão em bioautografia - DeB

Foram testados vários micro-organismos, em ensaios distintos, como *Candida albicans* preparada a uma concentração de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL em meio Sabouraud Dextrose ágar (MCCLEARY e SYPHERD, 1960), *Escherichia coli* (ATCC 29212) preparada a uma concentração de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL e *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) preparada a uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (BASILE et al, 1998), ambos em meio Mueller-Hinton ágar. *Streptococcus mutans* (ATCC25175) foi preparada a uma concentração de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL (BASILE et al., 1998), em meio Brain Heart Infusion ágar. Por fim, *Candida albicans* (ATCC10231) foi preparada em meio Sabouraud Dextrose agar e testada na concentração de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL, em meio Sabouraud Dextrose caldo.

Para se obter essas concentrações, os micro-organismos foram cultivados em meio de cultura ágar, em incubadora, respeitando-se a temperatura e tempo ideais de crescimento para cada um, sendo *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* cultivados por 24 h, a 36° C, e *S. mutans* cultivado por 48 h, a 36° C. Tempo e temperatura de incubação foram respeitados para cada micro-organismo, nos ensaios em bioautografia.

Placas de cromatografia em sílica gel GF254, de base de alumínio, de 5 x 5 cm foram utilizadas, sendo que cada placa foi usada para a análise de um extrato, em triplicata. Os extratos brutos foram aplicados em volume de 10 µL, com auxílio de micropipeta, em gotas, em triplicata. Os cromatogramas foram acondicionados sobre 5 mL de meio de cultura gelificado e inoculado com o micro-organismo, em placas de Petri de 12 cm. Sobre os cromatogramas, foram vertidos mais 10 mL de



meio de cultura em ágar inoculado, de modo que todo o cromatograma fosse coberto pelo meio de cultura.

Após a gelificação dos meios de cultura, as placas de Petri foram colocadas em incubadora, onde permaneceram de 18 a 24 h. Após esse período, houve a avaliação formação de halos de inibição de crescimento sobre os extratos ativos, após adição de 0,5 mL de corante de viabilidade MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, um sal de tetrazólio, preparado na concentração de 0,5 mg/mL e vertido sobre a cultura de micro-organismos. O tamanho dos halos de inibição foi obtido, sendo que, de cada halo resultante da aplicação de extrato, duas medidas perpendiculares foram tomadas. Como controle foi utilizada a clorexidina 1 %.

#### 4.2.5.3 Bioautografia unidimensional – BioU

Foram utilizadas placas de cromatografia de sílica gel GF254 de base de alumínio de 5 x 5 cm. Em cada placa de sílica, foram aplicados dois extratos. Dez µL de cada extrato foram aplicados em faixa sobre a placa, no ponto de partida, e, posteriormente, eluídos em fase móvel composta por 7 mL de clorofórmio (WAGNER; BLADT, 1996). Após retirada do solvente por evaporação, os cromatogramas foram submetidos à bioautografia.

Para se realizar a bioautografia, os micro-organismos foram cultivados em seus meios de cultura apropriados, segundo as condições de incubação determinadas para cada um, conforme descrito em 4.3.5.2.

A suspensão com a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a Gram-negativa *Escherichia coli* foram inoculadas em meio de cultura ágar estéril Müller-Hinton ágar, enquanto que *Streptococcus mutans* foi inoculada no meio Brain Heart Infusion agar. Já o meio Sabouraud dextrose agar foi usado para a levedura *Candida albicans*. Os micro-organismos foram testados na concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL para *C. albicans* (MCCLEARY e SYPHERD, 1960),  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL para *E. coli*,  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL para *S. mutans* (BASILE *et al.*, 1998) e  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL para *S. aureus* (BASILE *et al.*, 1998).

Os meios inoculados foram vertidos sobre as placas cromatográficas, que foram levadas para incubação, nas condições específicas a cada micro-organismo. A avaliação dos resultados foi feita através da identificação dos halos de inibição sobre as manchas resultantes da separação dos componentes químicos do extrato, resultantes da eluição. Para melhor visualização, foi utilizado o corante de viabilidade MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) para destacar os micro-organismos viáveis, no meio de cultura. Como controle foi utilizada a clorexidina 1 %.

#### 4.2.6 Análise da atividade antioxidante para *S. uncinata*.

##### 4.2.6.1 Extratos vegetais

Para os experimentos com  $\beta$ -caroteno e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), os extratos vegetais foram testados em concentrações de 40 mg/mL. O solvente foi evaporado na capela, antes da realização dos experimentos em autografia.

##### 4.2.6.2 Ensaio do $\beta$ -caroteno em autografia

O ensaio do  $\beta$ -caroteno foi realizado por autografia, em placa cromatográfica de 20 x 10 cm, com base de alumínio e fase estacionária composta de sílica gel GF254, quadriculada com lápis, simulando um tabuleiro de xadrez. Os extratos foram aplicados em gota, nos quadrados correspondentes, e também foram eluídos no sistema cromatográfico composto por fase estacionária de sílica gel GF254, fase estacionária composta por clorofórmio, linha de frente de 4 cm e luz ultravioleta (U.V.) 365 nm como revelador, além de nebulização com a mistura de  $\beta$ -caroteno, conforme descrito a seguir.

Para a revelação da capacidade antioxidante dos extratos foram preparadas duas soluções, A e B, misturadas no momento de serem nebulizadas sobre a placa. A solução A é composta por 9 mg de  $\beta$ -caroteno dissolvidos em 30 mL de clorofórmio e a solução B é feita com duas gotas de ácido linoleico em 60 mL de etanol, adicionadas à solução A e pós-exposição ao sol por pelo menos 6 h (SHERMA, 2018; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). A visualização da atividade antioxidante dos extratos se dá a partir do aparecimento de manchas alaranjadas

sobre as substâncias ativas em fundo esbranquiçado.

#### 4.2.6.3 Ensaio do $\beta$ -caroteno em meio líquido

Ensaio espectrofotométrico tendo como base a oxidação do  $\beta$ -caroteno resultante da degradação oxidativa do ácido linoleico, adaptado a microplacas (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Em um balão volumétrico foram adicionados 25  $\mu$ L de ácido linoleico, 200 mg de Tween 40, 100  $\mu$ L de uma solução de  $\beta$ -caroteno diluído em clorofórmio a uma concentração 20 mg/mL, mais 500  $\mu$ L de clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado da mistura com o uso do evaporador rotativo e 25 mL de água destilada sob efeito de bomba de ar, ciclando o oxigênio durante 30 minutos, foram adicionados ao resíduo. A mistura se apresentou límpida e com absorvância entre 0,6 e 0,7, medida a 470 nm. O teste, realizado em microplacas de 96 poços de fundo chato, foi feito adicionando 250  $\mu$ L da mistura do  $\beta$ -caroteno em cada poço e 10  $\mu$ L do controle e amostra. Foi feita uma primeira leitura em espectrofotômetro a 470 nm e 460 nm, no tempo zero. A partir de então, foram realizadas leituras nas placas de 30 em 30 minutos nas primeiras três horas de experimento e, posteriormente, de uma em uma hora até completar seis horas de análise. As microplacas foram colocadas em incubadora a 50° C sob efeito de luz artificial. Foi utilizado como padrão rutina 10 mg/mL.

#### 4.2.6.4 Ensaio do $\beta$ -caroteno para determinação da atividade antioxidante 50 %

O decaimento da densidade óptica (D.O.) das amostras foi correlacionada ao decaimento da D.O. do controle (rutina), medidos em absorvância para obter a atividade antioxidante (AA%), segundo a fórmula:

$$AA\% = [(Ac - A_{am} / Ac) * 100]$$

#### 4.2.6.5 Ensaio do DPPH em autografia

O ensaio do DPPH foi realizado por autografia, em placa cromatográfica de 20 x 10 cm, com base de alumínio e fase estacionária composta de sílica gel GF254, quadriculada com lápis, simulando um tabuleiro de xadrez. Os extratos foram aplicados em gota, nos quadrados correspondentes, e também foram eluídos

no sistema cromatográfico composto por fase estacionária de sílica gel GF254, fase estacionária composta por clorofórmio, linha de frente de 4 cm e luz ultravioleta (U.V.) 365 nm como revelador, além de nebulização com a mistura de  $\beta$ -caroteno, conforme descrito a seguir.

Para a revelação da capacidade captadora de radicais livres dos extratos, foi preparada uma solução metanólica de DPPH a 2 mg/mL (SHERMA, 2018; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). A visualização da atividade antioxidante se dá a partir do aparecimento de manchas esbranquiçadas sobre as substâncias ativas em fundo violeta. A rutina foi utilizada como referência na autografia.

#### *4.2.6.6 Ensaio do DPPH para determinação da atividade sequestradora de radicais livres*

Uma solução estoque de DPPH (difenilpicrilhidrazil) de 0,4 mg/mL foi preparada em metanol. A solução controle foi utilizada 10 mg/mL de rutina e feita uma divisão seriada em razão  $\frac{1}{2}$ , cinco vezes. Da mesma forma foi realizada a diluição seriada, com a mesma estratégia do controle, para as amostras de extrato antártico. Foram transferidas para as microplacas de 96 poços de fundo chato 60  $\mu$ L de DPPH e 240  $\mu$ L de controle ou da amostra. Inicialmente, foi feita uma varredura na placa sem o DPPH, apenas controle e amostras. Com a aplicação do DPPH é feita uma leitura através do leitor de Elisa a 540 nm nos tempos de zero minutos ( $T_0$ ), oito minutos e 30 minutos em cada placa. As placas ficaram sob proteção da luz para evitar foto-decomposição do DPPH.

#### *4.2.6.7 Teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu*

O reagente de Folin-Ciocalteu (FC) é adquirido em sua forma diluída e usada diretamente para a realização das quantificações. Como composto de referência foi utilizada o trolox. Uma solução mãe foi preparada a uma solução estoque de 100  $\mu$ g/mL, a partir da qual se obteve soluções em diluições seriadas de razão  $\frac{1}{2}$ , assim como os extratos (ou amostras) foram preparados em água ou em metanol ou, ainda, etanol. Para isso, foi feito uma solução com concentração inicial de 1 mg/mL e utilizado como solução mãe para se fazer soluções seriadas de razão  $\frac{1}{2}$ . Para o teste, foi adicionado 20  $\mu$ L da amostra ou da substância padrão ao poço

correspondente de uma placa de 96 poços de fundo chato. Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução Folin-Ciocalteu, agitou-se bem e houve um tempo de espera de 5 min. Depois, adicionou-se 80  $\mu\text{L}$  de uma solução de carbonato de sódio 7,5 % e misturou-se bem. A microplaca foi coberta e protegida da luz e, assim, deixada 2 h no escuro, à temperatura ambiente. Foi realizada a medição em leitor em 750 nm. Água ou solvente apropriado foram usados como branco (ZHANG *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos totais foram quantificados em Teor de Rutina (massa molecular de 610,51 g/Mol e Teor de trolox (250,29 g/Mol; SANTOS *et al.*, 2017).

#### 4.2.7 Análise da atividade inibidora de acetilcolinesterase

##### 4.2.7.1 Extratos vegetais

Para esse experimento, os extratos vegetais foram preparados a uma concentração de 40 mg/mL, que ao final do experimento, resultou em uma concentração final no poço de 4 mg/mL.

##### 4.2.7.2 Método de Ellman, modificado por Rhee, para cromatografia em camada delgada - autografia

Os extratos vegetais de *S. uncinata* foram testados pela metodologia de Rhee e colaboradores (2001), com adaptações às condições experimentais. Os extratos foram analisados em placa cromatográfica com base de alumínio e fase estacionária sílica gel GF254. A placa cromatográfica, com 20 x 10 cm de dimensões, foi quadriculada como em um tabuleiro de xadrez, em espaços regulares, nos quais as 24 amostras de extrato foram aplicadas em gotas, em casas alternadas, na placa cromatográfica, e também foram eluídos no sistema cromatográfico composto por fase estacionária de sílica gel GF254, fase estacionária composta por clorofórmio, linha de frente de 4 cm e luz ultravioleta (U.V.) 365 nm como revelador, além de nebulização com a mistura de  $\beta$ -caroteno, conforme descrito a seguir. A substância padrão utilizada foi a fisostigmina, na concentração de 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , diluída em metanol.

Para a reação enzimática, o cromatograma foi nebulizado com o substrato acetilcolina (ATCI-15 mM) em água, em solução conjunta com o reagente de

Ellman, (DTNB 3 mM em tampão Tris/HCL 50 nM, pH=8, com 0,1 M de NaCL e 0,02 M de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), seguido da nebulização com a enzima acetilcolinesterase (0,22 U/mL em tampão Tris:HCL 50 nM, pH=8, com 0,1 % de albumina bovina), sendo que entre as aplicações houve um intervalo de aproximadamente cinco minutos, para secagem da solução de proteína. Passados 5 minutos da aplicação da enzima, a coloração amarela começou a ficar evidente, assim como as manchas esbranquiçadas, que representam a ação inibidora enzimática das substâncias presentes nos extratos, que foram observadas sobre os extratos ativos.

#### *4.2.7.3 Método de Ellman para determinação da atividade inibitória enzimática 50 %*

A técnica bioquímica envolvida no método de Ellman e colaboradores (1961) ocorre em vários passos sucessivos. Baseia-se em determinar a atividade anticolinesterásica através da avaliação do quanto de tiocolina é produzida à medida que a ACh é hidrolisada pela AChE. A hidrólise origina o ácido acético e a tiocolina. A tiocolina, então, reage com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), também conhecido como reagente de Ellman, para produzir 2-nitrobenzoico-5-mercaptopiolina (dissulfeto de tiocolina-tionitrobenzoato) e o ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (tionitrobenzoato). O ânion, produto da reação, é visível pela coloração amarela e a taxa de produção do composto pode ser detectada em espectrofotômetro UV/VIS em 405 nm ou 412 nm, essa é uma medida direta da atividade enzimática, em relação à densidade óptica obtida. O substrato utilizado na reação é a ACh, análogo ao substrato acetilcolina, presente no organismo humano.

#### 4.2.8 Ensaio da atividade citotóxica contra células de tumor de mama e de próstata humanos

##### *4.2.8.1 Extratos vegetais*

Os extratos vegetais foram testados a uma diluição de 40 mg/mL. Foram testados contra quatro células, sendo três de mama e uma de próstata. As células de mama foram MCF-7 e MDA-MB-231, ambas de carcinoma de mama humano, uma não metastática e a outra metastática, e MCF-10A, célula normal de mama. A

célula de próstata é um adenocarcinoma, chamada de PC-3. Os extratos foram dissolvidos em DMSO 50 % na concentração de 40 mg/mL. As linhagens celulares MCF-7 e PC-3 foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (10 %), glutamina (2 mM), gentamicina mM, a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas em microplacas de 96 poços de fundo chato a uma densidade de 10.000 células/poço para as células de mama MCF-7, e de 7.500 células/poço para células PC-3, transferidas em 100 µL/poço. As placas foram levadas à incubação por 24 h, a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após essas 24 h, os extratos foram adicionados aos respectivos poços em cinco diferentes concentrações. Nos poços, essas concentrações foram de 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 µg/mL, acrescentados em meio de cultura RPMI1640. Depois, as placas foram novamente incubadas por mais 48 h, nas mesmas condições. Cada concentração de extrato foi testada em 6 replicatas de cada amostra. Grupos controle receberam o mesmo volume de meio RPMI. O crescimento das células tumorais foi quantificado pelo método sulforrodamina B (SRB) (MONKS *et al.*, 1991). Os resultados, analisados quanto à porcentagem de inibição de crescimento, foram utilizados para se calcular a concentração inibitória 50 %, ou IC<sub>50</sub>, para cada extrato.

Procedimento semelhante foi realizado com as células MDA-MB-231 e MCF-10A, tendo sido respeitadas as diferenças relativas à densidade celular, estimada em 10.000 células/poço para a primeira linhagem e 20.000 células/poço para a segunda linhagem, e os meios de cultura, Leybowitz 15 para a célula MDA-MB-231, cultivada com ausência de circulação de ar e sem CO<sub>2</sub>, e DMEM/HEPES suplementado com proteína colérica para a MCF-10A.

#### *4.2.8.2 Avaliação da citotoxicidade com células de tumor de próstata*

Essa análise foi realizada, a partir do modelo experimental descrito para células de tumor de mama MCF-7, com a adaptação do número de células por poço, de 7.500, para esta célula.

### **4.3 Análises estatísticas**

Para as análises em bioautografia as amostras de extrato foram testadas no ensaio da difusão em bioautografia para cada microrganismo estudado, sendo em

triplicata para a clorexidina e unicata para as amostras dos extratos, e em unicata para a bioautografia unidimensional realizada com as bactérias suscetíveis aos extratos vegetais selecionados e à clorexidina 1% usada como referência. Por conta do número baixo de amostras por grupo, o gráfico mostrado é apenas ilustrativo.

Para o ensaio da acetilcolinesterase, foram previstos três ensaios independentes com tratamentos sendo testados em duplicata, em seis concentrações diluídas em razão  $\frac{1}{4}$ . Fisostigmina foi usada como substância de referência. A hipótese nula representa a ausência de diferenças significativas entre os grupos teste (dos extratos vegetais) e o grupo da substância de referência.

A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos do  $\beta$ -caroteno e do DPPH, e a rutina foi usada como substância de referência. O ensaio do  $\beta$ -caroteno foi realizado em três repetições independentes, sendo cada extrato vegetal e suas seis diluições, feitas em razão  $\frac{1}{4}$ , foram testadas em duplicata. Para o ensaio do DPPH, somente uma análise independente foi realizada, em função da limitação da quantidade de extratos vegetais, e os tratamentos foram testados em duplicata. A hipótese nula representa a ausência de diferenças significativas entre os grupos teste (dos extratos vegetais) e o grupo da substância de referência. A atividade antioxidante foi obtida através do teste de regressão “Dose response – EC50 shift by global fitting” (GraphPad Prism7.05) para os dois testes propostos.

Para o ensaio de Folin Ciocalteu, para determinação da quantidade de fenólicos totais, um teste independente foi realizado, com as amostras sendo testadas em triplicatas. Para este teste, rutina e trolox foram as substâncias de referência. O cálculo da quantidade de compostos fenólicos totais é dado em função de rutina e de trolox, separadamente, em mg/g (SANTOS *et al.*, 2017).

Para a análise de citotoxicidade, os tratamentos foram testados por cinco vezes contra as células tumorais de mama e duas vezes contra a célula de próstata, em experimentos independentes, em sextuplicata, considerando grupo controle sem células, grupo controle com crescimento de células 100% (que representa o crescimento celular total durante o período experimental) e grupo controle com



doxorubicina, usada como substância de referência. Os dados foram calculados como porcentagem de crescimento celular, com base na fórmula  $\% \text{crescimento} = \frac{T - T_0}{C - T_0} \times 100$ , onde T=densidade óptica obtida dos poços com o tratamento; T<sub>0</sub>=densidade óptica dos poços contendo células em crescimento até o momento imediatamente anterior à adição do tratamento; C=controle de crescimento 100% (MONKS *et al.*, 1991). A concentração inibitória a 50 (IC<sub>50</sub>) foi calculada através do teste de regressão “Dose response – EC<sub>50</sub> shift by global fitting” (GraphPad Prism7.05) para os dois testes propostos.

Foram realizados ainda testes t de Student, teste t de distribuição para uma amostra e análise de variância do tipo ANOVA de um fator, seguido de teste posterior de Tukey para a comparação das médias de três ou mais grupos, nos ensaios. Todos os dados foram previamente submetidos a testes de normalidade de Shapiro Wilk.

Foram utilizados os pacotes estatísticos GraphPad Prim7.05 e RealStats, suplemento do Excel. Significâncias foram calculadas considerando-se  $\alpha < 0,05$ . A hipótese nula representa a ausência de diferenças significativas entre os grupos teste (dos extratos vegetais) e o grupo da substância de referência para todos os ensaios realizados.

## 7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com base nas avaliações realizadas no presente trabalho, pode-se concluir que *Sanionia uncinata* apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, um dos mais importantes patógenos humanos e veterinários, sendo, portanto, potencial fonte de agentes antibacterianos;

Os extratos etanólicos apresentaram potencial atividades antioxidante e sequestradora de radicais livres, possivelmente por conta da presença de compostos fenólicos;

Os extratos etanólicos de *S. uncinata* apresentaram potencial para inibir a ação da enzima acetilcolinesterase;

Os estudos relativos à atividade citotóxica contra tumores de mama demonstram que as células de mama testadas, um adenocarcinoma não metastático e um adenocarcinoma metastático foram sensíveis à ação dos extratos etanólicos, e para a célula normal de mama os extratos apresentaram citotoxicidade mais baixa. Para as células de adenocarcinoma de próstata os extratos também apresentaram alguma atividade citotóxica;

As atividades biológicas observadas para os extratos de *S. uncinata* estão possivelmente relacionadas à presença de compostos fenólicos quantificados nos extratos.

Os musgos são fonte de substâncias naturais com significativo interesse farmacológico. Em virtude disso, demonstram ser potenciais alternativas como fonte de novas moléculas ativas a serem usadas como medicamentos.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABRAZ. O que é o Alzheimer, **ABRAZ – Associação Brasileira de Alzheimer**, c2022. Disponível em: <<https://abraz.org.br/2020/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer-2/>>. Acesso em: 18 de jul. de 2022.
- ALVES, C. Q. *et al.*, Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ASAKAWA, Y. Chemical Constituents of the Bryophytes. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, [S.L.], p. 1-562, 1995. Springer Vienna. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-6896-7\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-6896-7_1).
- \_\_\_\_\_. Biologically active substances obtained from bryophytes. **The Journal of The Hattori Botanical Laboratory**, Japão, v. 5, n. 50, p. 123-142, 1981.
- \_\_\_\_\_. Biologically active compounds from Bryophytes. **Pure Applied Chemistry**, Rio Claro, v. 4, n. 79, p. 557-580, 2007.
- \_\_\_\_\_; LUDWICZUK, Agnieszka; NAGASHIMA, Fumihito. Phytochemical and biological studies of bryophytes. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 91, p. 52-80, jul. 2013. Elsevier BV.
- BAI, A.D., *et al.* Staphylococcus aureus bacteraemia mortality: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2022 Aug;28(8):1076-1084. doi: 10.1016/j.cmi.2022.03.015. Epub 2022 Mar 23. PMID: 35339678.
- BANERJEE, R. D.; SEN, S. P. Antibiotic activity of bryophytes. **Bryologist**, v. 82, n. 2, p. 141-153, 1979.
- BASILE, A. *et al.* Antibiotic Effects of Lunularia cruciata (Bryophyta) Extract. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 25-28, jan. 1998. Informa UK Limited.
- BEDNAREK-OCHYRA, H. *et al.* **The liverwort flora of Antarctica**. Polish Academy of Sciences, 2000.
- BARGAGLI, R. **Antarctic ecosystems**: environmental contamination, climate change, and human impact. Berlin: Springer, 2005.
- BATIHA, G. E. *et al.*,. Physostigmine: A Plant Alkaloid Isolated from *Physostigma venenosum*: A Review on Pharmacokinetics, Pharmacological and Toxicological Activities. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 10, n. 1-s, p. 187-19, 2020.
- BHATTARAI, H. D. *et al.* Antioxidant activity of Sanionia uncinata, a polar moss species from King George Island, Antarctica. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 12, p. 1635 - 1639, 2008.

- BHATTARAI, H. D. *et al.* *In vitro* Antioxidant Capacities of Two Benzonaphthoxanthenones: ohioensins f and g, isolated from the antarctic moss polytrichastrum alpinum. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [s.l.], v. 64, n. 3-4, p. 197-200, 1 abr. 2009.
- BRAMLEY-ALVES, J. *et al.* Dominating the Antarctic Environment: bryophytes in a time of change. **Advances In Photosynthesis And Respiration**, [S.L.], p. 309 - 324, 7 ago. 2013. Springer Netherlands. [http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6988-5\\_17](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-6988-5_17).
- BELKIN, M.; FITZGERALD, D. B. Tumor-Damaging Capacity of Plant. **Journal of the National Cancer Institute: JNCI.**, v. 13, n. 1, p. 139, 1952.
- BRASIL, 2016. Comissão Interministerial para Recursos do Mar. **Tratado da Antártica e Protocolo de Madri/Marinha do Brasil**. Secretaria da Comissão. - 2ª edição. Brasília, DF: SECIRM, 2016. 72p.
- BRASIL, 2019. Farmacopeia Brasileira 6ª Edição, Volume 2 Monografia de Plantas Mediciniais. <http://antigo.anvisa.gov.br/en/farmacopeia-brasileira>, acesso em 10 de julho de 2022.
- CÂMARA, P. E. A. S. *et al.* The moss flora of Ostrov Geologov (Geologists Island), Maxwell Bay, King George Island, Antarctica. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 52, n. 2, p. 251-255, 2017.
- CÂMARA, P. E. A. S. *et al.* The largest moss carpet transplant in Antarctica and its bryosphere cryptic biodiversity. **Extremophiles**, v. 25, n. 4, p. 369 - 384, 2021.
- CANNONE, N. *et al.*, Diversity trends of bryophytes in continental Antarctica. **Polar Biology**, v. 36, n. 2, p. 259-271, 2013.
- CARNEIRO, L. A.; PETTAN-BREWER, C. One health conceito, história e questões relacionadas – revisão e reflexão. **Pesquisa em Saúde & Ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região**, [S.L.], p. 219-240, 2021. Editora Científica Digital. <http://dx.doi.org/10.37885/210504857>.
- CASSAT, J.E., THOMSEN, I. Staphylococcus aureus infections in children. **Curr Opin Infect Dis.** 2021 Oct 1;34(5):510-518. doi: 10.1097/QCO.0000000000000752. PMID: 34524201; PMCID: PMC8630804.
- CONVEY, Peter. Terrestrial ecosystem responses to climate changes in the Antarctic. **“Fingerprints” Of Climate Change**, [S.L.], p. 17-42, 2001. Springer US. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8692-4\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8692-4_2).
- COSTA, D. P.; LUIZI-PONZO, A. P. As briófitas do Brasil. **Forzza et al.**, p. 61-68, 2010.

- COSTA, D. P.; PERALTA, D. F. Bryophytes diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1063 - 1071, 2015.
- CHEUNG GYC, BAE JS, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688. PMID: 33522395; PMCID: PMC7872022.
- CHWEDORZEWSKA, K. J. *et al.* *Poa annua* L. in the maritime Antarctic: an overview. **Polar Record**, v. 51, n. 6, p. 637 - 643, 2015.
- CHRISTCHELLYN, Klegin Rodrigues *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of ethanol extracts from *Orthostichella rigida* (Mull. Hal.) BH Allen & Magill (Bryophyta) on pathogenic microorganisms. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 3, p. 98-104, 2020.
- CRAGG, G. M.; PEZZUTO J. M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Medicine Principles and Practice**, v. 25, n. 2, p. 41 – 59, 2016.
- CROUS-BOU, M. *et al.* Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2017.
- DAVID, B. *et al.*, Discovery of new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: virtual screening and *in vitro* characterisation. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 491-496, 2021.
- DE ALMEIDA, E. C. VT *et al.* The Anticholinesterase Properties of Plants from the Northeast of Brazil Selected by an Ethnopharmacological Study for Disorders Relating to the Nervous System. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. Suppl 2, p. S195-200, 2016.
- DE FREITAS, K. E. J. *et al.*, Characterization and phylogenetic analysis of chloroplast and mitochondria genomes from the antarctic polytrichaceae species *polytrichum juniperinum* and *polytrichum strictum*. **Diversity**, v. 10, n. 3, p. 89, 2018.
- DA SILVA GOMES, H. M. *et al.* Gastos do sistema público de saúde com tratamento em oncologia. **RAHIS-Revista de Administração Hospitalar e Inovação em Saúde**, v. 18, n. 2, p. 74 - 89, 2021.
- DE MENEZES, G. C. A. *et al.*, Study of physiological and enzymatic properties and characterization of pathogenic activity of a fungus isolated from moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske in Antarctica. **Polar Biology**, v. 42, n. 4, p. 783 - 792, 2019.
- DE OLIVEIRA, M. A. G. *et al.*, Inventário de lagos glaciais nas Ilhas Nelson e Rei George, Antártica Marítima. **Caminhos de Geografia**, v. 22, n.

80, p. 119 - 132, 2021.

- DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.*, Evaluation of the antioxidant activity using the b-carotene/linoleic acid system and the DPPH scavenging method. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 446 - 452, 2006.
- ELLMAN, G. L. *et al.*, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.
- FERNANDES, A. S.; BRITO, L.B.; OLIVEIRA, G.A.R.; FERRAZ, E.R.A.; EVANGELISTA, H.; MAZZEI, J.L.; FELZENSZWALB, I. Evaluation of the acute toxicity, phototoxicity and embryotoxicity of a residual aqueous fraction from extract of the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. **BMC Pharmacology & Toxicology**, v. 20, Suppl 1, p. 77, 2019.
- FERNANDES, A.S.; MAZZEI, J.L.; OLIVEIRA, C.G.; EVANGELISTA, H.; MARQUES, M.R.; FERRAZ, E.R.; FELZENSZWALB, I. Protection against UV-induced toxicity and lack of mutagenicity of Antarctic *Sanionia uncinata*. **Toxicology**. v. 376, p. 126-136, 2017.
- FERNANDES, A.D.A.S.; ALENCAR, A.S.; EVANGELISTA, H.; MAZZEI, J.L.; FELZENSZWALB, I. Photoprotective and toxicological activities of extracts from the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 38-43, 2015.
- FERNANDES, A.D.A.S.; MAZZEI, J.L.; DE ALENCAR, A.S.; EVANGELISTA, H.; FELZENSZWALB, I. Effects of *Sanionia uncinata* extracts in protecting against and inducing DNA cleavage by reactive oxygen species. **Redox Reports**, v. 16, n. 5, p. 201-7, 2011.
- FERNANDÉZ, E. G.; SERRANO, A. M. V. **Atividade Biológica das Briófitas**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda, 2009. 96 p.
- FERREYRA, M. L. F.; SERRA, P.; CASATI, P. Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. **Physiology of the Plant**. v. 173, n. 3, p. 736-749, 2021.
- FRAHM, J. P. Manual of tropical Bryology. **Tropical Bryology**, v. 23, n. 1, 2003, 196 p.
- FOX, A. J.; COOPER, A. P. R. Measured properties of the Antarctic ice sheet derived from the SCAR Antarctic digital database. **Polar Record**, v. 30, p. 201-206, 1994.
- FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, p. 137-148, 2005.
- GANDRA, R. M.; SIMÕES, J. C. Geopolítica Antártica no século XXI: o paradigma científico-ambiental e a perspectiva liberal. **Anais do I**

**Congresso Brasileiro de Geografia Política, Geopolítica e Gestão do Território**, 2014. Rio de Janeiro. Porto Alegre: Editora Letra; Rio de Janeiro: REBRAGEO, 2014, p. 761-768. ISBN 978-85-63800-17-6.

GEIGER, H. *et al.*, The occurrence of flavonoids in arthrodontous mosses-an account of the present knowledge. **The Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, v. 83, p. 273-308, 1997.

GOFFINET, B.; BUCK, W. R.; SHAW, A. J. Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. **Bryophyte biology**, v. 2, p. 55 -138, 2009.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-47, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E.; *Journal of Laboratorial and Clinical Medicine*, v. 119, p. 598, 1992.

HEBEL, I. *et al.*, Genetic structure and gene flow of moss *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske in maritime Antarctica and Southern-Patagonia. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 152, 2018.

HENRIQUES, D. K.; *et al.*, Contributions to the bryological knowledge of ASPA 125, Fildes Peninsula, King George Island. **Biological Research**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 01-07, 30 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

INÁCIO-SILVA, M.; CARMO, D. M.; PERALTA, D. F. As espécies brasileiras endêmicas de *Campylopus* Brid.(Bryophyta) estão ameaçadas? Uma análise usando modelagem para avaliar os seus estados de conservação. **Hoehnea**, v. 44, n. 3, p. 464 - 472, 2017.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **INCA divulga estudo sobre gastos com os cânceres relacionados à obesidade no Brasil**. Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/imprensa/inca-divulga-estudo-sobre-gastos-com-os-canceres-relacionados-obesidade-no-brasil>> Acesso em: 12 de abril de 2021.

\_\_\_\_\_. Instituto Nacional de Câncer. **Gastos federais atuais e futuros com os cânceres atribuíveis aos fatores de risco relacionados à alimentação, nutrição e atividade física no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

IVANOVA, V. *et al.*, Sanionins: anti-inflammatory and antibacterial agents with weak cytotoxicity from the antarctic moss *Sanionia georgica uncinata*. **Preparative Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 343 - 352, set. 2007. Informa UK Limited.

- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 1ª Ed. Guanabara: Koogan, 2004.
- KLAUNIG, J. E. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018;24(40):4771-4778. doi: 10.2174/1381612825666190215121712. PMID: 30767733.
- KOLON, M. *et al.*, *Sanionia uncinata*, *Racomitrium lanuginosum* and *Salix herbacea* as ecological indicators of metals in Iceland. **Ecological Indicators**, [s.l.], v. 112, p. 01-08, maio 2020.
- KOZLOWSKI, A. Sur la saponarine chez le *Mnium cuspidatum*. **Compt. Rend. Acad. Sci., Paris**, v. 173, p. 429 - 431, 1921.
- KRZACZKOWSKI, L. *et al.*, Pharmacological screening of bryophyte extracts that inhibit growth and induce abnormal phenotypes in human HeLa cancer cells. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 473 - 482, ago. 2009.
- KURBATOVA, L. E.; OCHYRA, R. Two noteworthy additions to the moss flora of the Schirmacher Oasis in the continental Antarctic. **Cryptogamie Bryologie**, v. 33, n. 2, p. 159 –167. 2012.
- LARSON, R. A. Naturally Occurring Antioxidants, **Lewis Publishers**: New York, 1997, p.1.
- LENARDÃO, E. J. *et al.* Green chemistry: the 12 principles of green chemistry and its insertion in the teaching and research activities. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.
- LEWIS SMITH, R. I. Colonization and recovery by cryptogams following recent volcanic activity on Deception Island, South Shetland Islands. **Br. Antarct. Surv. Bull.** v. 62, p. 25 – 51. 1984.
- MACHADO, M. C. S.; BRITO, Tânia. **Antártica**: ensino fundamental e ensino médio. Ministério da Educação, Secretaria da Educação Básica, Brasília, v. 9, 2009. (Coleção Explorando o Ensino).
- MAKAJANMA, M. M.; TAUFIK, I.; FAIZAL, A. Antioxidant and antibacterial activity of extract from two species of mosses: *Leucobryum aduncum* and *Campylopus schmidii*. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 21, n. 6, 2020.
- MCCLEARY, J. A.; SYPHERD, P. S.; WALKINGTON, D. L. Mosses as Possible Sources of Antibiotics. **Science**, v. 131, 108. 1960.
- MELO, I. S. *et al.*, Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. **Extremophiles**, v. 18, n. 1, p. 15-23, 2014.
- MONKS, A. *et al.*, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **JNCI: Journal of the**



**National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757 - 766, 1991.

MORETA, M. P. *et al.* Efficacy of Acetylcholinesterase Inhibitors on Cognitive Function in Alzheimer's Disease. Review of Reviews. **Biomedicines**, v. 9, n. 11, p.1689, 2021.

MUNDIM, J. V. *et al.* Small areas and small plants: Updates on Antarctic bryophytes. **Acta Botanica Brasilica**, v. 35, p. 532 - 539, 2022.

MUSZER, M. *et al.* Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 63, n. 4, p. 287 - 298. Ago. 2015.

NAGASHIMA, F. *et al.* Cytotoxic and Apoptosis-Inducing ent-Kaurane-Type Diterpenoids from the Japanese Liverwort *Jungermannia truncata* N EES. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 50, n. 6, p. 808-813, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629 – 661, 2016.

OCHYRA, R.; LEWIS-SMITH, R.I.; BERNAREK-OCHYRA, H. **The Illustrated Moss Flora of Antarctic**. Cambridge: Cambridge University Press. 709 p. 2008.

OLOFIN, T. A.; AKANDE, A. O.; OYETAYO, V. O. Assessment of the antimicrobial properties of fractions obtained from bryophytes. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 5, p. 50 - 54, 2013.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Câncer de mama agora forma mais comum de câncer: OMS tomando medidas**. 3 fev. 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/pt/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action>>. Acesso em: 18 de Junho de 2022.

\_\_\_\_\_. **WHO report on cancer**: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

\_\_\_\_\_. **The top 10 causes of death**. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em Agosto 2019.

ONU, United Nations. **Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development**. 2020 Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development Disponível em: <<https://www.refworld.org/docid/57b6e3e44.html>>. Acesso em: 22 de Fevereiro de 2020.

PARK, M. *et al.* The Complete Plastome Sequence of an Antarctic Bryophyte *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske. **International Journal Of**

- Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 709, 1 mar. 2018.
- PEAT, H. J; CLARKE, A.; CONVEY, P. Diversity and biogeography of the Antarctic flora. **Journal of Biogeography**, v. 34, p. 132 – 146. 2007.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.
- PIRES, J.S. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, DOI: 10.13140/RG.2.2.29127.80809, 2017. Acesso em 25/07/2022.
- PRADO, A. G. S. Green chemistry, the chemical challenges of the new millenium. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738 - 744, 2003.
- RAHMAN, T. *et al.* Oxidative stress and human health. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 3, n. 7A, 2012.
- RHEE, I. K. *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of chromatography A**, v. 915, n. 1 - 2, p. 217 - 223, 2001.
- SAMECKA-CYMERMAN, A. *et al.* Sanionia uncinata (Hedw.) loeske as bioindicator of metal pollution in polar regions. **Polar biology**, v. 34, n. 3, p. 381 - 388, 2011.
- SAXENA, M.; DUBEY, R. Target Enzyme in Alzheimer's Disease: Acetylcholinesterase Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 264-275, 2019.
- SCHOFIELD, W. B. **Introduction to Bryology**. New York: Macmillan, 431 p. 1985.
- SEO, Changon; *et al.* Ohioensins F and G: protein tyrosine phosphatase 1b inhibitory benzonaphthoxanthenones from the antarctic moss polytrichastrum alpinum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 772 - 775, jan. 2008.
- SEPPELT, R. D.; GREEN, T. G. A. A bryophyte flora for Southern Victoria Land, Antarctica. **New Zealand Journal of Botany**, v. 36: p. 617-635. 1998.
- SHARMA, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 2, p. 1479-1487, 2019.
- SHERMA, J. Review of the Determination of the Antioxidant Activity of Foods, Food Ingredients, and Dietary Supplements by Thin Layer Chromatography-Direct Bioautography, Spectrometry, and the Dot-Blot Procedure. **Journal of AOAC International**, v. 101, n. 5, p. 1285

- 1294, 2018.

SILVA, M. P. P.; PÔRTO, K. C. Composição e riquezas de briófitas epíxilas em fragmentos florestais da Estação Ecológica de Murici, Alagoas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, 2: p. 243 -245. 2007.

SIMÕES, J. C. O ambiente antártico: domínio de extremos. In: Simões, J. C. *et al.* **Antártica e as Mudanças Globais: um desafio para a humanidade**. Série Sustentabilidade. São Paulo, Blucher, p. 15 – 27. 2011.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SIMONELLI, M.; FRAGA, C. N. Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. **Ipema**, Vitória, 146 p, 2007.

SMITH, R. I. L. Introduced plants in Antarctica: Potential impacts and conservation issues. **Biological Conservation**, v. 76, n. 2, p. 135 - 146, jan. 1996.

SUFFNESS, M.; DOUROS, John. **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 1– 14, 1982.

SUFFREDINI, I. B. *et al.* Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 379 - 384, 2004.

\_\_\_\_\_. *et al.* *In vitro* prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v. 61, n. 8, p. 722 –724. 2006.

\_\_\_\_\_. *et al.* *In vitro* breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v. 62, n. 10, p. 798–800. 2007a.

\_\_\_\_\_. *et al.* *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 223–226, 2007b.

TIAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, F.. Secondary Metabolites from Polar Organisms. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 28, 2017.

TONELLI, M. *et al.* Climate projections for the Southern Ocean reveal impacts in the marine microbial communities following increases in sea surface temperature. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 502, 2021.

TÖNNIES, E.; TRUSHINA, E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105-1121, 2007.

- TORRES-MELLADO, G. A.; JAÑA, R.; CASANOVA-KATNY, M. A.. Antarctic hairgrass expansion in the South Shetland archipelago and Antarctic Peninsula revisited. **Polar Biology**, [s.l.], v. 34, n. 11, p. 1679 - 1688, 20 set. 2011.
- TREATY, Antarctic. Antarctic Treaty. **Washington, DC: Antarctic Treaty**, 1959. Disponível em:  
>[https://documents.ats.aq/keydocs/vol\\_1/vol1\\_2\\_AT\\_Antarctic\\_Treaty\\_e.pdf](https://documents.ats.aq/keydocs/vol_1/vol1_2_AT_Antarctic_Treaty_e.pdf)<. Acesso em Agosto, 2021.
- VENTURA, A. L. M. *et al.* Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 37, p. 66-72, 2010
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 1996.
- WATERMAN, M. J. *et al.* Antarctic moss biflavonoids show high antioxidant and ultraviolet-screening activity. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 8, p. 2224 - 2231, 2017.
- WELLMAN, C. H.; GRAY, Jane. The microfossil record of early land plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1398, p. 717-732, 2000.
- WELLER, J.; BUDSON, A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. **F1000Research**, v.7, 2018.
- YABROFF, K. R.; *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part II: Patient Economic Burden Associated With Cancer Care. **JNCI**, Oct 26, 2021. DOI: 10.1093/jnci/djab192.
- ZHANG, Qing *et al.* A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. **Journal of applied phycology**, v. 18, n. 3, p. 445-450, 2006.
- ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, P. *et al.* Soluble carbohydrate content variation in *Sanionia uncinata* and *Polytrichastrum alpinum*, two Antarctic mosses with contrasting desiccation capacities. **Biol. Res.**, v. 49, n. 6, p. 01 - 09, 28 jan. 2016.