

Avaliação do efeito fotoprotetivo de Polytrichum juniperinum Hedw, Colobanthus quitensis (Kunth.) Bartl. e Deschampsia antarctica Desv. através de ensaio cometa em Helix aspersa (Müller, 1774)

BETINA KAPPEL PEREIRA¹
ANTÔNIO BATISTA PEREIRA²
ALEXANDRE C. FERRAZ³
NÁDIA TERESINHA SCHRÖDER⁴
JULIANA DA SILVA⁵

RESUMO

O aumento da incidência de raios UV-B na Antártida tem sido observado nos últimos anos devido a redução da camada de ozônio da estratosfera. As plantas possuem diferentes mecanismos de proteção contra raios UV-B, onde se inclui o acúmulo de pigmentos nas folhas. Plantas coletadas na Antártida (*Polytrichum juniperinum Hedw.*; *Colobanthus quitensis (Kunth.) Bartl.*; e *Deschampsia antarctica Desv.*) foram oferecidas *ad libitum* para *Helix aspersa* durante uma semana. O dano do DNA e a ação de fotoproteção destas plantas foram determinados através do Ensaio Cometa em células de hemolinfa. Nossos resultados demonstraram que as três espécies da Antártida apresentam efeito protetor contra

¹ Acadêmica do Curso de Química/ULBRA – Bolsista do CNPq

² Professor do Curso de Biologia e do PPG Ensino de Ciências e Matemática/ULBRA

³ Professor do Curso de Farmácia/ULBRA

⁴ Professora do Curso de Biologia e do PPG Engenharia: Energia, Materiais e Ambiente

⁵ Professora – Orientadora do Curso de Biologia e do PPG Ensino de Ciências e Matemática/ULBRA (juliana.silva@ulbra.br)

exposição à UV em *Helix aspersa*. Tais análises encaminham para testes químicos, bioorientados mostrando assim o possível poder fotoprotetor destas plantas.

Palavras-chave: *Polytrichum*, *Colobanthus*, *Deschampsia*, Genotoxicidade, Ensaio Cometa.

ABSTRACT

Ozone reductions in the stratosphere leads to selective increase in UV-B radiation at the Antarctic surface, which damages DNA. Plants have involved different strategies for UV-B radiation tolerance. Avoidance mechanisms include epidermal screening of UV radiation by accumulation of the pigments in the leaves. Plants from Antarctic (*Polytrichum juniperinum* Hedw.; *Colobanthus quitensis* (Kunth.) Bartl.; and *Deschampsia antarctica* Desv.) were offered ad libitum for *Helix aspersa* during one week. DNA damage and photoprotective action of these plants were determined by Comet assay. The results demonstrated that the three species from Antarctic show a protective effect against UV exposition for the *Helix aspersa*. Chemical analysis are been doing to determinate what compounds, and the quantity in each plant, can be related with the photoprotection observed in our study.

Key words: *Polytrichum*, *Colobanthu*, *Deschampsia*, Genotoxicity, Comet Assay.

INTRODUÇÃO

A Antártica é o ponto do planeta que mais recebe radiações solares do tipo UV-B, consequência de problemas com a camada de ozônio. Radiações deste tipo são potencialmente nocivas a saúde, danos causado por alta intensidade excedem os níveis de defesa e reparo de qualquer organismo (SCHMITZ-HOERNER & WEISSENBOCK, 2003). A UV causa estresse foto-oxidativo em todos os compartimentos celulares, além de outros efeitos que já foram observados em plantas (CHICARO et al, 2004). Respostas diretas ao estresse causado pela UV inclui peroxidação lipídica da membrana, devido a formação de radicais e dímeros no DNA (CHICARO et al, 2004). Estudos recentes com plantas têm demonstrado que estas apresentam em ambientes de estresse de radiação um aumento na produção de pigmentos de fotoproteção, como carotenóides e flavonóides.

As plantas nestes ambientes possuem dois principais mecanismos de proteção: (1) o reparo, e (2) o acúmulo destes pigmentos no tecido mesofílico (SCHMITZ-HOERNER & WEISSENBOCK, 2003).

Buscando avaliar a ação fotoprotetiva dos pigmentos encontrados nestas plantas, coletouse três espécies na Antártida, durante o verão-austral 2003/2004: (a) *Polytrichum juniperinum* Hedw. (Bryophyta); (b) *Colobanthus quitensis* (Kunth.) Bartl. (Caryophyllaceae); e (c) *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). O comportamento fotoprotetivo foi avaliado através do Ensaio Cometa em células de hemolinfa de *Helix aspersa*, os quais receberam estes vegetais durante uma semana, sendo posteriormente expostos à UV. A técnica do Ensaio Cometa ("Single Cell gel electrophoresis") é um teste de genotoxicidade que foi escolhido pôr sua capacidade de detectar danos no DNA induzidos por

agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. A versão alcalina deste teste é capaz de detectar quebras de fita única e dupla, sítios alcalilábeis, e *crosslinks*. Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre estas a necessidade de somente um pequeno número de células e de não ser necessário células em divisão (COTELLE & FÉRARD, 1999). Conhecendo a sensibilidade do teste em diferentes condições, e a capacidade de bioindicação do *Helix aspersa*, surgem as condições para desenvolvimento desse trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Indivíduos de *Helix aspersa* foram divididos em 4 grupos de aproximadamente 6 moluscos. Os grupos foram submetidos a alimentação com: (a) *Lactuca sativa* L.–alface (controle); e com as espécies antárticas: (b) *Polytrichum*; (c) *Colobanthus*; (d) *Deschampsia*. Alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*. Os indivíduos foram observados durante o tempo de tratamento (1 semana).

Células de hemolinfa foram utilizadas para o teste, preparando-se 4 lâminas/ indivíduo/ grupo de alimentação, sendo que parte foi exposta por 10 segundos a UV-germicida (30W) e parte não foi exposta (controle), avaliadas pelo Ensaio Cometa. Este teste foi realizado conforme descrito por SILVA et al (2000), com algumas modificações. O teste consiste basicamente na mistura de células em agarose sobre lâminas para microscópio, submetendo estas após lise celular a uma corrente elétrica. Esta corrente, havendo danos no DNA, faz com que os fragmentos do mesmo migrem, fazendo com que tenhamos uma imagem de célula “cometa” (célula com cauda) (Fig. 1). O DNA é corado por uma solução com prata, e analisa-se 100 células/indivíduo/tratamento (50/lâmina). Os núcleos contendo o DNA intacto são redondos (sem danos – classe 0), conquanto as células lesadas são classificadas de acordo com a cauda (de pouco dano-1 até danos máximos– classe 4). Assim, o Índice de Danos de cada grupo pode ir do zero (100X0; 100 células observadas sem danos) a 400 (100X4; 100 células observadas com dano máximo).

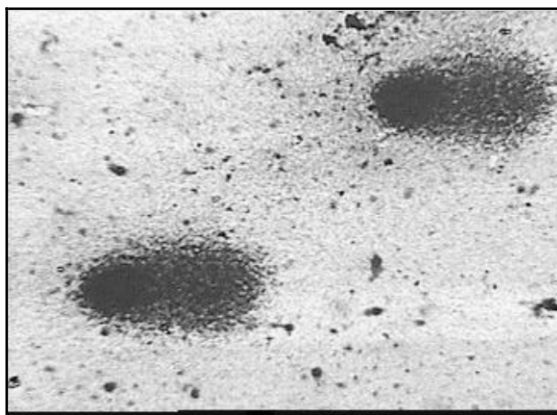


Figura 1 - Células “cometa” em *Helix aspersa*.

Para a identificação dos flavonóides foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD). Foram analisados, em sistemas eluentes distintos, os extratos metanólicos das três espécies quanto a presença de agliconas (CHCl_3 : MeOH – 9:1) e heterosídeos flavônicos (acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água - 100:11:11:26).

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados referentes ao índice de danos e respectivo desvio padrão para cada grupo avaliado está apresentado na Figura 2. Os quatro grupos foram comparados entre si, onde entre aqueles sem exposição a UV, *H. aspersa* alimentado com alface e com as três espécies de plantas da Antártida, não observou-se diferença significativa. As células de hemolinfa expostas à raios UV do grupo que recebeu alface, demonstrou aumento significativo ($P < 0,05$) de danos ao DNA em relação ao controle. Quando comparados os três grupos de espécies antárticas, este mesmo aumento significativo não foi demonstrado após exposição à raios UV. Observou-se ainda entre os grupos alimentados com *Polytrichum* e *Deschampsia* que suas células após exposição não apresentavam o mesmo valor de dano ao DNA, sendo inclusive inferior de forma significativa ao grupo alface.

A partir dos resultados encontrados, tornou-se importante conhecer e diferenciar a consti-

tuição química destes vegetais.

Os flavonóides são produtos amplamente reconhecidos por serem produzidos pelas plantas para se protegerem dos raios UV. A partir desta atividade, as análises fitoquímicas, das plantas *Deschampsia antártica* e *Colobanthus quitensis* e o musgo *Polytrichum juniperinum*, foram direcionadas para a fração mais polar, onde encontra-se estes produtos.

Comparando o perfil cromatográfico destas espécies com a espécie utilizada como referência *Lactuca sativum* [alface], verifica-se que esta espécie possui poucas agliconas e os flavonóides detectados são distintos dos encontrados para os vegetais da Antártica.

A maior proteção aos raios UV encontrada para a espécie *Deschampsia antartica*, pode ser explicada, pelo menos em parte, pela maior produção de flavonóides detectada nesta planta. Por outro lado, é interessante comentar que a espécie *Lactuca sativum*, a qual apresentou menor proteção aos raios UV possui mais flavonóides do que as espécies *Colobanthus quitensis* e *Polytrichum juniperinum*. A partir desta constatação, pode-se concluir que os flavonóides produzidos pelas espécies nativas da Antártica [*Colobanthus quitensis* e *Polytrichum juniperinum*] possuem uma maior propriedade protetora dos raios UV. Desta maneira verifica-se a necessidade em aprofundar os estudos fitoquímicos com estes vegetais, visando isolar, identificar e avaliar a capacidade protetora destes flavonóides.

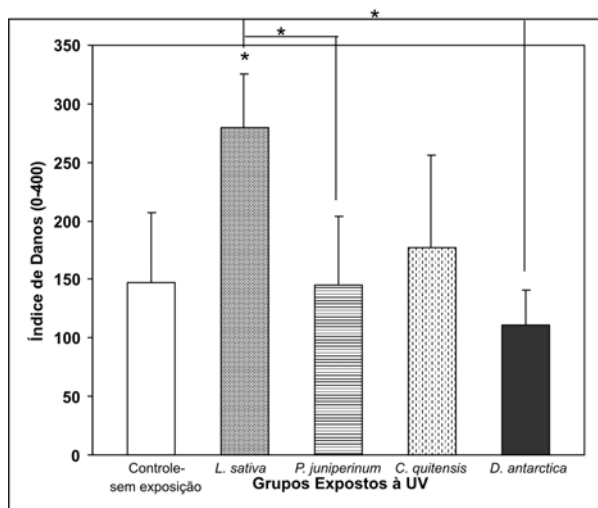


Figura 2 - Média e desvio padrão do índice de danos observados em *Helix aspersa* alimentados com alface (*L. sativum*), sem exposição e com exposição à UV, e com as espécies antárticas *Polytrichum*, *Colobanthus* e *Deschampsia*, expostos à UV. * $P < 0,05$

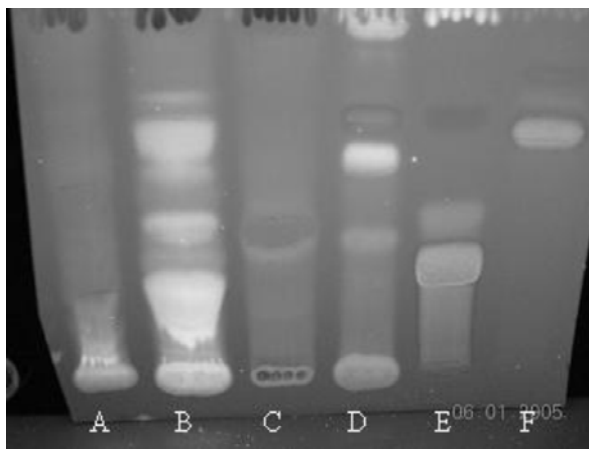


Figura 4 - “CCD em eluente para heterosídeos”. A – extrato metanólico de *Colobanthus quitensis*; B - extrato metanólico de *Deschampsia antártica* ; C - extrato metanólico *Polytrichum juniperinum*; D - *Lactuca sativum*; E – Rutina; F- Hiperosídeo.

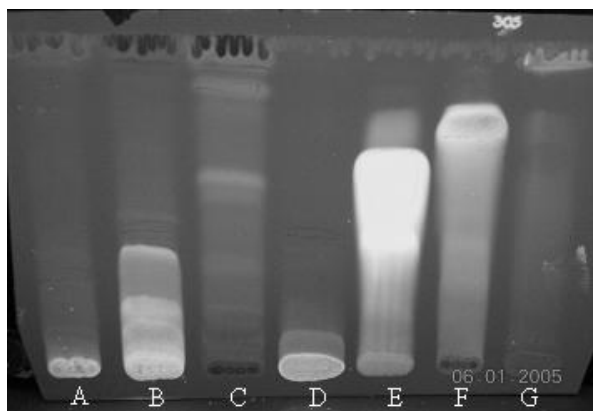


Figura 5 - "CCD em Eluente para Agliconas". Legenda: A – extrato metanólico de *Colobanthus quitensis*; B - extrato metanólico de *Deschampsia antarctica* ; C -extrato metanólico *Polytrichum juniperinum*; D - *Lactuca sativum*; E – Quercetina; F- 3-methyleterquercetina; G- 3,7 dimethyleterquercetina.

Apoio financeiro: CNPq / MMA / CIRM / ULBRA / CITOCEL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, J.; LOPES, N. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.239-243, 2004.

COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A review.

Environmental and Molecular Mutagenesis, v.34, p.246-255, 1999.

SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; MARINHO, J. R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental *in vivo* biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.241-245, 2000.

SCHMITZ-HOERNER, R.; WEISSENBOCK, G. Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV_B levels. **Phytochemistry**, v.64, p.243-255, 2003.