

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ- *CAMPUS* DE  
FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

**MARIO SERGIO BRAGA DO COUTO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E  
LUZ UV SOBRE CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO  
*Aspergillus nidulans***

Francisco Beltrão - PR  
(JUNHO/2024)

**MARIO SERGIO BRAGA DO COUTO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E LUZ UV  
SOBRE CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO  
*Aspergillus nidulans***

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Arruda

Co-orientadora: Profa. Dra. Carmem Lúcia M. S. C. Rocha

Francisco Beltrão - PR  
(JUNHO/2024)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

BRAGA DO COUTO, MÁRIO SÉRGIO  
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E LUZ  
UV SOBRE CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus  
nidulans* / MÁRIO SÉRGIO BRAGA DO COUTO; orientador GISELE  
ARRUDA; coorientador CARMEM LÚCIA MELLO SARTORI CARDOSO DA  
ROCHA. -- Francisco Beltrão, 2024.  
71 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Francisco  
Beltrão) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro  
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Aplicadas à Saúde, 2024.

1. Genética do desenvolvimento. 2. Fungo filamentoso. 3.  
Vitamina C. 4. Toxicidade. I. ARRUDA, GISELE, orient. II.  
MELLO SARTORI CARDOSO DA ROCHA, CARMEM LÚCIA, coorient. III.  
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

**MARIO SERGIO BRAGA DO COUTO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E LUZ UV  
SOBRE CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO  
*Aspergillus nidulans***

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Arruda  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Membro da banca: Profa. Dra. Franciele Aní Caovilla Folladora  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Membro da banca: Prof (a). Dr (a). Izabel Aparecida Soares  
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Junho/2019

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Gisele Arruda por sua orientação, e também, à minha co-orientadora, Profa. Dra. Carmem Lúcia M. S. C. Rocha, pelos conselhos, ensinamentos, honestidade e por sempre me tratar com paciência e carinho. Sou grato por acreditarem em mim e pelo carinho que depositaram neste trabalho.

À minha família, pai (*in memorian*), mãe e irmã, pelos conselhos, apoio, por sempre acreditar em mim e por seu amor incondicional.

Em especial, ao Charles pelo carinho, incentivo, ajuda nos experimentos e apoio em todos os momentos. Que sempre esteve presente torcendo por mim e, me dando muita força para nunca desistir dos meus sonhos.

Às minhas amigas queridas Murihellen, Meira e às colegas de mestrado Alexandra, Bruna, Chiara, Mariane, Marcieli, Priscila, Raquel e pelos momentos de descontração e alegria, pela amizade, apoio, ensinamentos, pelos valiosos conselhos e auxílio nas disciplinas.

Às Professoras Dra. Lirane Elise Defante Ferreto, Dra. Franciele Ani Caovilla Follador, Dra. Claudicéia Risso Pascotto obrigada pelas idéias de melhoria do trabalho, pelas correções, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos. Obrigada por tudo!

À todos o meu muito obrigado!

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Estrutura do ácido ascórbico.....	21
Figura 2	–	Compostos oxidados a partir do ácido ascórbico.....	22
Figura 3	–	Biosíntese do D-eritroascorbato.....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	–	Ácido ascórbico
ASC	–	Ascorbato
Cu <sup>+</sup>	–	Íon cuproso
DASC	–	D-eritroascorbato
DHA	–	Dehidroascorbato
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
EROs	–	Espécies reativas de oxigênio
Fe <sup>2+</sup>	–	Íon ferroso
GLUT1	–	Transportadores de glicose 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	–	Peróxido de hidrogênio
IDR	–	Ingestão diária recomendada
•OH	–	Radical hidroxila
NADH	–	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	–	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
RNA	–	Ácido ribonucleico
SVCT	–	Transportadores de vitamina C dependentes de sódio

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E LUZ UV SOBRE CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus nidulans*

## Resumo

O ácido ascórbico (AA) ou popularmente conhecido como vitamina C expandiu-se de forma surpreendente, sendo hoje uma das vitaminas mais frequentemente suplementadas. Essa vitamina é necessária no metabolismo de vários aminoácidos e é ainda fundamental como cofator na biossíntese de catecolaminas. Além de sua atividade antioxidante, o AA também é capaz de se comportar como um pró-oxidante em determinadas situações. O AA é um excelente agente redutor e sofre facilmente duas oxidações consecutivas de um elétron para formar seus radicais ascorbato (ASC) e dehidroascorbato (DHA). Aos valores de pH normalmente encontrados no meio intracelular, o AA encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, o ASC, sendo essa a sua principal forma no corpo humano. O objetivo do trabalho é avaliar o efeito do AA, ASC e Luz Ultravioleta (UV) sobre o desenvolvimento e crescimento de *A. nidulans* e sobre a toxicidade em células humanas HepG2 *in vitro*. Consiste em um estudo de pesquisa básica de caráter experimental do tipo quantitativo. Foram analisados o crescimento da colônia e a germinação dos conídios de *A. nidulans*. Também foram realizados testes de viabilidade de células humanas HepG2 *in vitro*. Na germinação dos conídios, foi feito *screening* inicial com as concentrações 10, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g por mL}^{-1}$  e todas as concentrações em algum momento de análise apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle. Os ensaios de crescimento vegetativo da colônia de *A. nidulans* expostas tanto ao AA quanto ao ASC mostraram alterações em várias concentrações e período de análise quando comparado ao controle. Os ensaios com AA com células HepG2 mostraram um aumento significativo na viabilidade média após 24 horas de tratamento na concentração 40  $\mu\text{g/mL}$  indicando um estímulo da divisão celular nesta concentração e tempo. Em contrapartida, ocorreu uma diminuição significativa após 72 horas de tratamento nas concentrações de 5, 10, 40 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Já nos ensaios de ASC com células as HepG2 não mostraram diferença significativa para nenhuma das concentrações e tempos testados quando comparado ao controle negativo. Quanto a citotoxicidade para a luz UV mostrou toxicidade em todos os tempos de irradiação (um, cinco, 10 e 20 s), após 24, 48 e 72 horas, quando comparado ao controle

negativo. Os resultados desta pesquisa mostram que o AA em concentrações menores aumenta o crescimento vegetativo de *A. nidulans*, possivelmente por estimular a proliferação celular, enquanto concentrações maiores parecem diminuir o crescimento vegetativo, atrasando a proliferação, ou mesmo induzindo apoptose. Para a cultura de células HepG2, o AA aumentou o crescimento em concentração menor e diminuiu o em concentração maior e o ASC não causou toxicidade para esta linhagem. Esse perfil de resposta é semelhante ao encontrado no fungo.

**Palavras-chave:** Fungo filamentosos; Genética do desenvolvimento; Radiação eletromagnética; Toxicidade; Vitamina C.

# EVALUATION OF THE EFFECT OF ASCORBIC ACID, ASCORBATE AND UV LIGHT ON HEPG2 CELLS AND THE FILAMENTOUS FUNGUS *Aspergillus nidulans*

## Abstract

Ascorbic acid (AA), commonly known as vitamin C has seen a remarkable increase in use and is currently one of the most frequently supplemented vitamins. This vitamin is necessary for amino acid metabolism and is also an essential cofactor for the catecholamines biosynthesis. In addition to its antioxidant activity, AA can act as a pro-oxidant under specific conditions. AA is an excellent reducing agent and easily undergoes two consecutive one-electron oxidations, forming ascorbate (ASC) and dehydroascorbate (DHA) radicals. At pH values normally found in the intracellular environment, AA is predominantly identified in its ionized form, ASC, which is its main form in the human body Objective: Evaluate the effect of AA, ASC, and Ultraviolet Light (UV) on the development and growth of *A. nidulans*, as well as their toxicity in human HepG2 cells *in vitro*. Consists of a basic research study with an experimental and quantitative approaches. Colony growth and conidia germination of *A. nidulans* were analyzed. Viability tests of human HepG2 cells *in vitro* were also performed. During the germination of conidia, an initial screening was performed using concentrations of 10, 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{g per mL}^{-1}$ . At various time points, all concentrations showed significant difference compared to the control. Growth assays of *A. nidulans* colonies exposed to both AA and ASC demonstrated changes at different concentrations and days of analysis compared to the control. AA assays with HepG2 cells presented a significant increase in mean absorbance after 24 hours of treatment at a concentration of 40  $\mu\text{g/mL}$ , indicating a stimulation of cell division. On the other hand, a significant decrease occurred after 72 hours of treatment at concentrations of 5, 10, 40 and 100  $\mu\text{g/mL}$ . In the ASC assays with HepG2 cells, no significant difference were observed for any of the concentrations and timepoints tested in comparison to the negative control. Regarding cytotoxicity to UV light, it showed toxicity at all irradiation times (one, five, 10 and 20 s), after 24, 48 and 72 hours compared to the negative control. The current findings have shown that AA in lower concentrations increased the growth of *A. nidulans*, possibly by stimulating cell proliferation, while higher concentrations seem to decrease growth, delaying proliferation, or inducing apoptosis. For HepG2 cell culture, AA increased growth at a lower concentration and decreased growth at higher

concentration, while ASC did not cause toxicity in this cell line. This response profile is similar to that found in the fungus.

**Keywords:** Filamentous fungus; Developmental genetics; Electromagnetic radiation; Toxicity; Vitamin C.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Geral.....	15
2.2 Específicos.....	15
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>16</b>
3.1 Tipo e local de pesquisa.....	16
3.2 Ensaio com <i>A. nidulans</i> .....	16
3.2.1 Preparo do meio sólido com AA e ASC.....	16
3.2.2 Análise da germinação de conídios.....	16
3.2.3 Análise de crescimento da colônia em meio sólido.....	18
3.2.4 Tratamento com a luz UV.....	18
3.2.5 Tratamento cruzando Luz UV e AA e Luz UV e ASC.....	18
3.2.6 Análise estatística.....	19
3.3 Teste de viabilidade de células humanas <i>in vitro</i> .....	19
3.3.1 Cultivo das células.....	19
3.3.2 Teste de citotoxicidade.....	19
3.3.2.1 Análise estatística .....	20
<b>4. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
2.1 Ácido ascórbico.....	21
2.1.1 Estrutura química e propriedades do AA e ASC.....	21
2.1.2 Absorção, distribuição e excreção.....	24
2.2 Fungo filamentososo <i>Aspergillus nidulans</i> .....	25
2.2.1 Desenvolvimento de <i>Aspergillus nidulans</i> como sistema teste.....	27
2.3 Ensaio teste com células humanas <i>in vitro</i> .....	28
2.4 Luz ultravioleta (UV) .....	28
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>
<b>6. EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E LUZ UV SOBRE CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO <i>Aspergillus nidulans</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As dietas enriquecidas com vitaminas possuem atividade antioxidante, por consequência, as células do organismo ficam protegidas contra danos que ocorrem naturalmente (Sena *et al.*, 2022). Com base nessas informações, o consumo diário de multivitamínicos aumentou consideravelmente, bem como novas formulações ou outras vitaminas de destaque com novas formas de ação. No entanto, as consequências dessa auto suplementação a longo prazo são ainda desconhecidas para a saúde (Hamishekar *et al.*, 2016).

Extraído pela primeira vez em 1928 de extratos de pimenta e glândula adrenal pelo bioquímico Albert Szent-Gorgyi, o que lhe concedeu o Prêmio Nobel em 1937, o ácido ascórbico (AA), ou popularmente conhecido como vitamina C, expandiu-se de forma surpreendente, sendo hoje uma das vitaminas mais frequentemente suplementadas (Kazmierczak-Baranska *et al.*, 2020).

Ao reciclar a atividade da vitamina E, o AA ajuda na proteção das membranas celulares, participa do sistema imunológico e facilita a absorção de minerais. Além de ser importante na formação de amins aromáticas e de neurotransmissores (Fonseca e Pentean, 2018).

O AA apresenta um grande papel na fisiologia dos seres humanos, principalmente no sistema imunológico, porém a sua administração deve ser equilibrada. Segundo Mocellin *et al.*, (2021), a administração de uma única dose elevada de AA diminui bastante o dano oxidativo ao ácido desoxirribonucleico (DNA), porém, a maioria dos estudos subsequentes de intervenção a longo prazo com AA, não relataram nenhum efeito profilático ou terapêutico em nível de dano ao DNA.

A recomendação diária de AA para adultos é de 45 mg, chegando a 55 e 70 mg para lactantes e gestantes respectivamente (Brasil, 2005). Porém, segundo Pauling (1970), em seu artigo, indivíduos chegaram a ingerir de 40 a 100g de AA por dias ou semanas sem serem prejudicados. Isso equivale de 50 a 100 vezes a quantidade recomendada atualmente pelo Ministério da Saúde. A ingestão diária recomendada (IDR), é a quantidade mínima da vitamina que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia (Brasil, 2005). Porém, segundo Manela-Azulay *et*

*al.*, (2003), doses mais elevadas são necessárias em situações diversas, tais como infecções, gravidez e amamentação, e em tabagistas.

A suplementação em altas doses de AA, pode ter efeitos opostos ao esperado, o que pode ser prejudicial. Seu excesso pode desencadear efeitos pró-oxidantes e gerar, em determinadas circunstâncias, efeitos nocivos à saúde humana (Santos *et al.*, 2018). Essa atividade pró-oxidante é devido ao aumento da produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Alexander *et al.*, 2018), pois altos níveis de AA sofrem auto-oxidação, resultando num alto fluxo de  $H_2O_2$  extracelular, em seguida, o  $H_2O_2$  se difunde nas células, iniciando cascatas oxidativas e efeitos pró-oxidantes (Du; Cullen; Buettner, 2012).

Segundo Smirnoff (2018), essa atividade pró-oxidante ocorre devido a um subproduto do AA, o ascorbato (ASC). Esse composto, possui uma atividade doadora de elétrons, portanto, em alguns casos, pode ocorrer a produção de radicais livres. Com o aumento de radicais livres, há também um aumento no risco para o organismo, uma vez que, devido à oxidação lipídica, a membrana plasmática, composta por uma bicamada de fosfolípídeos, é o principal alvo, e altamente suscetível, à agentes pró-oxidantes (Sena *et al.*, 2022).

Neste sentido, há um grande interesse em investigar o efeito dessas substâncias em diferentes organismos teste, que possam mostrar efeitos que ainda não foram avaliados sob a exposição dessas vitaminas. Nesse contexto, cita-se o fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*, que tem sido utilizado como modelo em testes para avaliar inúmeros efeitos no desenvolvimento de suas diferentes fases, além de avaliar os efeitos das variações genéticas em resposta à agentes externos (Arruda; Soares; Rocha, 2021). Além desse organismo teste, os ensaios envolvendo células *in vitro* são de extrema importância e tem seu estudo consolidado em células isoladas, em tecidos e em órgãos isolados, controlados em laboratório. Em especial as células tumorais são as mais utilizadas para descoberta e desenvolvimento de novas drogas (Itharat, 2004).

Portanto, testar os efeitos do AA e ASC em laboratório, variando suas concentrações, é fundamental para compreender os mecanismos benéficos e maléficos associados a essas substâncias, pois a vitamina C, desempenha um papel crucial no organismo humano, atuando como antioxidante e participando de diversas vias metabólicas, já o ASC, a forma ionizada do ácido ascórbico, também possui

efeitos que variam de acordo com sua concentração, podendo exercer efeitos antioxidantes em baixas concentrações, mas potencialmente induzir estresse oxidativo em níveis elevados. Portanto, testes laboratoriais que investigam os efeitos dessas substâncias em diferentes concentrações, utilizando diferentes organismos testes, são essenciais para orientar a utilização adequada e segura desses compostos, contribuindo para a promoção da saúde e prevenção de possíveis danos à saúde humana. Além disso, não foram encontrados na literatura testes do efeito de diversas concentrações de AA e ASC sobre o desenvolvimento de *A. nidulans* e toxicidade em culturas de células humanas.

Associado a estas questões, esta pesquisa propôs também investigar o efeito do AA e do ASC na presença de danos causados pela exposição pré tratamento com luz UV. A luz UV atua no material genético, produzindo alterações moleculares através de fotoprodutos formados a partir das pirimidinas. Espécies reativas de oxigênio (ROS) também são produzidas, contribuindo para o estresse oxidativo das moléculas. O dano induzido gera efeitos mutagênicos capazes de inibir mecanismos replicativos, sendo assim, o grau de prejuízo da radiação UV nos tecidos depende em grande parte da sua capacidade de penetração e o grau de absorção do tecido (Cadet e Douki, 2018).

Portanto, considerando a importância de se avaliar tais efeitos, delimitou-se como problema de pesquisa a atividade do AA e do ASC a nível celular. O AA e o ASC têm atividade tóxica em um modelo eucarioto? Quais as concentrações para ocorrer essas ações tóxicas ou não tóxicas? Há atividade citotóxica na presença de diferentes concentrações de AA e ASC? Há alteração do ciclo celular? Na presença de dano, causada pela luz UV, é possível que os efeitos do AA e do ASC sejam diferentes a nível celular?

Neste sentido, o objetivo da pesquisa é avaliar o efeito do AA, ASC e luz UV sobre o desenvolvimento e crescimento de *A. nidulans* e sobre a toxicidade em células humanas *in vitro*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito do AA e ASC sobre o desenvolvimento e crescimento de *A. nidulans* e sobre a citotoxicidade em células humanas HepG2 *in vitro*.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar efeito das soluções de AA e ASC em diferentes concentrações no ciclo celular do *A. nidulans*;
- Avaliar influência dos compostos testados no crescimento da colônia do *A. nidulans*.
- Avaliar citotoxicidade em cultivo de células humanas HepG2;
- Avaliar citoproteção em cultivo de células humanas HepG2;

### 3. MÉTODOLOGIA

#### 3.1 Tipo e local de pesquisa

Pesquisa básica de caráter experimental do tipo quantitativo, desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia, Saúde e Ambiente da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências da Saúde, campus Francisco Beltrão, Paraná. As análises de citotoxicidade foram feitas no Laboratório de Biotecnologia e Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Francisco Beltrão, Paraná. A pesquisa ocorreu entre o segundo semestre de 2022 e o primeiros semestre de 2024.

#### 3.2 Ensaio com *A. nidulans*

Os ensaios com *A. nidulans* seguirão o protocolo de Berti *et al.*, (2015). Foi utilizada a linhagem haplóide *biA1methG1*, gentilmente fornecida pela Professora Dra. Carmem Lucia M. S. C. Rocha da Universidade Estadual de Maringá.

##### 3.2.1 Preparo do meio sólido com AA e ASC

Serão utilizados: meio completo líquido (MCL) e meio completo sólido (MCS), preparados segundo Pontecorvo *et al.*, (1953). Foram preparados meio de cultura, acrescidos de AA e ASC nas concentrações: 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg por mL<sup>-1</sup> para os experimentos. Todas as soluções foram esterilizadas utilizando filtro milipore 0,22 µm.

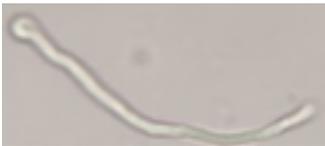
##### 3.2.2 Análise da germinação de conídios

O ensaio da germinação foi utilizado para realização do *screening* inicial com diferentes concentrações testes para então definir as concentrações para os próximos experimentos. Antes do experimento, a colônia de *A. nidulans* foi rejuvenescida em MCS e após 5 dias de crescimento, a 37°C, foram coletados conídios para realização do experimento. Os conídios foram transferidos para 0,01% (v/v) de Tween 80. Em seguida as suspensões de conídios com foram filtradas em lã de vidro estéril e contadas em câmara de Neubauer, para preparo de suspensão com 2x10<sup>5</sup>/mL conídios. A suspensão de conídios foi dividida em 14 grupos experimentais (AA e ASC

nas seguintes concentrações: 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g por mL}^{-1}$ ) mais o grupo controle, que só recebeu MCL.

Após a inoculação, 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo foi transferida para lâminas de microscopia em câmara úmida e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  e após 2, 4, 6 e 8 horas foram analisadas para a quantificação de conídios em cada uma das fases da germinação: conídio dormente, embebido, com botão germinativo e com tubo germinativo/germinado (Tabela 1).

Tabela 1 - Fases da germinação e tamanho médio de conídios de *A. nidulans*.

Nomenclatura	Imagem	Tamanho médio
Conídio Dormente (D)		$2,65 \pm 0,18 \mu\text{m}$
Conídio Embebido (E)		$4,11 \pm 0,58 \mu\text{m}$
Conídio com Botão Germinativo (B)		$7,84 \pm 0,80 \mu\text{m}$
Conídio com Tubo Germinativo Pequeno (P)		$22,71 \pm 6,38 \mu\text{m}$
Conídio com Tubo Germinativo Médio (M)		$50,22 \pm 4,24 \mu\text{m}$
Conídio com Tubo Germinativo Grande (G)		$83,64 \pm 11,18 \mu\text{m}$

As lâminas de cada condição foram analisadas pelo microscópio óptico em cada tempo. Em cada leitura foram analisados, randomicamente, aproximadamente 500 conídios e calculadas as porcentagens de conídios em cada uma das fases. Na leitura de oito horas foi feita uma estimativa da sobrevivência, considerando-se vivos apenas os conídios com tubo germinativo e uma estimativa de conídios germinados malformados.

Foram consideradas malformações conídios onde o primeiro tubo germinativo se bifurcava, ou segundo tubo iniciava sua formação precocemente ou em ângulo diferente de  $180^{\circ}$  ou quando formavam-se mais que dois tubos, além de outras

alterações presentes. A contagem das células foi feita em microscópio óptico, com aumento final de 400x, por meio de captura de imagem (Canon EOS Rebel 3TI), com adaptador SLR/DSLR NDPL-2 (2x), para microscópio binocular. Foi utilizado o Software Fiji J para medição dos conídios. Este teste foi feito em triplicatas em três ensaios independentes para todos os grupos experimentais.

### 3.2.3 Análise de crescimento da colônia em meio sólido

Antes do experimento, a colônia de *A. nidulans* foi rejuvenescida em MCS e após 5 dias de crescimento, a 37°C, foi inoculada em MCS contendo AA ou ASC ou controle (apenas MCS). As colônias foram acompanhadas por 7 dias, onde foi medido o diâmetro de crescimento a cada 24 horas. Com estes dados, foi estimada a velocidade de crescimento da colônia com e sem o AA e ASC, para avaliar a resposta do crescimento vegetativo da linhagem na presença dessas vitaminas. Durante todo o experimento as colônias foram mantidas em estufa a 36°C. Esse experimento foi feito em triplicata em 3 ensaios independentes.

### 3.2.4 Tratamento com a luz UV

Antes da exposição à luz UV, a colônia de *A. nidulans* foi rejuvenescida em MCS e após 5 dias de crescimento, a 37°C, foi inoculada em MCS contendo AA ou ASC ou controle (apenas MCS). Após inoculação, as placas foram inseridas em uma cabine com luz UV (5 Joules/m<sup>2</sup>/s) (lâmpada modelo Mineralight UVSL-25, 115 volts, 60H, 0,16 Amps), abertas expondo o inóculo à luz nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 segundos. Após esse procedimento, as colônias foram mantidas à 37° C e acompanhadas durante 7 dias, onde media-se o diâmetro da colônia a cada 24 horas, a fim de estimar a velocidade de crescimento da colônia após exposição a esse agente físico.

### 3.2.5 Tratamento cruzando Luz UV e AA e Luz UV e ASC

Antes da exposição à luz UV, a colônia de *A. nidulans* foi rejuvenescida em MCS e após 5 dias de crescimento, a 37°C, foi inoculada em MCS contendo AA 5 µg por mL<sup>-1</sup> ou ASC 5 µg por mL<sup>-1</sup> ou controle (apenas MCS). Após inoculação, as placas foram inseridas em uma cabine com luz UV (5 Joules/m<sup>2</sup>/s) (lâmpada modelo Mineralight UVSL-25, 115 volts, 60H, 0,16 Amps), abertas expondo o inóculo à luz no tempo de 20 segundos. Após esse procedimento, as colônias foram mantidas à 37° C

e acompanhadas durante 7 dias, onde media-se o diâmetro da colônia a cada 24 horas, a fim de estimar a velocidade de crescimento da colônia após exposição a esse agente físico e estimar se o efeito do AA e do ASC mudam na presença de dano causado pela luz UV.

### 3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à comparação de médias, utilizando como referência o erro padrão da média (EPM). Foram comparadas as médias das fases da germinação dos tratamentos *versus* o controle através de ANOVA (Two-way) com pós-hoc Bonferroni. A análise de crescimento e a diferença de crescimento da colônia tratada com AA, ASC e luz UV foi feita comparando-se o tratamento *versus* o controle através de ANOVA (Two-way) com pós-hoc Dunnet. O cruzamento entre luz UV e AA e luz UV e ASC foi feita comparando-se o todos os grupos experimentais relativos ao experimento através de ANOVA (Two-way) com pós-hoc Tukey. Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 9.5.1, com significância definida como  $p < 0,05$ .

## 3.3 Teste de viabilidade de células humanas *in vitro*

### 3.3.1 Cultivo das células

As células HepG2, derivadas de fígado humano, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementando com 10% de soro fetal bovino, e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3.2 Teste de citotoxicidade

Para verificar a viabilidade celular foi realizado o ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 brometo de difenil tetrazólio) de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações.

Uma quantidade de 10<sup>4</sup> células foram cultivadas por poço, em placas de cultura celular de 96 poços, com 100 µL de meio de cultivo suplementado, por 24 horas. Após estabilização, o meio de cultivo foi descartado e adicionado meio completo com os seguintes tratamentos: meio de cultivo (controle negativo - CO-), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS – 150 µM - CO+), e tratamentos com ácido ascórbico e

ascorbato nas concentrações 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg por mL<sup>-1</sup> de meio de cultivo.

Então, as placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após cada período, o tratamento foi substituído por meio de cultura acrescido de MTT (0,167 mg mL<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas por mais quatro horas e o meio com MTT foi substituído por 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitura de microplacas (Thermo Plate) a 492 nm.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão entre a absorbância do tratamento e a absorbância do controle negativo, de acordo com a equação 1.

$$VC = \left( \frac{ABS_T}{ABS_{C0-}} \right) \times 100 \quad VC = \left( \frac{ABS_T}{ABS_{C0-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

$ABS_T$  = Absorbância do tratamento;

$ABS_{C0-}$  = Absorbância do controle negativo.

### 3.3.2.1 Análise estatística

Os valores das absorbâncias foram submetidos ao teste de normalidade, a análise de variância (*one way ANOVA*) e ao teste de comparação de médias de Dunnet ( $\alpha = 0,05$ ), pelo *software Action Stat*, com significância definida como  $p < 0,05$ .

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 Ácido ascórbico

O AA é uma molécula neutra de cor branca, inodora, hidrossolúvel e pouco solúvel em solventes orgânicos. É também um antioxidante incomum, pois doa um único equivalente redutor, e o radical que forma, reage preferencialmente com radicais em vez de compostos não radicais (Vannucchi; Rocha; Takeuchi, 2012).

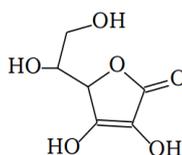
Como micronutriente essencial, o AA desempenha um papel vital na manutenção dos processos metabólicos normais e da homeostase no ser humano (Yin *et al.*, 2022). O AA é um poderoso antioxidante e atua na prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Diretamente age com a molécula alvo e indiretamente, atua como cofator de enzimas responsáveis pela diminuição de radicais livres. (Anschau, 2016).

Está sendo estudada extensamente em relação ao seu papel como antioxidante. Sua forma oral está associada a uma diminuição de risco para certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e cataratas, bem como na cicatrização de feridas e modulação imune (Cavalari e Sanches, 2018).

#### 4.1.1 Estrutura química e propriedades do AA e ASC

O AA possui fórmula química  $C_6H_8O_6$ , e sua estrutura foi elucidada em 1933, por Haworth e Hirst (Anschau, 2016). Essa estrutura pode ser observada na Figura 1. Caracteriza-se como uma cetolactona de 6 carbonos, estruturalmente relacionada com a glicose e outras hexoses. Se oxida reversivelmente no organismo à dehidroascorbato (DHA) e ASC (Du; Cullen; Buettner, 2012).

Figura 1. Estrutura do ácido ascórbico



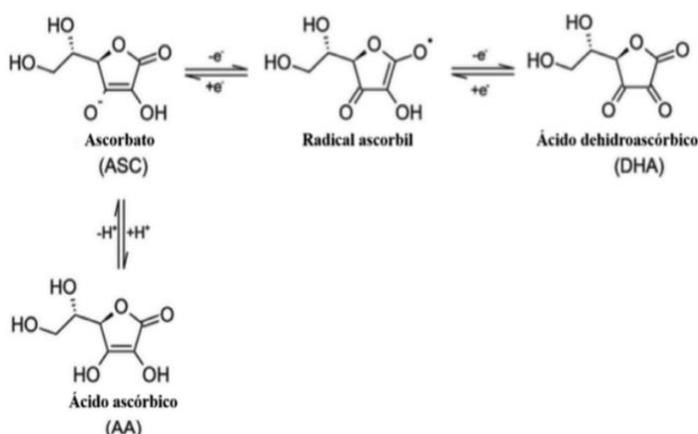
**Fonte:** (Anschau, 2016).

O AA é um excelente agente redutor e sofre facilmente duas oxidações consecutivas de um elétron para formar o radical ASC e DHA. O AA é relativamente

pouco reativo devido à estabilização de ressonância do elétron desemparelhado; prontamente dismuta em ascorbato e DHA. Assim, o ASC é a forma dominante em pH fisiológico (Du; Cullen; Buettner, 2012). Aos valores de pH normalmente encontrados no meio intracelular, o AA encontra-se predominantemente na sua forma ionizada, o ASC, sendo essa a sua principal forma no corpo humano (Ribeiro, 2019).

Dependendo do pH e do estado de oxidação, o AA tem várias formas, mas o ASC e DHA são as de maior importância fisiológica. Ambos podem ser reduzidos novamente à AA por ação de redutases específicas e elétrons de glutathiona, NADH ou NADPH no ciclo ascorbato-glutathiona (Anschau, 2016). Esse processo pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Compostos oxidados a partir do ácido ascórbico



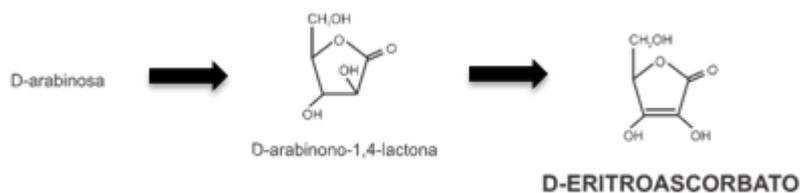
**Fonte:** Adaptado (Vannucchi; Rocha; Takeuchi, 2012).

Os seres humanos e alguns outros primatas dependem do AA em sua dieta devido à perda de uma forma funcional da enzima gulonolactona oxidase, sem essa enzima, não ocorre a síntese, a partir da glicose, do AA e seus produtos (Kazmierczak-Baranska *et al.*, 2020; Carr e Maggini, 2017).

A maioria das plantas e animais tem habilidade de sintetizar a vitamina C a partir da D-glicose ou D-galactose, via ácido glucurônico (Vannucchi; Rocha; Takeuchi, 2012). Já os fungos divergem de outros organismos na síntese de ASC, produzindo o D-eritroascorbato, um análogo do ASC (Smirnov, 2018), um composto com 5 átomos de carbono, com estrutura e propriedades físico-químicas similares ao ASC. O D-eritroascorbato pode ser utilizado no lugar do ASC em vários processos industriais, porém, não possui a mesma atividade biológica em seres humanos (Larrainzar, 2010).

A necessidade de ASC impulsionou a evolução de pelo menos três vias biossintéticas diferentes e a produção de D-eritroascorbato (DASC) em fungos (Figura 3). Dada esta situação é interessante que se enfatize as funções de ASC em mamíferos e particularmente em trabalhos utilizando células cultivadas de mamíferos, tem como foco seus efeitos pró-oxidantes (Smirnoff, 2018). Como o DASC parece ser o análogo do ASC presente em fungos, é provável que a atuação nestes microrganismos funciona de forma semelhante ao ascorbato. A pesquisa mostrou que o DASC funciona como um antioxidante (Spickett; Smirnoff; Pitt., 2000).

Figura 3. Biossíntese do D-eritroascorbato



**Fonte:** Adaptado (Du; Cullen; Buettner, 2012).

O ASC é mais conhecido por sua função como antioxidante e por seu papel na síntese de colágeno. Sendo que deficiência de colágeno resulta nos sintomas do escorbuto, que é a principal manifestação clínica da deficiência de AA e seus produtos (Smirnoff, 1996).

O radical ASC é relativamente não reativo devido à estabilização de ressonância do elétron desemparelhado (Du; Cullen; Buettner, 2012). O DHA, sua forma oxidada, é absorvido mais rapidamente do que o ASC, sendo que sua função é dependente do ASC e não foi totalmente elucidada (Smirnoff, 1996).

O produto de oxidação de um elétron do ASC é provavelmente o determinante chave de seu papel biológico. Devido à estabilidade, ele não reage prontamente com oxigênio ou outras moléculas para gerar mais radicais reativos e, portanto, é muito eficaz como um sequestrador de radicais (Smirnoff, 2018).

#### 4.1.2 Absorção, distribuição e excreção

A principal forma de AA nos organismos é o ASC, nas plantas e na maioria dos animais, ele é sintetizado a partir da glicose (Du; Cullen; Buettner, 2012). Os fungos produzem o D-eritroascorbato a partir da D-arabinose (Smirnoff, 2018), e para os seres humanos e alguns primatas, a obtenção dessa vitamina deve ser feita a partir da ingestão de alimentos que a contenha (Carr e Maggini, 2017)

As principais fontes de AA estão no reino vegetal, tais como os vegetais folhosos, os legumes e as frutas. Em geral é nesse reino o local de mais fácil obtenção dessa vitamina, mas pode ainda ser encontrada em menor quantidade no reino animal, como no fígado e rins de carnes bovinas, suínas e de peixes e no leite de vaca (Fonseca e Pentean, 2018).

Diferente da maioria dos compostos de baixo peso molecular, a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do AA em humanos é altamente complexa (Ribeiro, 2019). Após a sua ingestão, a absorção ocorre na cavidade oral, estômago e intestino delgado respectivamente (Figuroa-Mendez e Rivaz-Arancibia, 2015).

O transporte celular do AA, ASC e DHA é mediado por transportadores que variam de acordo com o tipo de célula. A maior parte da captação intestinal, distribuição e recaptção renal é mediada pela família de transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT) e GLUT1. Essas proteínas co-transportam íons sódio junto ao AA através das membranas (Lykkesfeldt e Tveden-Nyborg, 2019).

A administração intravenosa de ASC ultrapassa o rígido controle do intestino e da excreção renal, sendo que essa forma de administração induz níveis plasmáticos elevados, não alcançáveis através da sua suplementação oral (Smirnoff, 2018).

O mecanismo de regulação é a excreção renal de AA ou dos seus metabólitos. Os principais produtos do metabolismo do AA excretados na urina, além de sua forma inalterada, são o DHA, o ácido oxálico e o ácido 2,3-dicetogulônico, cujos teores na urina são variáveis e relacionados com a dose de AA ingerida (Ribeiro, 2019).

O DHA possui forma molecular semelhante à glicose, portanto, seu produto de degradação tem facilidade de absorção, são rapidamente transportados em pouco tempo, enquanto o ASC requer SVCTs e podem levar várias horas (Du; Cullen; Buettner, 2012). Após a oxidação do AA, as maiores concentrações do ASC ocorrem nas células do sistema nervoso central, nos olhos, nos fagócitos e na glândula

suprarrenal, que são tecidos particularmente expostos ao estresse oxidativo (Smirnov, 2018).

A ocorrência de ASC em neurônios está relacionada à alta taxa de respiração aeróbica que pode levar a produção de superóxido nas mitocôndrias. Os níveis encontrados nos tecidos oculares, geram proteção à possíveis danos causados pela radiação solar e finalmente nas células secretoras de epinefrina e medula adrenal, o ASC é um redutor fisiológico na reação que converte a dopamina em norepinefrina (Du; Cullen; Buettner, 2012).

#### 4.2 Fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*

O reino fúngico engloba uma enorme variedade de espécies que garantiram nichos ecológicos como simbioses, patógenos e decompositores. Os fungos representam alguns dos maiores produtores de metabólitos secundários que foram refinados evolutivamente para interagir com macromoléculas biológicas, impedir o ataque do hospedeiro, comunicar com microorganismos vizinhos e se protege de toxinas (Caesar; Kelleher; Keller, 2020).

O *A. nidulans* é um fungo pertencente ao filo *Ascomycota*, que se propaga através de esporos sexuais (ascósporos) e assexuais (conídios) (Kumar, 2020; Geiser; Arnold; Timberlake, 1994). É composto por mais de 300 espécies e tem um notável impacto medicinal e comercial dentro deste gênero, sendo assim, *A. nidulans* recebeu amplo reconhecimento como um modelo eucarioto (Samson et al., 2014).

Sendo inicialmente reconhecido por Pontecorvo et al., (1953) como excelente candidato para experimentos genéticos, esse organismo pode ser utilizado em estudos sobre regulação gênica e mutações em ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, devido ao seu acelerado crescimento em meios definidos, com resultados fenotipicamente fáceis de identificar.

Esse organismo tem sido objeto de estudo de milhares de trabalhos e pesquisas, e tem avançando significativamente a compreensão da fisiologia e desenvolvimento celular, enzimologia, estrutura da cromatina, reparo de DNA, recombinação, biologia celular, metabolismo primário e regulação das vias metabólicas (Caesar; Kelleher; Keller, 2020).

O ciclo de vida de *A. nidulans* progride tanto em fases de reprodução sexuada quanto assexuada e esses estágios são controlados por diversos fatores ambientais,

como luz, oxigênio e disponibilidade de nutrientes. Sendo assim, seu ciclo de vida pode ser dividido nas seguintes fases: assexual, sexual e parassexual (Adams; Wieser; Yu, 1998; Timberlake e Clutterbuck, 1994).

A fase assexuada, ou conidiogênese, consiste na produção de esporos assexuados, os conídios, a partir de estruturas diferenciadas, os conidióforos. Após 12 horas de crescimento vegetativo, a hifa ramificada, diferencia-se em um conidióforo, estrutura assexual de *A. nidulans*. Ocorre a transformação de uma célula hifa em uma célula pé, que é uma estrutura que sustenta e desenvolve o conidióforo (Adams; Wieser; Yu, 1998). A região apical da haste é rica em vesículas, as quais possuem substâncias que auxiliam na manutenção e desenvolvimento da membrana celular. Essas vesículas fundem-se à membrana e promovem o aumento da haste do conidióforo (Gooday, 1983).

As vesículas do conidióforo possuem vários núcleos que passam por divisão mitótica, em seguida surgem protuberâncias nessas vesículas, estas estruturas são chamadas de métulas da vesícula (Adams; Wieser; Yu, 1998). Enquanto os núcleos da métula sofrem mitose, o núcleo gerado pela mitose, migra para a sua ponta formando as fiálides, sendo assim, um núcleo vai para a fiálide e o outro permanece na métula. Ao completar seu desenvolvimento, no ápice das fiálides, ocorre então, a formação dos conídios (Timberlake e Clutterbuck, 1994).

A fase sexuada ou ascosporigênese, geralmente começa após conidiação assexuada e estimulada pela limitação de oxigênio e falta de luz. O primeiro sinal visível da diferenciação sexual, é o aparecimento das células hüille. Essas células especializadas cercam uma frutificação fechada gerada pelo *A. nidulans*, corpo conhecido como cleistotécio (Kumar, 2020).

Além do desenvolvimento do cleistotécio, ocorre também a formação dos ascos com 8 esporos binucleados. O ciclo se inicia a partir da extremidade das hifas, onde o núcleo diploide, sofre meiose e dá origem a 4 células haplóides. Em seguida cada núcleo sofre divisão mitótica, gerando 8 células, e cada uma dessas estruturas, sofre então nova mitose, tornando-se binucleado, que, por fim, será envolvido por uma membrana chamada de asco (Adams; Wieser; Yu, 1998).

Por fim, o ciclo parassexual, envolve essencialmente a anastomose de hifas, é um mecanismo que faz com que diferentes núcleos ocupem um citoplasma em comum. A variabilidade genética é gerada pela transferência de material nuclear por

essas conexões. Após a anastomose, ocorre a fusão de dois núcleos haplóides diferentes formando um diplóide heterozigoto. Finalmente, ocorre a multiplicação dos núcleos, gerando recombinações mitóticas, os produtos da multiplicação recombinante podem permanecer, e se multiplicar no estado diplóide ou gerar recombinantes haplóides (Pontecorvo *et al.*, 1953).

#### 4.2.1 Desenvolvimento de *Aspergillus nidulans* como sistema teste

Quando se trata sobre fungos, os genomas de mais de mil espécies estão disponíveis publicamente. Esse fato impulsionou análises evolutivas sistemáticas, desenvolvimento de análises diagnósticas mais rápidas e precisas de cepas patogênicas e o aprimoramento de diversos processos biotecnológicos (Etxebeste e Espeso, 2020).

O *A. nidulans* tem sido utilizado como modelo em testes para avaliar o efeito de agentes físicos e químicos no desenvolvimento de suas diferentes fases (Arruda; Soares; Rocha, 2021). Com seu genoma completamente sequenciado, o *Aspergillus nidulans* se destaca como um excelente modelo de sistema fúngico. Este organismo tem sido amplamente estudado para manipulação genética, bem como para a síntese e secreção de diversos tipos de macromoléculas (Kumar, 2020). Desde os primeiros estudos publicados por Pontecorvo *et al.* (1953), o *A. nidulans* continua sendo um dos modelos mais referenciados entre os fungos filamentosos. Suas aplicações abrangem diversas áreas de pesquisa, incluindo morfogênese de hifas, transporte intracelular, programas de desenvolvimento, metabolismo secundário e resposta ao estresse (Etxebeste e Espeso, 2020).

Esse fungo possui um sofisticado mecanismo de regulação da expressão de genes que coordenam a germinação, por isso a germinação de conídios é um instrumento de observação do efeito de diversos fatores sobre os mecanismos de regulação desta cascata de eventos (Pontecorvo, 1953; D'enfert, 1997).

A germinação do esporo acontece em três fases, inicialmente ocorre a ativação do esporo dormente, em seguida o crescimento da parede celular e a expansão conidial, que é dirigida pela entrada de água e substratos do meio, por último ocorre divisões mitóticas que iniciam o crescimento polarizado do tubo germinativo (Osharov; May, 2000). A fase em que o botão germinativo brota marca a ativação do ciclo celular, resultado da primeira mitose do núcleo original do conídio e o eixo que se estabelece

nessa fase é o eixo principal para o desenvolvimento polarizado da fase seguinte (D'énfert, 1997).

O estudo da germinação de *A. nidulans* é usado para verificar o efeito de compostos sobre o desenvolvimento desse organismo. Os parâmetros avaliados são a velocidade de cada etapa da germinação determinada pela porcentagem de conídios dormentes, embebidos, com botão germinativo e germinados, porcentagem de conídios não germinados (mortos) e de conídios germinados malformados após 8 horas de germinação (Berti *et al.*, 2015; Guidoti, 2015).

Cada linhagem de *A. nidulans* apresenta uma velocidade de crescimento da colônia de acordo com o meio de cultura a que é submetido. Este crescimento é padrão e pode demonstrar o efeito de inibição ou de aceleração provocado por fatores ambientais ou por substâncias em estudo. Outros parâmetros que são utilizadas nos bioensaios empregando esse organismo são a medida de diâmetro de colônia a cada 24 horas durante 10 dias e peso úmido do micélio (Berti *et al.*, 2015)

#### 4.3 Ensaio teste com células humanas *in vitro*

A cultura de células ganhou grande importância no século XIX, quando se descobriu um método de manter as células vivas em ambientes artificiais, ou seja, fora do organismo de origem, permitindo avaliar variáveis após exposição dessas células a diferentes concentrações das substâncias químicas citadas. A viabilidade celular é utilizada para avaliar efeitos citotóxicos de agentes externos que podem comprometer o metabolismo ou ainda levar as células à morte (Verma; Verma; Singh, 2020).

A determinação do número de células viáveis tem sido muito utilizada para analisar os efeitos carcinogênicos de compostos químicos, efeitos de solventes e concentração de compostos tóxicos (Roger *et al.*, 2003).

Atualmente, é um dos métodos laboratoriais mais usados na investigação de potenciais agentes citotóxicos e mutagênicos, caracterização de células cancerosas, terapias gênicas, produção de vacinas e no próprio estudo da biologia celular (Verma; Verma; Singh, 2020).

#### 4.4 Luz ultravioleta (UV)

A luz ultravioleta (UV) pode agir de forma eficaz como um agente desinfetante, descontaminando superfícies onde há a presença de microrganismos. Entretanto,

sabe-se também que o uso indiscriminado de UV em humanos pode causar catarata, queimaduras, câncer ou envelhecimento prematuro da pele (Welch *et al.* 2018). Seu poder descontaminante, está intimamente atribuído à geração de foto dímeros indutores de UV nos genomas, afeta quaisquer células expostas à esse agente físico. É também um exemplo de mutágeno físico, não ionizante, pois possui a capacidade de dissipar sua energia para os átomos que encontra, elevando os elétrons a níveis de alta energia, ou seja, elétrons excitados. (Visba, Barros; Hernandez, 2021).

A luz UV têm diferentes nomenclaturas dependendo do comprimento de onda onde se encontram, podendo ser classificadas segundo Carvalho *et al.* (2022) como: UV-A, que cobre a faixa entre 320 nm e 400 nm, correspondente a cerca de 95% da luz ultravioleta existente e capaz de penetrar na pele humana, a UV-B que fica entre 280 nm e 320 nm que pode causar mutações genéticas resultando em câncer de pele. E por fim, a luz UV-C se situa entre 200 nm e 280 nm é capaz de destruir o RNA e o DNA de microrganismos, sendo considerada a mais danosa.

A luz UV atua no genoma e provoca alterações moleculares através de fotoprodutos, e a formação desses fotoprodutos correspondentes a UV-A, UV-B e UV-C, gerando danos mutagênicos capazes de inibir seus mecanismos celulares (Visba, Barros; Hernandez, 2021). A radiação por luz UV pode agir eficazmente como um descontaminante, entretanto, a ação do UV-C é limitada à superfície dos materiais irradiados, sendo que a sua eficácia na destruição de possível carga viral presente internamente nos alimentos é restrita (Carvalho *et al.* 2022).

## 5. REFERÊNCIAS

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology**. v. 62, n. 1, p. 35-54, 1998.

ALEXANDER, M.S. et al. Pharmacologic Ascorbate Reduces Radiation-Induced Normal Tissue Toxicity and Enhances Tumor Radiosensitization in Pancreatic Cancer. **Cancer Res**. v. 78, n. 24, p.6838-6851, 2018.

ANSCHAU, V. **Caracterização cinética da redução das 1-Cys Peroxirredoxinas por ascorbato**. São Paulo, 2016. 56 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências, na Área de Biologia/Genética, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

ARRUDA, G.; SOARES, I. A.; ROCHA, C. L. M. S. C. Effect of nutritional factors on the *Aspergillus nidulans* germination program. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4. 2021. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/28129/22274>. Acesso em: 23. abr. 2022.

BERTI, A. P.; PACHECO, L. S.; ROCHA, C. L. M. S. C. Efeito da *Aloe arborescens* Miller e da *Aloe barbadensis* Miller sobre o desenvolvimento vegetativo em *Aspergillus nidulans*. **Rev. Bras. Plantas Med.** v. 17 n. 4, p. 534-542, 2015

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 269, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005. Dispõe sobre valores de Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. **Diário Oficial da União**, nº 184, de 23 de set. de 2005.

CADET, J.; DOUKI, T. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 12, 2018.

CAESAR, L. K.; KELLEHER, N. L.; KELLER, N. P. In the fungus where it happens: History and future propelling *Aspergillus nidulans* as the archetype of natural products research. **Fungal Genetics and Biology**. v. 144, nov. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184520301687>. Acesso em: 23. abr. 2022.

CARR, A.C.; MAGGINI, S. Vitamin C and Immune Function. **Nutrients**. v. 9, n. 1211, nov. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29099763/>. Acesso em: 23. abr. 2022.

CARVALHO, et al. Discursos sobre tecnologias de desinfecção pós-pandêmicas: luz ultravioleta germicida, fotocatalise e ozônio. **Revista de Casos e Consultoria**, v. 13, n. 1, 2022.

CAVALARI, T. G. F; SANCHES, Rosely Alvim. OS EFEITOS DA VITAMINA C. **Revista Saúde em Foco**. p -749-765, 2018.

D'ENFERT, C. Fungi spore germination: insights from the molecular genetics of *A. nidulans* and *N. crassa*. **Fungai Genet. Biol.** v.21, p. 163-172, 1997.

DU, J.; CULLEN, J.J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochim Biophys Acta**. v. 1826, n. 2, p. 443–457, dec. 2012.

ETXEESTE, O.; ESPESO, E. A. *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. **International Microbiology** v. 23, p. 5–22, 2020.

FIGUEROA-MENDEZ, R; RIVAS-ARANCIBIA. Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. **Front Physiol.**, v. 6, 2015

FONSECA, N. C. PETEAN, P. G. C. Determinação dos parâmetros cinéticos de degradação da vitamina c em suco de laranja. **Rev. Bras. de Iniciação Científica (RBIC)**, v. 5, n.3, p. 46-59, jun., 2018.

GEISER, D. M.; ARNOLD, M. L.; TIMBERLAKE, W. E. Sexual origins of British *Aspergillus nidulans* isolates. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 91, p. 2349-2352, 1994.

GOODAY, G. W. The hyphae tip. In: SMITH, J. E. Fungal Differentiation. **A Contemporary Synthesis**. New York: Dekker. p. 315-356, 1983.

GUIDOTI, D. T. **Isolamento químico e avaliação de bioatividade de frações do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.)**. Maringá: UEM, 2015. 116 p. Tese (Doutorado em Interações Orgânicas) - Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

HAMISHEHKAR, H. et al. Vitamins, Are They Safe? **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, Tabriz, v. 6, n. 4, p 467-477, dec. 2016.

ITHARAT, A. et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, p. 33-39, Jan. 2004.

KAZMIERCZAK-BARANSKA et al. Two Faces of Vitamin C - Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. **Nutrients**. v. 12, n. 5. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/5/1501>. Acesso em: 23. abr. 2022.

KUMAR, A. *Aspergillus nidulans*: A Potential Resource of the Production of the Native and Heterologous Enzymes for Industrial Applications. **International Journal of Microbiology**. 2020. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2020/8894215/>. Acesso em: 23. abr. 2022.

LARRAINZAR, M. G. **Control de microorganismos alterantes y patógenos de la leche y queso de oveja de la provincia de León por D-eritroascorbato, un análogo natural de la vitamina C y otros antioxidantes utilizados en la industria alimentaria.** Leon: 2010. 288 p. Tese (Doutorado). Universidad de Leon, Espanha, 2010.

LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P. The Pharmacokinetics of Vitamin C. **Nutrients.** v. 9, n.11(10). oct. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6835439/>. Acesso em: 23. abr. 2022.

MANELA-AZULAY, M. et al. Vitamina C. **An bras Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 265-274, jun. 2003.

MOCELLIN, A. P. et al. Os efeitos da suplementação com vitamina c na prevenção e combate do estresse oxidativo em tabagistas. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo. v. 15. n.94. p.352-357. out. 2021.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. **Genet.** v. 155, p. 647-656, 2000.

PAULING, L. Evolution and the Need for Ascorbic Acid. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.67, n. 4, p. 1643–1648, dec., 1970.

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics.** v. 5, p. 141-238, 1953.

RIBEIRO, A. S. **Influência da vitamina C no Sistema Imunitário Humano.** Covilhã: 2019. 40 p. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Medicina, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2019.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 3, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAMSON, R.A.; et al.. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Stud Mycol.** v. 78, 2014.

SANTOS, J. T. et al. Os efeitos da suplementação com vitamina c. **Revista Conhecimento Online**, v. 1, p. 139–163. abr. 2019. Disponível em: <https://periodicos.feevale.br/seer/index.php/revistaconhecimentoonline/article/view/1187>. Acesso em: 23. abr. 2022.

SENA, M. et al. Efeito da suplementação com selênio e com vitamina C e sobre biomarcadores hematológicos em militares durante treinamento físico vigoroso e prolongado. **Jornal de Investigação Médica** v. 3, n. 1, 2022. Disponível em: <https://revistas.ponteditora.org/index.php/jim/article/view/486>. Acesso em: 23. abr. 2022.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radic Biol Med.** v. 122, p. 116–129, jul. 2018.

SMIRNOFF, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Ann. Bot.** v.78, p. 661-669, 1996.

SPICKETT, C., SMIRNOFF, N. Y PITT, A. The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. **Free Rad. Biol. Med.** V. 28, p.183-192, 2000.

TIMBERLAKE, W. E.; CLUTTERBUCK, A. J. Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. (Eds.) **Aspergillus: 50 years on.** New York: Elsevier, 1994. p. 383.1994.

VANNUCCHI, H.; ROCHA, M. M.; TAKEUCHI, P. L. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ácido Ascórbico (Vitamina C). **ILSI Brasil International Life Sciences Institute**, São Paulo, 2018.

VERMA, A.; VERMA, M.; SINGH, A. Animal tissue culture principles and applications. **Animal Biotechnology**, 1 jan. 2020. p. 269. Disponível em: </pmc/articles/PMC7325846/>. Acesso em: 9 abr. 2023.

VISBA, J. H. W.; BARROS, J. J. B.; HERNÁNDEZ, J. C. M. Luz ultravioleta C: una alternativa eficiente contra la pandemia. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.* v. 61, n. 1, 2021.

WELCH D, BUONANNO M, GRILJ V, SHURYAK I, CRICKMORE C, BIGELOW AW, et al. Far-UVC light: A new tool to control the spread of airborne-mediated microbial diseases. *Sci Rep*, v. 8, n. 1, 2018.

YIN, X. ET AL. Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology. **Antioxidants**, v.11, n. 153, 2022.

**EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E LUZ UV SOBRE  
CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus nidulans***

Artigo formatado e elaborado segundo as normas para publicação científica no periódico Trabalho, Educação e Saúde.

# **EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E LUZ UV SOBRE CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus nidulans***

## **THE EFFECT OF ASCORBIC ACID, ASCORBATE AND UV LIGHT ON HEPG2 CELLS AND THE FILAMENTOUS FUNGUS *Aspergillus nidulans***

## **EFEECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO Y LUZ UV SOBRE LAS CÉLULAS HEPG2 Y EL HONGO FILAMENTOSO *Aspergillus nidulans***

Mário Sérgio Braga do Couto<sup>a</sup>; Franciele Aní Caovilla Follador<sup>a</sup>; Izabel Aparecida Soares<sup>b</sup>; Dalila Moter Benvegnu<sup>b</sup>; Elisângela Düsman<sup>c</sup>; Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha<sup>d</sup>; Gisele Arruda<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Ciências da Saúde. Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde. Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, mario.sergio775@hotmail.com; francaovilla@hotmail.com; giselearrudabioq@gmail.com.

<sup>b</sup>Ciências Biológicas. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, Realeza, Paraná, izabel.soares@uffs.edu.br.

<sup>d</sup>Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, edusman@utfpr.edu.br.

<sup>l</sup>Laboratório de Genética Molecular e do Desenvolvimento, Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, clmscrocha@zipmail.com.br.

\*Autor Correspondente:

<sup>a</sup>Centro de Ciências da Saúde. Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde. Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Rodovia Vitório Traiano, Km2, Bairro Água Branca, Paraná – PR, CEP: 85.601-970, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. Phone/fax: +5546-3520-0715. E-mail: mario.sergio775@hotmail.com (Mário Sérgio Braga do Couto).

## **RESUMO**

O ácido ascórbico (AA), conhecido como vitamina C, é uma das vitaminas mais frequentemente suplementadas. É um excelente redutor e sofre duas oxidações consecutivas, formando radicais ascorbato (ASC) e desidroascorbato. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de AA, ASC e luz UV no desenvolvimento e crescimento de *A. nidulans* e sua toxicidade em células HepG2 humanas *in vitro*. Foram analisados o crescimento de colônias e germinação de conídios de *A. nidulans*

e testes de viabilidade de células humanas HepG2. Durante a germinação dos conídios, todas as concentrações apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Ensaio de crescimento de colônias de *A. nidulans* expostas tanto a AA quanto a ASC demonstraram alterações em diferentes concentrações. Os ensaios de AA com células HepG2 apresentaram aumento significativo na absorbância média após 24 horas de tratamento na concentração de 40 µg/mL. Uma diminuição ocorreu após 72 horas de tratamento nas concentrações. Nos ensaios ASC com células HepG2, não foram observadas diferenças significativas. Quanto à citotoxicidade à luz UV, apresentou toxicidade em todos os tempos de irradiação. O AA aumentou o crescimento em concentrações mais baixas e diminuiu o crescimento em concentrações mais altas, enquanto o ASC não causou toxicidade nesta linhagem celular.

**Palavras-chave:** Fungo filamentososo; Genética do desenvolvimento; Radiação eletromagnética; Toxicidade; Vitamina C.

## ABSTRACT

Ascorbic acid (AA), commonly known as vitamin C is currently one of the most frequently supplemented vitamins. Is an excellent reducing agent and easily undergoes two consecutive one-electron oxidations, forming ascorbate (ASC) and dehydroascorbate radicals. This manuscript has with objective, evaluate the effect of AA, ASC, and UV Light on the development and growth of *A. nidulans*, and their toxicity in human HepG2 cells in vitro. Colony growth and conidia germination of *A. nidulans* and viability tests of human HepG2 cells in vitro were analyzed. During the germination of conidia, all concentrations showed significant difference compared to the control. Growth assays of *A. nidulans* colonies exposed to both AA and ASC demonstrated changes at different concentrations. AA assays with HepG2 cells presented a significant increase in mean absorbance after 24 hours of treatment at a concentration of 40 µg/mL. A significant decrease occurred after 72 hours of treatment at concentrations. In the ASC assays with HepG2 cells, no significant difference were observed. Regarding cytotoxicity to UV light, it showed toxicity at all irradiation times. AA increased growth at a lower concentration and decreased growth at higher concentration, while ASC did not cause toxicity in this cell line.

**Keywords:** Filamentous fungus; Developmental genetics; Electromagnetic radiation; Toxicity; Vitamin C.

## RESUMEN

El ácido ascórbico (AA), conocido como vitamina C, es una de las vitaminas que se suplementa con más frecuencia. Es un excelente agente reductor y sufre dos oxidaciones formando radicales ascorbato (ASC) y deshidroascorbato. Este manuscrito tiene como objetivo evaluar el efecto de la luz AA, ASC y UV en el desarrollo y crecimiento de *A. nidulans*. y su toxicidad en células HepG2 humanas *in vitro*. Se analizó el crecimiento de colonias y la germinación de conidios de *A. nidulans* y pruebas de viabilidad de células HepG2. Durante la germinación de los conidios, todas las concentraciones mostraron diferencia. Los ensayos de crecimiento de

colonias de *A. nidulans* expuestas a AA y ASC demostraron cambios en diferentes concentraciones. Los ensayos de AA con células HepG2 presentaron un aumento en la absorbancia media después de 24 horas de tratamiento a una concentración de 40 ug/mL. Hube disminución de 72 horas de tratamiento en las concentraciones. El ASC con células HepG2, no hube diferencias. Pero la citotoxicidad a la luz UV, mostró que el AA aumentó el crecimiento a una concentración más baja y disminuyó el crecimiento a una concentración más alta, mientras que ASC no causó toxicidad en esta línea celular.

**Palabra clave:** hongo filamentoso; Genética del desarrollo; Radiación electromagnética; Toxicidad; Vitamina C.

## 1. INTRODUÇÃO

Extraído pela primeira vez em 1928 de extratos de pimenta e glândula adrenal pelo bioquímico Albert Szent-Gorgyi, o que concedeu a ele o Prêmio Nobel em 1937, o ácido ascórbico (AA), ou popularmente conhecido como vitamina C, expandiu-se de forma surpreendente, sendo hoje uma das vitaminas mais frequentemente suplementadas (Kazmierczak-Baranska *et al.*, 2020).

A suplementação em altas doses de AA, pode ter efeito oposto ao esperado, o que pode ser prejudicial, e o seu excesso pode desencadear efeitos pró-oxidantes e gerar, em determinadas circunstâncias, efeitos nocivos à saúde humana (Santos *et al.*, 2019). Essa atividade pró-oxidante é devido ao aumento da produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Alexander *et al.*, 2018), pois altos níveis de AA sofrem auto-oxidação, resultando num alto fluxo de  $H_2O_2$  extracelular, em seguida, o  $H_2O_2$  se difunde nas células, iniciando cascatas oxidativas e efeitos pró-oxidantes (Du; Cullen; Buettner, 2012).

Segundo Smirnoff (2018), essa atividade pró-oxidante ocorre devido a um subproduto do AA, o ascorbato (ASC). Esse composto, possui uma atividade doadora de elétrons, portanto, em alguns casos, pode ocorrer a produção de radicais livres. Com o aumento de radicais livres, há também um aumento no risco para o organismo, uma vez que, devido à oxidação lipídica, a membrana plasmática, composta por uma bicamada de fosfolipídeos, é o principal alvo, e altamente suscetível, à agentes pró-oxidantes (Sena *et al.*, 2022).

Neste sentido, há um grande interesse em investigar o efeito dessas substâncias em diferentes organismos teste, que possam mostraram efeitos que ainda

não foram avaliados sob a exposição dessas vitaminas. Nesse contexto, cita-se o fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*, que tem sido utilizado como modelo em testes para avaliar inúmeros efeitos no desenvolvimento de suas diferentes fases, além de avaliar os efeitos das variações genéticas em resposta à agentes externos (Arruda; Soares; Rocha, 2021).

Além desse organismo teste, os ensaios envolvendo células *in vitro* são de extrema importância e tem seu estudo consolidado em células isoladas, em tecidos e em órgãos isolados, controlados em laboratório. Em especial as células tumorais são as mais utilizadas para descoberta e desenvolvimento de novas drogas (Itharat, 2004).

Portanto, testar os efeitos do AA e ASC em laboratório, variando suas concentrações, é fundamental para compreender os mecanismos benéficos e maléficos associados a essas substâncias, pois a vitamina C, desempenha um papel crucial no organismo humano, atuando como antioxidante e participando de diversas vias metabólicas, já o ASC, a forma ionizada do ácido ascórbico, também possui efeitos que variam de acordo com sua concentração, podendo exercer efeitos antioxidantes em baixas concentrações, mas potencialmente induzir estresse oxidativo em níveis elevados. Portanto, testes laboratoriais que investigam os efeitos dessas substâncias em diferentes concentrações, utilizando diferentes organismos testes, são essenciais para orientar a utilização adequada e segura desses compostos, contribuindo para a promoção da saúde e prevenção de possíveis danos à saúde humana. Além disso, não foram encontrados na literatura testes do efeito de diversas concentrações de AA e ASC sobre o desenvolvimento de *A. nidulans* e toxicidade em culturas de células humanas.

Associado a estas questões, esta pesquisa propôs também investigar o efeito do AA e do ASC na presença de danos causados pela exposição pré tratamento com luz UV. A luz UV atua no material genético, produzindo alterações moleculares através de fotoprodutos formados a partir das pirimidinas. Espécies reativas de oxigênio (ROS) também são produzidas, contribuindo para o estresse oxidativo das moléculas. O dano induzido gera efeitos mutagênicos capazes de inibir mecanismos replicativos, sendo assim, o grau de prejuízo da radiação UV nos tecidos depende em grande parte da sua capacidade de penetração e o grau de absorção do tecido (Cadet e Douki, 2018). Neste sentido, o objetivo da pesquisa é avaliar o efeito do AA, ASC e luz UV

sobre o desenvolvimento e crescimento de *A. nidulans* e sobre a toxicidade em células humanas HepG2 *in vitro*.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Tipo e local de pesquisa

Pesquisa básica de caráter experimental do tipo quantitativo, desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia, Saúde e Ambiente da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Centro de Ciências da Saúde, campus Francisco Beltrão, Paraná. As análises de citotoxicidade foram feitas no Laboratório de Biotecnologia e Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Francisco Beltrão, Paraná. A pesquisa ocorreu entre o segundo semestre de 2022 e o primeiros semestre de 2024.

### 2.2 Ensaio com *A. nidulans*

Os ensaios com *A. nidulans* seguirão o protocolo de Berti *et al.*, (2016). Foi utilizada a linhagem haplóide *biA1methG1*, gentilmente fornecida pela Professora Dra. Carmem Lucia M. S. C. Rocha da Universidade Estadual de Maringá.

#### 2.2.1 Preparo do meio sólido com AA e ASC

Serão utilizados: meio completo líquido (MCL) e meio completo sólido (MCS), preparados segundo Pontecorvo *et al.*, (1953). Foram preparados meio de cultura, acrescidos de AA e ASC nas concentrações: 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg por mL<sup>-1</sup> para os experimentos. Todas as soluções foram esterilizadas utilizando filtro milipore 0,22 µm.

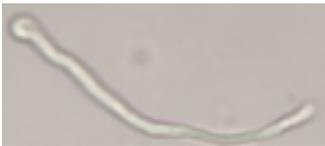
#### 2.2.2 Análise da germinação de conídios

O ensaio da germinação foi utilizado para realização do *screening* inicial com diferentes concentrações testes para então definir as concentrações para os próximos experimentos. Antes do experimento, a colônia de *A. nidulans* foi rejuvenescida em MCS e após 5 dias de crescimento, a 37°C, foram coletados conídios para realização do experimento. Os conídios foram transferidos para 0,01% (v/v) de Tween 80. Em seguida as suspensões de conídios com foram filtradas em lã de vidro estéril e contadas em câmara de Neubauer, para preparo de suspensão com 2x10<sup>5</sup>/mL conídios. A suspensão de conídios foi dividida em 14 grupos experimentais (AA e ASC

nas seguintes concentrações: 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g por mL}^{-1}$ ) mais o grupo controle, que só recebeu MCL.

Após a inoculação, 100  $\mu\text{L}$  de cada tubo foi transferida para lâminas de microscopia em câmara úmida e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  e após 2, 4, 6 e 8 horas foram analisadas para a quantificação de conídios em cada uma das fases da germinação: conídio dormente, embebido, com botão germinativo e com tubo germinativo/germinado (Tabela 1).

Tabela 1 - Fases da germinação e tamanho médio de conídios de *A. nidulans*.

Nomenclatura	Imagem	Tamanho médio
Conídio Dormente (D)		$2,65 \pm 0,18 \mu\text{m}$
Conídio Embebido (E)		$4,11 \pm 0,58 \mu\text{m}$
Conídio com Botão Germinativo (B)		$7,84 \pm 0,80 \mu\text{m}$
Conídio com Tubo Germinativo Pequeno (P)		$22,71 \pm 6,38 \mu\text{m}$
Conídio com Tubo Germinativo Médio (M)		$50,22 \pm 4,24 \mu\text{m}$
Conídio com Tubo Germinativo Grande (G)		$83,64 \pm 11,18 \mu\text{m}$

As lâminas de cada condição foram analisadas pelo microscópio óptico em cada tempo. Em cada leitura foram analisados, randomicamente, aproximadamente 500 conídios e calculadas as porcentagens de conídios em cada uma das fases. Na leitura de oito horas foi feita uma estimativa da sobrevivência, considerando-se vivos apenas os conídios com tubo germinativo e uma estimativa de conídios germinados malformados.

Foram consideradas malformações conídios onde o primeiro tubo germinativo se bifurcava, ou segundo tubo iniciava sua formação precocemente ou em ângulo diferente de  $180^{\circ}$  ou quando formavam-se mais que dois tubos, além de outras

alterações presentes. A contagem das células foi feita em microscópio óptico, com aumento final de 400x, por meio de captura de imagem (Canon EOS Rebel 3TI), com adaptador SLR/DSLR NDPL-2 (2x), para microscópio binocular. Foi utilizado o Software Fiji J para medição dos conídios. Este teste foi feito em triplicatas em três ensaios independentes para todos os grupos experimentais.

### 2.2.3 Análise de crescimento da colônia em meio sólido

Antes do experimento, a colônia de *A. nidulans* foi rejuvenescida em MCS e após 5 dias de crescimento, a 37°C, foi inoculada em MCS contendo AA ou ASC ou controle (apenas MCS). As colônias foram acompanhadas por 7 dias, onde foi medido o diâmetro de crescimento a cada 24 horas. Com estes dados, foi estimada a velocidade de crescimento da colônia com e sem o AA e ASC, para avaliar a resposta do crescimento vegetativo da linhagem na presença dessas vitaminas. Durante todo o experimento as colônias foram mantidas em estufa a 36°C. Esse experimento foi feito em triplicata em 3 ensaios independentes.

### 2.2.4 Tratamento com a luz UV

Antes da exposição à luz UV, a colônia de *A. nidulans* foi rejuvenescida em MCS e após 5 dias de crescimento, a 37°C, foi inoculada em MCS contendo AA ou ASC ou controle (apenas MCS). Após inoculação, as placas foram inseridas em uma cabine com luz UV (5 Joules/m<sup>2</sup>/s) (lâmpada modelo Mineralight UVSL-25, 115 volts, 60H, 0,16 Amps), abertas expondo o inóculo à luz nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 segundos. Após esse procedimento, as colônias foram mantidas à 37° C e acompanhadas durante 7 dias, onde media-se o diâmetro da colônia a cada 24 horas, a fim de estimar a velocidade de crescimento da colônia após exposição a esse agente físico.

### 2.2.5 Tratamento cruzando Luz UV e AA e Luz UV e ASC

Antes da exposição à luz UV, a colônia de *A. nidulans* foi rejuvenescida em MCS e após 5 dias de crescimento, a 37°C, foi inoculada em MCS contendo AA 5 µg por mL<sup>-1</sup> ou ASC 5 µg por mL<sup>-1</sup> ou controle (apenas MCS). Após inoculação, as placas foram inseridas em uma cabine com luz UV (5 Joules/m<sup>2</sup>/s) (lâmpada modelo Mineralight UVSL-25, 115 volts, 60H, 0,16 Amps), abertas expondo o inóculo à luz no tempo de 20 segundos. Após esse procedimento, as colônias foram mantidas à 37° C

e acompanhadas durante 7 dias, onde media-se o diâmetro da colônia a cada 24 horas, a fim de estimar a velocidade de crescimento da colônia após exposição a esse agente físico e estimar se o efeito do AA e do ASC mudam na presença de dano causado pela luz UV.

#### 2.2.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à comparação de médias, utilizando como referência o erro padrão da média (EPM). Foram comparadas as médias das fases da germinação dos tratamentos *versus* o controle através de ANOVA (Two-way) com pós-hoc Bonferroni. A análise de crescimento e a diferença de crescimento da colônia tratada com AA, ASC e luz UV foi feita comparando-se o tratamento *versus* o controle através de ANOVA (Two-way) com pós-hoc Dunnet. O cruzamento entre luz UV e AA e luz UV e ASC foi feita comparando-se o todos os grupos experimentais relativos ao experimento através de ANOVA (Two-way) com pós-hoc Tukey. Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 9.5.1, com significância definida como  $p < 0,05$ .

### 2.3 Teste de viabilidade de células humanas *in vitro*

#### 2.3.1 Cultivo das células

As células HepG2, derivadas de fígado humano, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementando com 10% de soro fetal bovino, e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 2.3.2 Teste de citotoxicidade

Para verificar a viabilidade celular foi realizado o ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 brometo de difenil tetrazólio) de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações.

Uma quantidade de 10<sup>4</sup> células foram cultivadas por poço, em placas de cultura celular de 96 poços, com 100 µL de meio de cultivo suplementado, por 24 horas. Após estabilização, o meio de cultivo foi descartado e adicionado meio completo com os seguintes tratamentos: meio de cultivo (controle negativo - CO-), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS – 150 µM - CO+), e tratamentos com ácido ascórbico e

ascorbato nas concentrações 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg por mL<sup>-1</sup> de meio de cultivo.

Então, as placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após cada período, o tratamento foi substituído por meio de cultura acrescido de MTT (0,167 mg mL<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas por mais quatro horas e o meio com MTT foi substituído por 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitura de microplacas (Thermo Plate) a 492 nm.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão entre a absorbância do tratamento e a absorbância do controle negativo, de acordo com a equação 1.

$$VC = \left( \frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad VC = \left( \frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

$ABS_T$  = Absorbância do tratamento;

$ABS_{CO-}$  = Absorbância do controle negativo.

### 2.3.2.1 Análise estatística

Os valores das absorbâncias foram submetidos ao teste de normalidade, a análise de variância (*one way ANOVA*) e ao teste de comparação de médias de Dunnet ( $\alpha = 0,05$ ), pelo *software Action Stat*, com significância definida como  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Ensaio com *A. nidulans*

#### 3.1.1 *Screening* inicial utilizando o ensaio da germinação de conídios de *A. nidulans*

O *screening* inicial foi feito com as concentrações um, cinco, 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 200 µg/mL<sup>-1</sup> e todas as concentrações em algum dos horários de análise apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle. Diante desses resultados foram mantidas as concentrações um, cinco, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL<sup>-1</sup> para os ensaios com AA e ASC para os experimentos com *A. nidulans* e um, cinco, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL<sup>-1</sup> para os ensaios com células em cultura.

### 3.1.2 Ensaio de crescimento da colônia de *A. nidulans* tratadas com AA

Os ensaios de crescimento da colônia de *A. nidulans* expostas ao AA mostram alterações em várias concentrações e dias de análise quando comparado ao controle. As concentrações um e cinco  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  mostraram aumentar o crescimento da colônia a partir do terceiro dia de tratamento, exceto pelo quinto dia na concentração de cinco  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ . Já a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  alterou o crescimento, aumentando ou diminuindo o crescimento, dependendo do dia de análise. Já as concentrações de 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  diminuíram o crescimento da colônia em todos os dias de análise (Tabela 2).

Tabela 2 – Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans* por até sete dias nos tratamentos com AA ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e controle.

Dias	Tratamentos							
	Controle	AA 1	AA 5	AA 10	AA 25	AA 50	AA 100	AA 200
1	0,45 ±	0,54 ±	0,54 ±	0,47 ±	0,34 ±	0,29 ±	0,10 ±	0,05 ±
	0,05a	0,05a	0,05a	0,05a	0,05b	0,04b	0,00b	0,00b
2	1,03 ±	1,03 ±	1,02 ±	1,13 ±	0,77 ±	0,59 ±	0,29 ±	0,10 ±
	0,09a	0,07a	0,08a	0,05b	0,05b	0,09b	0,08b	0,00b
3	2,10 ±	2,16 ±	2,17 ±	1,77 ±	1,75 ±	1,29 ±	0,69 ±	0,36 ±
	0,10a	0,05a	0,05a	0,05b	0,08b	0,04b	0,08b	0,05b
4	2,90 ±	3,16 ±	2,95 ±	2,82 ±	2,66 ±	2,04 ±	1,78 ±	0,89 ±
	0,10a	0,05b	0,05b	0,07b	0,22b	0,05b	0,07b	0,07b
5	3,52 ±	3,93 ±	3,45 ±	3,45 ±	3,20 ±	2,82 ±	2,47 ±	1,21 ±
	0,13a	0,05b	0,05b	0,05b	0,10b	0,07b	0,05b	0,04b
6	4,15 ±	4,63 ±	4,45 ±	4,54 ±	3,54 ±	3,39 ±	2,80 ±	1,31 ±
	0,16a	0,05b	0,05b	0,05b	0,05b	0,04b	0,00b	0,04b
7	4,35 ±	5,00 ±	5,00 ±	4,74 ±	3,74 ±	3,59 ±	3,07 ±	1,71 ±
	0,16a	0,00b	0,00b	0,05b	0,09b	0,04b	0,05b	0,08b

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamento ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

Quando feita a análise de crescimento médio pela diferença de crescimento descontando-se o quanto a colônia cresceu no dia anterior, pode-se entender quais dias tiveram maior influência sobre o crescimento entre os sete dias de análise. A concentração de um  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  mostrou alterações do terceiro para o quarto dia de crescimento, igual ao crescimento total da colônia (tabela 2). Já para a concentração de cinco  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  as alterações começaram a aparecer do quarto para o quinto dia, sendo que a diferença maior ficou entre os dias cinco e sete. As concentrações 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  mostraram influenciar em alguns dias de análise. A concentração de 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  diminuiu o crescimento em todos os dias de análise, exceto no sétimo dia, onde aumentou. Esse resultado é porque do sexto para o sétimo dia a placa controle já tinha alcançado as bordas da placa, portanto, não apresentou crescimento considerável, devido ao impedimento físico (Tabela 3).

Tabela 3 – Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans*, descontando-se o crescimento do dia anterior, por até sete dias nos tratamentos com AA ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e controle.

Dias	Tratamentos							
	Controle	AA 1	AA 5	AA 10	AA 25	AA 50	AA 100	AA 200
1/2	0,58 ±	0,58 ±	0,49 ±	0,66 ±	0,43 ±	0,31 ±	0,19 ±	0,05 ±
	0,05a	0,10a	0,05a	0,07b	0,07b	0,06b	0,09b	0,00b
2/3	1,08 ±	1,10 ±	1,13 ±	0,63 ±	0,98 ±	0,69 ±	0,36 ±	0,26 ±
	0,05a	0,07a	0,10a	0,08b	0,10b	0,06b	0,07b	0,05b
3/4	0,80 ±	1,00 ±	0,78 ±	1,05 ±	0,92 ±	0,76 ±	1,09 ±	0,54 ±
	0,00a	0,09b	0,05a	0,05b	0,14b	0,07a	0,11b	0,08b
4/5	0,62 ±	0,78 ±	0,50 ±	0,65 ±	0,54 ±	0,76 ±	0,69 ±	0,33 ±
	0,04a	0,04b	0,00b	0,05a	0,14b	0,05b	0,03a	0,05b
5/6	0,63 ±	0,70 ±	1,00 ±	1,10 ±	0,33 ±	0,57 ±	0,33 ±	0,11 ±
	0,05a	0,00b	0,05b	0,04b	0,07b	0,05a	0,05b	0,03b
6/7	0,20 ±	0,35 ±	0,55 ±	0,20 ±	0,20 ±	0,20 ±	0,27 ±	0,40 ±
	0,00a	0,12b	0,05b	0,00a	0,00a	0,00a	0,05a	0,07b

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamento ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

A tabela 4 apresenta os resultados de cada um dos dias e a diferença entre os dias descontando-se o crescimento do dia anterior para todas as concentrações de AA, com a sinalização (=) para crescimento igual ao controle, sinalização (-) quando o crescimento foi menor que o controle e sinalização (+) quando o tratamento aumentou o crescimento. Nesta tabela pode-se observar de uma forma diferente um perfil de crescimento da colônia para cada uma das concentrações ao longo do tempo. Pode-se observar que não existe uma resposta dose-dependente e tempo-dependente, sendo que a resposta é bastante variável ao longo dos dias, onde em alguns dias a colônia aumenta o crescimento, em outros diminui e em outros mantém-se igual ao controle, exceto pela concentração de 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ .

Tabela 4 – Progressão no crescimento das colônias de *A. nidulans* expostas aos tratamentos com AA ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) por até sete dias de tratamento.

Concentrações	Dias												
	1	2	3	4	5	6	7	1/2	2/3	3/4	4/5	5/6	6/7
1	+	=	+	-	+	+	+	=	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
10	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	=
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	=
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	=
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

= indica crescimento igual ao controle; + indica crescimento maior que o controle; - indica crescimento menor que o controle

Como os resultados na literatura sobre os efeitos do AA em células são escassos, principalmente em fungos, esta pesquisa procurou estabelecer os efeitos dessa substância na toxicidade celular e também no crescimento de *A. nidulans*, visto que são dois organismos eucariotos com mecanismos semelhantes de crescimento e desenvolvimento.

O desenvolvimento celular de *A. nidulans* responde a fatores externos e é coordenado geneticamente por vários genes que controlam a cascata que leva a formação das estruturas da colônia do fungo (Oliveira *et al.*, 2006). Desta forma, o estudo dos ciclos do seu desenvolvimento é um modelo ideal para avaliação de substâncias inibidoras ou protetoras que possuem efeitos sobre os mecanismos de controle da expressão gênica e preservação da homeostase (Reis, 2009).

Os resultados mostrados por essa pesquisa, identificam perfis de respostas totalmente diferentes de acordo com a concentração de AA. De maneira geral, concentrações mais altas (25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) diminuíram o crescimento, concentrações mais baixas (um e cinco  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) aumentaram o crescimento, enquanto a concentração intermediária (10  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) em alguns dias aumentou e outros diminuiu o crescimento (Tabela 2).

O ciclo de vida de *A. nidulans* é dividido em: vegetativo, assexual, sexual (Giancoli, 2004) e parassexual (Adams *et al.*, 1998). No ciclo de vida vegetativo ocorre a proliferação e crescimento das hifas que são células tubulares, que se desenvolvem no plano da superfície do meio de cultura. As hifas se ramificam para formar uma rede de células interconectadas, chamada de micélio (Pontecorvo *et al.*, 1953). As hifas crescem e se ramificam, formando uma colônia que cresce radialmente (Timberlake; Clutterbuck, 1994). Portanto, o crescimento ocorre devido a divisões celulares consecutivas que levam ao aumento do tamanho da colônia.

Neste sentido, pode-se concluir que diminuições no crescimento da colônia atrasam ou inibem a proliferação celular, ou mesmo levam células a apoptose, enquanto concentrações que aumentam o crescimento da colônia estimulam a proliferação celular. Uma nova célula surge no momento em que outra se divide, este fenômeno é conhecido como proliferação celular. Este processo é responsável pela reprodução de todos os organismos (Alberts *et al.* 2017).

De fato, segundo Silva *et al.*, (2023) o AA é capaz de estimular a proliferação celular, assim como, a síntese de colágeno em fibroblastos. Em contrapartida, Azqueta *et al.*, (2013) demonstraram que o AA pode causar dano ao DNA, atuando como o pró-oxidante. Isso explicaria o atraso na proliferação celular, pois danos ao DNA, ativam o mecanismo de reparo, ou se o dano não puder ser reparado, ativam os mecanismos de apoptose, o que também explicaria o atraso. Já é muito bem estabelecido que células com dano no DNA podem estimular o mecanismo de reparo celular (Bernstein *et al.*, 2002) e que quando o dano não é reparado a célula é direcionada a apoptose (Stevens *et al.*, 2007).

O efeito do AA já foi testado em *Aspergillus parasiticus*, mas num ensaio teste diferente deste trabalho, e que corroboram aos encontrados nesta pesquisa, concentrações maiores (50mg/mL) inibem o crescimento do fungo (Dana *et al.*, 2018).

Outro aspecto relevante a ser discutido é que o fato de algumas concentrações alguns dias aumentarem e outros dias diminuirem o crescimento da colônia, pode indicar desregulação do processo de proliferação celular. A desregulação do processo de proliferação celular pode gerar erros durante a transcrição e síntese do DNA ou a desregulação do ciclo celular pode gerar uma produção demasiada e descontrolada formando células mutantes (Alberts *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por Pinnel (2001) verificando a absorção tópica do AA, foi constatado que na concentração de 20% foi alcançado o nível máximo de absorção, e segundo os autores, concentrações mais altas foram menos eficazes por razões desconhecidas e resultaram em um decréscimo nos níveis teciduais. Semelhantes aos resultados encontrados nesta pesquisa, decréscimo do crescimento fúngico.

### 3.1.3 Ensaio de crescimento da colônia de *A. nidulans* tratadas com ASC

Os ensaios de crescimento da colônia de *A. nidulans* expostas ao ASC mostram alterações em várias concentrações e dias de análise. As concentrações um, cinco e 10  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  mostraram aumentar o crescimento da colônia a partir do quarto dia de tratamento. Já as concentrações 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  diminuiram o crescimento em alguns dias e aumentaram em outros dias. A concentração de 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  diminuiu o crescimento da colônia em todos os dias de análise (Tabela 5), igual ao efeito do AA (Tabela 2).

Tabela 5 – Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans* por até sete dias nos tratamentos com ASC ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e controle.

Dias	Tratamentos							
	Controle	ASC 1	ASC 5	ASC 10	ASC 25	ASC 50	ASC 100	ASC 200
1	0,45 ± 0,05a	0,56 ± 0,05a	0,55 ± 0,05a	0,47 ± 0,05a	0,23 ± 0,05a	0,27 ± 0,04a	0,10 ± 0,00b	0,10 ± 0,00b
2	1,03 ± 0,09a	1,21 ± 0,07a	1,23 ± 0,08b	1,07 ± 0,05a	0,59 ± 0,05b	0,57 ± 0,09b	0,38 ± 0,08b	0,30 ± 0,00b
3	2,10 ± 0,10a	2,16 ± 0,05a	2,15 ± 0,05a	2,03 ± 0,05a	1,45 ± 0,08b	1,25 ± 0,04b	0,70 ± 0,08b	0,66 ± 0,05b
4	2,90 ± 0,10a	3,05 ± 0,05b	3,06 ± 0,05b	3,08 ± 0,07b	2,54 ± 0,22b	2,63 ± 0,05b	2,44 ± 0,07b	2,16 ± 0,07b
5	3,52 ± 0,13a	3,84 ± 0,05b	3,96 ± 0,05b	4,19 ± 0,05b	3,36 ± 0,10a	3,70 ± 0,07a	3,44 ± 0,05a	3,19 ± 0,04b
6	4,15 ± 0,16a	4,45 ± 0,05b	4,56 ± 0,05b	4,62 ± 0,05b	3,71 ± 0,05b	4,06 ± 0,04a	4,02 ± 0,00a	3,86 ± 0,04b

7	4,35 ± 0,16a	4,50 ± 0,00b	4,56 ± 0,00b	4,62 ± 0,05b	3,78 ± 0,49b	4,26 ± 0,04a	4,12 ± 0,05a	4,06 ± 0,08b
---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamento ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

Quando feita a análise de crescimento médio pela diferença de crescimento descontando-se o quanto a colônia cresceu no dia anterior, os resultados para ASC apresentaram algumas diferenças significativas. Na concentração de um  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  a diferença ficou concentrada do sexto para o sétimo dia de análise. A concentração de 10  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  variou bastante com relação à influência no crescimento ao longo dos sete dias. As concentrações de cinco, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  tiveram maiores diferenças entre os dias um e cinco ou seis, estabilizando do sexto para o sétimo dia essa diferença (Tabela 6).

Tabela 6 – Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans*, descontando-se o crescimento do dia anterior, por até sete dias nos tratamentos com ASC ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e controle.

Dias	Tratamentos							
	Controle	ASC 1	ASC 5	ASC 10	ASC 25	ASC 50	ASC 100	ASC 200
1/2	0,58 ± 0,05a	0,64 ± 0,10a	0,69 ± 0,06b	0,59 ± 0,07a	0,35 ± 0,09b	0,29 ± 0,07b	0,28 ± 0,04b	0,20 ± 0,09b
2/3	1,08 ± 0,05a	0,98 ± 0,13a	0,91 ± 0,08b	0,96 ± 0,05a	0,86 ± 0,15b	0,68 ± 0,06b	0,33 ± 0,10b	0,38 ± 0,15b
3/4	0,80 ± 0,00a	0,89 ± 0,08b	0,91 ± 0,08b	1,05 ± 0,05b	1,01 ± 0,41b	1,38 ± 0,12b	1,07 ± 0,47b	1,44 ± 0,27b
4/5	0,62 ± 0,04a	0,79 ± 0,12a	0,90 ± 0,00b	1,10 ± 0,00b	0,83 ± 0,39b	1,08 ± 0,04b	1,00 ± 0,00b	1,03 ± 0,24b
5/6	0,63 ± 0,05a	0,61 ± 0,03a	0,60 ± 0,00a	0,69 ± 0,22a	0,35 ± 0,16b	0,36 ± 0,05b	0,58 ± 0,05a	0,66 ± 0,05a
6/7	0,20 ± 0,00a	0,05 ± 0,09b	0,00 ± 0,00b	0,00 ± 0,00b	0,08 ± 0,10a	0,20 ± 0,00a	0,10 ± 0,00a	0,20 ± 0,00a

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamento ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

A análise do perfil geral das colônias expostas ao ASC (Tabela 7) mostra que ao longo dos sete dias, as concentrações um, cinco e 10  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  parecem aumentar o crescimento, enquanto as concentrações 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  diminuem. Cabe destacar, que da mesma forma que a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  de AA, o ASC nesta mesma concentração também pareceu desregular o crescimento, pois em alguns dias aumentou e em outros diminui o crescimento. Quando observadas as diferenças, descontando-se o crescimento do dia anterior, observa-se que a maior diferença entre os tratamentos e o controle está entre os dias três e cinco em todas as concentrações testadas. Não parece ser observado um efeito dose-dependente ou tempo-dependente.

Tabela 7 – Progressão no crescimento das colônias de *A. nidulans* expostas aos tratamentos com ASC ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) por até sete dias de tratamento.

Concentrações	Dias													
	1	2	3	4	5	6	7	1/2	2/3	3/4	4/5	5/6	6/7	
1	+	=	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
5	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	
10	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	
25	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	=	
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	=	

= indica crescimento igual ao controle; + indica crescimento maior que o controle; - indica crescimento menor que o controle

A tabela 8 mostra o perfil de crescimento da colônia de *A. nidulans* exposta a AA e ASC. Interessante perceber que ambos os compostos tiveram perfil igual de resposta, em todas as concentrações em todos os dias de análise. Quando uma concentração de AA estimula o crescimento e um dado dia, essa mesma concentração de ASC, no mesmo dia, terá o mesmo efeito sobre as colônias de *A. nidulans*, exceto pelo dia quatro na concentração de um  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ . Isso vale também para diminuições no crescimento.

Tabela 8 – Progressão no crescimento das colônias de *A. nidulans* expostas aos tratamentos com AA ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) e ASC ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) por até sete dias de tratamento.

Concentrações	Dias/tratamentos													
	AA							ASC						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1	+	=	+	-	+	+	+	+	=	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
10	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

= indica crescimento igual ao controle; + indica crescimento maior que o controle; - indica crescimento menor que o controle

Embora exista esse perfil de resposta igual entre AA e ASC, quando se observa o crescimento médio isoladamente para cada dia e cada concentração, pode-se observar que o AA teve um efeito maior sobre o crescimento do que o ASC, principalmente nas concentrações mais altas (50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) (Figura 1). A exemplo disso, a média de crescimento do controle com sete dias é de  $4,35 \pm 0,16$ , do AA 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  é  $1,71 \pm 0,08$  (Tabela 2) e a do ASC 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  é  $4,06 \pm 0,08$  (Tabela 5).

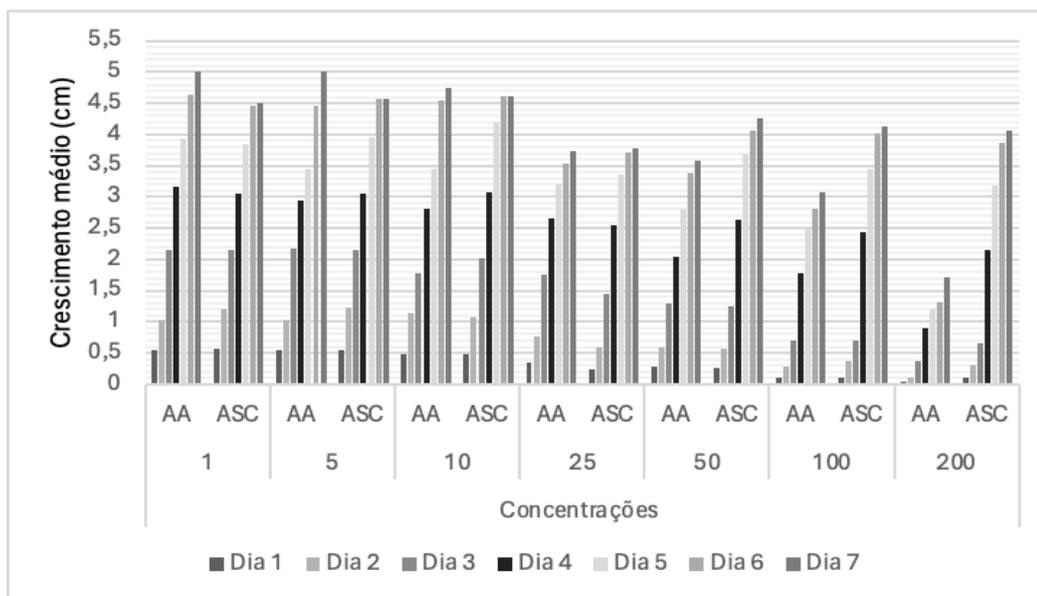


Figura 1: Crescimento médio total (cm) da colônia de *A. nidulans* por até sete dias nos tratamentos com AA ( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) e ASC ( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ).

Esses resultados mostram que o AA possui maior capacidade de diminuir o crescimento, quando comparado ao ASC nas colônias do fungo *A. nidulans*, possivelmente estes resultados estejam associados a forma de absorção e metabolização dessas substâncias neste organismo teste, visto que fungos possuem um análogo ao ASC, chamado de D-eritroascorbato (DASC), que é um conhecido antioxidante.

Os fungos não sintetizam o ASC em si, algumas espécies investigadas pertencentes também ao filo *Ascomycota*, possuem o DASC (D-eritroascorbato), com estrutura e propriedades físico-químicas similares ao ASC. O DASC, por ser um análogo ao ASC, é provável que atue da mesma forma que o ASC em humanos, deve-se destacar que o DASC não possui atividade antioxidante em humanos (Smirnov, 2018; Larrainzar, 2010).

A falta de pesquisa envolvendo essas vitaminas e esse organismo teste tornam esse trabalho de grande relevância, no entanto, dificultam as discussões e o entendimento do que está acontecendo com essas substâncias a nível celular, porém segundo Du, Cullen, Buettner (2012) o conhecimento e compreensão dos mecanismos de absorção e distribuição do AA tem revigorado o interesse no estudo de seu uso em diferentes dosagens.

### 3.1.2 Ensaio de crescimento da colônia de *A. nidulans* tratadas com luz UV

Os resultados com luz UV mostraram algumas diferenças significativas quando comparadas ao controle, apenas a partir do quarto dia após a irradiação, exceto pelo segundo dia no tempo de 45s. As irradiações de 10, 15, 20, 30, 45 e 60 s aumentaram o crescimento da colônia a partir do quarto ou quinto dia (Tabela 9).

Tabela 9 – Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans* por até sete dias nos tratamentos com luz UV (s) e controle.

Dias	Tratamentos/Tempos							
	Controle	5	10	15	20	30	45	60
1	0,45 ± 0,05a	0,55 ± 0,06a	0,48 ± 0,05a	0,48 ± 0,05a	0,40 ± 0,00a	0,50 ± 0,08a	0,46 ± 0,05a	0,46 ± 0,05a
2	1,03 ± 0,09a	1,03 ± 0,05a	0,86 ± 0,05a	0,99 ± 0,06a	0,85 ± 0,06a	1,05 ± 0,05a	0,85 ± 0,05b	0,89 ± 0,11a
3	2,10 ± 0,10a	1,98 ± 0,13a	2,04 ± 0,05a	2,05 ± 0,08a	2,05 ± 0,06a	2,09 ± 0,10a	2,05 ± 0,05a	2,03 ± 0,07a
4	2,90 ± 0,10a	2,85 ± 0,17a	2,86 ± 0,07a	3,29 ± 0,08b	3,05 ± 0,06b	2,93 ± 0,09a	2,88 ± 0,09a	2,94 ± 0,20a
5	3,52 ± 0,13a	3,65 ± 0,44a	3,90 ± 0,08b	4,14 ± 0,05b	3,95 ± 0,06b	3,70 ± 0,24b	3,86 ± 0,07b	3,98 ± 0,09b
6	4,15 ± 0,16a	4,15 ± 0,70a	4,33 ± 0,05b	4,44 ± 0,05b	4,45 ± 0,06b	4,34 ± 0,12b	4,31 ± 0,04b	4,35 ± 0,05b
7	4,35 ± 0,16a	4,20 ± 0,60a	4,53 ± 0,05b	4,50 ± 0,00b	4,50 ± 0,00b	4,50 ± 0,00b	4,51 ± 0,04b	4,53 ± 0,05b

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamento ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnett).

Esses resultados mostram que nos tempos de irradiação testados neste trabalho não levam a morte das células de *A. nidulans*, pois em todos os tempos houve aumento do crescimento, ou seja, estimulam a proliferação celular, provavelmente devido ao efeito mutagênico da luz UV. Estudos de Palioto, Palioto e Rocha (2010) verificaram que apenas um segundo de luz UV é o suficiente para causar mutação da linhagem *biA1methG1* em *A. nidulans*, usando outro teste, porém com a mesma linhagem utilizada nesta pesquisa.

Em um estudo realizado por Stenbäck (1975) em ratos, a exposição a luz UV gerou um aumento na proliferação celular com uma única dose de luz UV. Embora a pesquisa não traga o tempo de exposição à luz UV, pode-se observar que a luz UV causa aumento da proliferação celular.

Quando feita a análise de crescimento médio pela diferença de crescimento descontando-se o quanto a colônia cresceu no dia anterior, os resultados para luz UV mostram diferenças significativas principalmente a partir do quinto dia após a exposição, em todos os tempos testadas, exceto 30s (Tabela 10).

Tabela 10 – Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans*, descontando-se o crescimento do dia anterior, por até sete dias nos tratamentos com luz UV (s) e controle.

Dias	Tratamentos/Tempos							
	Controle	5	10	15	20	30	45	60
1/2	0,58 ± 0,05a 1,08 ±	0,48 ± 0,05a 0,95 ±	0,39 ± 0,06b 1,15 ±	0,51 ± 0,06a 1,05 ±	0,45 ± 0,06a 1,20 ±	0,55 ± 0,08a 1,04 ±	0,39 ± 0,08b 1,20 ±	0,43 ± 0,12b 1,14 ±
2/3	0,05a 0,80 ±	0,10a 0,88 ±	0,08a 0,83 ±	0,05a 1,24 ±	0,00a 1,00 ±	0,05a 0,84 ±	0,08b 0,83 ±	0,07a 0,91 ±
3/4	0,00a 0,62 ±	0,05a 0,80 ±	0,09a 1,04 ±	0,07b 0,85 ±	0,00b 0,90 ±	0,05a 0,78 ±	0,09a 0,99 ±	0,16b 1,04 ±
4/5	0,04a 0,63 ±	0,29a 0,33 ±	0,13b 0,43 ±	0,05b 0,30 ±	0,00b 0,50 ±	0,21a 0,64 ±	0,14b 0,45 ±	0,14b 0,38 ±
5/6	0,05a 0,20 ±	0,33b 0,05 ±	0,05b 0,20 ±	0,00b 0,06 ±	0,00a 0,05 ±	0,17a 0,16 ±	0,05b 0,20 ±	0,05b 0,18 ±
6/7	0,00a	0,10b	0,00a	0,05b	0,06b	0,12a	0,00a	0,05a

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamento ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

O perfil geral de respostas mostra que o crescimento ficou concentrado a partir do quarto dia, já as diferenças entre um dia e outro se concentrou principalmente do terceiro ao quinto dia após a irradiação (Tabela 11).

Tabela 11 – Progressão no crescimento das colônias de *A. nidulans* expostas aos tratamentos com luz UV (s) por até sete dias de tratamento.

Tratamentos/ Tempos	Dias													
	1	2	3	4	5	6	7	1/2	2/3	3/4	4/5	5/6	6/7	
5	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	-	-
10	=	=	=	=	+	+	+	-	=	=	+	-	=	=
15	=	=	=	+	+	+	+	=	=	+	+	-	-	-
20	=	=	=	+	+	+	+	=	=	+	+	=	=	-
30	=	=	=	=	+	+	+	=	=	=	=	=	=	=
45	=	-	=	=	+	+	+	-	+	=	+	-	=	=
60	=	=	=	=	+	+	+	-	=	+	+	-	=	=

= indica crescimento igual ao controle; + indica crescimento maior que o controle; - indica crescimento menor que o controle

Como os resultados dos experimentos testando os efeitos de AA, ASC e luz UV mostraram resultados que não foram dependentes da dose e do tempo, foram conduzidos ensaios na presença de AA e luz UV e ASC e luz UV concomitantes, para poder entender se os efeitos dessas vitaminas mudam na presença de dano, neste caso causados pela luz UV. Esses resultados serão trazidos a seguir.

### 3.1.3 Ensaio de crescimento da colônia de *A. nidulans* tratadas com luz UV, ASC e AA

Os experimentos foram conduzidos com tempo de 20s de exposição à luz UV com a concentração de 5 µg mL<sup>-1</sup> para AA e para ASC. Os resultados para irradiação e presença de AA estão apresentados na tabela 12. Pode-se perceber que na presença de dano o efeito do AA sobre o crescimento de *A. nidulans* muda. Começando já no dia um, onde o crescimento do grupo experimental UV+AA passou a ter o crescimento igual ao controle, mostrando o efeito do AA na recuperação dos efeitos isolados apenas da luz UV sobre a colônia. Esse mesmo perfil foi encontrado

nos dias cinco e sete. De qualquer forma, nos dias dois, três, quatro e seis, embora algumas diferenças com o controle, a colônia sempre divergiu do tratamento exclusivo com UV, mostrando mais uma vez que o efeito do AA muda na presença de dano.

Tabela 12 – Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans* por até sete dias nos tratamentos com luz UV (20 s), AA (5 µg mL<sup>-1</sup>) e controle.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Luz UV	AA	AA + Luz UV
1	0,54 ± 0,05a	0,40 ± 0,00b1	0,54 ± 0,05a*	0,58 ± 0,05a2*
2	1,04 ± 0,05a	0,85 ± 0,06b1	1,02 ± 0,08a*	1,34 ± 0,07c2#
3	2,05 ± 0,08a	2,05 ± 0,06a1	2,17 ± 0,05b*	2,19 ± 0,04b2*
4	2,96 ± 0,07a	3,05 ± 0,06a1	2,95 ± 0,05a*	3,10 ± 0,05b1#
5	3,89 ± 0,08a	3,95 ± 0,06a1	3,45 ± 0,05b*	3,91 ± 0,14a1#
6	4,44 ± 0,07a	4,45 ± 0,06a1	4,45 ± 0,05a*	4,52 ± 0,10b1#
7	4,50 ± 0,00a	4,50 ± 0,00a1	5,00 ± 0,00b*	4,55 ± 0,05a1#

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamentos ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

1,2 - Números diferentes indicam diferença estatística comparando Luz UV ao tratamento AA + Luz UV dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

\*# - Símbolos diferentes indicam diferença estatística comparando AA ao tratamento AA + Luz UV dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

Larrainzar (2010) tentou comprovar a atividade antioxidante do AA “*in vivo*”, utilizando o microrganismo *Pseudomonas fluorescens*, utilizando as concentrações de 50, 70 e 100 µM. O AA mostrou efeito protetor apenas na concentração de 50 µM, permitindo recuperação do microrganismo após condições de estresse oxidativo. Segundo Lykkesfeldt (2002) o AA tem boa atividade como eliminador de radicais livres “*in vivo*”. Portanto, segundo Huang *et al.*, (2002) pesquisas demonstrando esse efeito “*in vitro*” são raros.

Portanto, o efeito positivo visto nesses resultados com luz UV + AA concomitante, podem ser oriundos de compostos derivados do AA. Os resultados para o crescimento médio, descontando-se o dia anterior de crescimento, mostram diferenças principalmente nos dias um a três e do quarto ao sexto dia.

Tabela 13 - Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans*, descontando-se o crescimento do dia anterior, por até sete dias nos tratamentos com luz UV (20 s), AA (5 µg mL<sup>-1</sup>) e controle.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Luz UV	AA	AA + Luz UV
1/2	0,50 ± 0,05a	0,45 ± 0,06a1	0,49 ± 0,05a*	0,76 ± 0,05b2#
2/3	1,01 ± 0,04a	1,20 ± 0,05b1	1,13 ± 0,10b*	0,85 ± 0,08b2#
3/4	0,91 ± 0,08a	1,00 ± 0,00a1	0,78 ± 0,05b*	0,91 ± 0,06a1#
4/5	0,92 ± 0,13a	0,90 ± 0,00a1	0,50 ± 0,00b*	0,81 ± 0,10b1#
5/6	0,25 ± 0,09a	0,50 ± 0,00a1	1,00 ± 0,05b*	0,61 ± 0,04b2#
6/7	0,12 ± 0,07a	0,05 ± 0,06a1	0,55 ± 0,05b	0,2 ± 0,07a1

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamentos ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

1,2 - Números diferentes indicam diferença estatística comparando Luz UV ao tratamento AA + Luz UV dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

\*# - Símbolos diferentes indicam diferença estatística comparando AA ao tratamento AA + Luz UV dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

Os resultados com o tratamento concomitante de luz VV e ASC também apresentaram algumas diferenças, mostrando mais uma vez que o comportamento da vitamina muda na presença de dano, neste caso causada pela luz UV. Quando comparado ao controle, ASC+UV, na maioria dos dias, a colônia teve seu crescimento aumentado. Quando comparado a luz UV as diferenças ficaram concentradas nos dias um, dois, cinco, seis e sete, refletindo novamente que na presença do dano o ASC apresenta resultados diferentes. Quando comparado ASC+UV com ASC não foram observadas diferenças.

Tabela 14 – Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans* por até sete dias nos tratamentos com luz UV (20s), ASC (5 µg mL<sup>-1</sup>) e controle.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Luz UV	ASC	ASC + Luz UV
1/2	0,54 ± 0,05a	0,40 ± 0,00b1	0,55 ± 0,05a*	0,56 ± 0,05a2*
2/3	1,04 ± 0,05a	0,85 ± 0,06b1	1,23 ± 0,08c*	1,26 ± 0,05c2*
3/4	2,05 ± 0,08a	2,05 ± 0,06a1	2,15 ± 0,05b*	2,16 ± 0,05b2*
4/5	2,96 ± 0,07a	3,05 ± 0,06b1	3,06 ± 0,05b*	3,09 ± 0,04b1*
5/6	3,89 ± 0,08a	3,95 ± 0,06a1	3,96 ± 0,05b*	4,01 ± 0,06b1*
6/7	4,44 ± 0,07a	4,45 ± 0,06a1	4,56 ± 0,05b*	4,56 ± 0,05b2*

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamentos ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

1,2 - Números diferentes indicam diferença estatística comparando Luz UV ao tratamento ASC + Luz UV dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

\*# - Símbolos diferentes indicam diferença estatística comparando ASC ao tratamento ASC + Luz UV dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

Os resultados do crescimento médio descontando-se o dia anterior mostram diferenças só no dia um e dois quando comparado ASC+UV com o controle e luz UV com ASC+UV. Não foram encontradas diferenças quando comparado ASC e ASC+UV.

Tabela 15 - Crescimento médio total (cm) e desvio padrão da colônia de *A. nidulans*, descontando-se o crescimento do dia anterior, por até sete dias nos tratamentos com luz UV (20 s), ASC (5 µg mL<sup>-1</sup>) e controle.

Dias	Tratamentos			
	Controle	Luz UV	ASC	ASC + Luz UV
1/2	0,50 ± 0,05a	0,45 ± 0,06a1	0,69 ± 0,06b*	0,70 ± 0,09b2*
2/3	1,01 ± 0,04a	1,20 ± 0,05b1	0,91 ± 0,08b*	0,90 ± 0,08b2*
3/4	0,91 ± 0,08a	1,00 ± 0,00a1	0,91 ± 0,08a*	0,92 ± 0,07a1*
4/5	0,92 ± 0,13a	0,90 ± 0,00a1	0,90 ± 0,00a*	0,92 ± 0,05a1*
5/6	0,25 ± 0,09a	0,50 ± 0,00a1	0,60 ± 0,00a*	0,55 ± 0,05a1*
6/7	0,12 ± 0,07a	0,05 ± 0,06a1	0,00 ± 0,00b*	0,10 ± 0,05a1*

a,b - Letras diferentes indicam diferença estatística comparando tratamentos ao controle dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

1,2 - Números diferentes indicam diferença estatística comparando Luz UV ao tratamento AA5 + Luz UV dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

\*# - Símbolos diferentes indicam diferença estatística comparando AA ao tratamento AA + Luz UV dia a dia (ANOVA, pós hoc Dunnet).

Para reduzir ou impedir os efeitos dos raios ultravioletas (UV), a indústria farmacêutica utiliza formulações contendo AA, pois, além de atuar na proteção e estimulação da síntese das proteínas estruturais da pele como o colágeno e elastina, responsáveis pela firmeza e elasticidade cutânea (Puhl *et al.*, 2018). Assim, o uso tópico da vitamina C tem se mostrado uma forma importante de proteção contra os efeitos prejudiciais da radiação UV a longo prazo (Silva *et al.*, 2023).

Com esses resultados, fica evidente que quando tratadas as colônias de *A. nidulans* concomitante com luz UV e AA ou ASC, os resultados mudam, mostrando que estudos que procurem estabelecer e entender qual é o real papel dessas vitaminas na presença de danos são essenciais, pois podem garantir o controle de danos a nível celular. Aliado a isso, reflete-se sobre o uso exacerbado de vitaminas, incluindo a vitamina C, que em concentrações mais altas apresentaram resultados significativamente negativos sobre o desenvolvimento e crescimento de *A. nidulans*.

### 3.2 Teste de viabilidade de células humanas *in vitro*

#### 3.2.1 Citotoxicidade AA

Os ensaios com AA com células HepG2 mostraram um aumento significativo na absorbância média após 24 horas de tratamento na concentração 40 ug/mL indicando um estímulo da divisão celular nesta concentração e tempo. Em contrapartida, ocorreu uma diminuição significativa após 72 horas de tratamento nas concentrações cinco, 10, 40 e 100 ug/mL quando comparado ao controle negativo (Figura 2/Tabela 16), indicando a citotoxicidade para essas concentrações e tempo.

Tabela 16 - Percentual de viabilidade de células (VC) HepG2 tratadas com diferentes concentrações do AA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT

Grupos	HepG2		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00a	100,00a	100,00a
CO+	47,18b	21,90b	13,34b
1	103,71a	104,49a	104,75a
5	109,30a	98,75a	78,25a
10	108,08a	91,02a	73,40c
15	103,65a	97,14a	77,44a
20	112,13a	95,10a	81,79a
40	121,04c	83,44a	76,17c
60	107,81a	94,63a	93,90a
80	101,66a	89,98a	81,25a
100	100,78a	84,20a	76,47c

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo. a, b Letras diferentes indicam diferença estatística quando comparado tratamento com controle positivo e negativo com 24, 48 e 72 horas (Teste de Dunnet).

Esses resultados são semelhantes aos encontrados para o crescimento de *A. nidulans*, onde concentrações mais baixas aumentaram o crescimento e concentrações mais altas inibiram o crescimento. Os resultados para AA não mostraram perfil dose-dependente ou tempo-dependente, iguais aos encontrados para o fungo.

Em um estudo realizado por Gao *et al.*, (2019), os pesquisadores inseriram uma nanoestrutura em ratos, desenvolvida e funcionalizada para que atinja a entregue às células cancerígenas uma liberação de AA com pH controlado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No ambiente ácido de hipóxia, descobriu-se que o AA enriquece as espécies redutoras, quebra o equilíbrio redox nas células HepG2 e desencadeia o estresse redutor para induzir a via de sinalização apoptótica. No estudo *in vivo* verificou que a nanoestrutura tem um efeito letal nas células tumorais e na inibição do crescimento tumoral, reduzindo assim a proliferação celular.

Assim como em um estudo realizado por Yurtcu, Iseri e Sahin (2010) utilizando diferentes concentrações (70, 35, 8 e 4 IM) por 24 e 48 horas, os resultados demonstraram que o AA e o  $\beta$ -caroteno causaram danos no DNA em células HepG2, demonstrando ainda que os danos na concentração de 70 IM foram maiores que a de 35 IM em 24 horas, também foi demonstrado no estudo o aumento da apoptose e necrose das células após 48 horas.

### 3.2.2 Citotoxicidade ASC

Os ensaios de ASC com células as HepG2 não mostraram diferença significativa para nenhuma das concentrações e tempos testados quando comparado ao controle negativo (Tabela 17).

Tabela 17 - Percentual de viabilidade de células (VC) HepG2 tratadas com diferentes concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do ASC por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT

Grupos	HepG2		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00a	100,00a	100,00a
CO+	31,97b	20,19b	12,07b
1	125,12a	109,62a	90,98a
5	125,31a	104,81a	90,52a
10	124,69a	103,06a	108,46a
15	125,55a	101,90a	92,99a
20	125,73a	104,41a	103,15a
40	105,01a	101,15a	81,66a
60	125,43a	105,01a	80,07a
80	113,51a	95,69a	73,97a
100	119,13a	89,53a	75,64a

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo. a, b Letras diferentes indicam diferença estatística quando comparado tratamento com controle positivo e negativo com 24, 48 e 72 horas (Teste de Dunnet).

O ASC não teve toxicidade nas células testadas neste trabalho, embora tenha causado dano para o crescimento de *A. nidulans*, foi observado um dano bem menor que o AA, quando o fungo foi exposto.

Diferente dos resultados encontrados nesta pesquisa, segundo Navas e Gomes-Dias (1995) há evidências de que o ASC estimula a proliferação celular em culturas de células animais, encurtando o ciclo celular e estimulando a entrada na fase S. Baixas concentrações em meio de cultura induziram uma baixa taxa de crescimento de células HL-60 que foi significativamente aumentado tanto pelo ASC em si quanto pelo radical livre de ascorbato (AFR) utilizado pelos pesquisadores. O AFR foi mais eficaz que o ASC em concentrações mais baixas, embora ambos tenham atingido o mesmo nível de estimulação a 10 M (Navas e Gomez-Diaz, 1995).

### 3.2.3 Citotoxicidade luz UV

A citotoxicidade para a luz UV mostrou toxicidade em todos os tempos de irradiação (um, cinco, 10 e 20 s), após 24, 48 e 72 horas, quando comparado ao controle negativo. Neste resultado o tempo pareceu influenciar, pois ao longo das 24 horas para 48 e para 72 horas houve diminuição da viabilidade das células (Tabela 18).

Tabela 18 - Percentual de viabilidade de células (VC) HepG2, tratadas com diferentes tempos (segundos) de radiação por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT

Grupos	HepG2		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00a	100,00a	100,00a
CO+	68,69b	20,13b	8,84b
1	80,29c	89,14c	54,68c
5	77,30c	54,69c	51,21c
10	75,29c	52,91c	23,55c
20	73,36c	50,51c	33,31c

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo. a, b Letras diferentes indicam diferença estatística quando comparado tratamento com controle positivo e negativo com 24, 48 e 72 horas (Teste de Dunnet).

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa mostram que o AA em concentrações menores aumenta o crescimento de *A. nidulans*, possivelmente por estimular a proliferação celular, enquanto concentrações maiores parecem diminuir o crescimento, atrasando

a proliferação, ou mesmo induzindo apoptose. Embora o efeito do ASC tenha sido menor nesta espécie-teste, ele teve o mesmo perfil de resposta que o AA, baixas concentrações estimulam, altas concentrações inibem. A luz UV causou aumentos no crescimento, a partir do quarto dia do tratamento. Quando feitos ensaios concomitantes com luz UV e AA e luz UV e ASC, foi observado um perfil de resposta diferente, mostrando que essas vitaminas podem ter efeito diferente na presença de dano, neste caso causado pela luz UV.

Para a cultura de células HepG2, o AA aumentou o crescimento em concentração menor e diminuiu o crescimento em concentração maior e o ASC não causou toxicidade para esta linhagem. Esse perfil de resposta é semelhante ao encontrado no fungo.

Os resultados desta pesquisa são de suma importância, uma vez que provocam uma reflexão crucial sobre a utilização de vitaminas, em particular a vitamina C, ao revelarem variações significativas em concentrações mais elevadas, especialmente em contextos de dano celular.

Estas descobertas não apenas destacam a necessidade premente de uma compreensão mais aprofundada dos efeitos da vitamina C, mas também apontam para possíveis implicações no desenvolvimento de terapias e intervenções médicas. Ademais, os resultados obtidos instigam a realização de testes adicionais, visando esclarecer estas questões, bem como aprofundar o conhecimento sobre o perfil de estresse oxidativo das células expostas aos tratamentos. Assim, esta pesquisa não apenas contribui para o avanço do conhecimento científico, mas também lança luz sobre potenciais direções futuras na área da saúde e medicina.

## 5. REFERÊNCIAS

ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology and Molecular Biology**. v. 62, n. 1, p. 35-54, 1998.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ARRUDA, G.; SOARES, I. A.; ROCHA, C. L. M. S. C. Effect of nutritional factors on the *Aspergillus nidulans* germination program. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4. 2021. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/28129/22274>. Acesso em: 23. abr. 2022.

AZQUETA, A. et al. Vitamin C in Cultured Human (HeLa) Cells: Lack of Effect on DNA Protection and Repair. **Nutrients** 2013, 5, 1200-1217

BERNSTEIN, C., et al. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. **Mutat Res.** 511, 145-78 (2002).

BERTI, A. P. et al. Efeitos do suco comercial de Aloe vera L. na germinação e antimutagênese em *Aspergillus nidulans* e pelo ensaio cometa em ratos Wistar **R. bras. Bioco.**, Porto Alegre, v. 14, n.2, p. 130-136, abril. /jun. 2016

CADET, J.; DOUKI, T. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 12, 2018.

DU, J.; CULLEN, J.J.; BUETTNER, G. R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochim Biophys Acta.** v. 1826, n. 2, p. 443–457, dec. 2012.

GAO X, WEI K, HU B, XU K, TANG B. Ascorbic acid induced HepG2 cells' apoptosis via intracellular reductive stress. **Theranostics.** v. 9, n. 14, 2019. DOI: 10.7150/thno.33783.

HUANG, H. Y., APPEL, L. J., CROFT, K. D., MILLER, E. R., MORI, T. A. Y PUDDEY, I. B. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 76, 2002.

ITHARAT, A. et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, 2004.

KAZMIERCZAK-BARANSKA et al. Two Faces of Vitamin C - Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. **Nutrients.** v. 12, n. 5. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/5/1501>. Acesso em: 23. abr. 2022.

LARRAINZAR, M. G. **Control de microorganismos alterantes y patógenos de la leche y queso de oveja de la provincia de León por D-eritroascorbato, un análogo natural de la vitamina C y otros antioxidantes utilizados en la industria alimentaria.** Leon: 2010. 288 p. Tese (Doutorado). Universidad de Leon, Espanha, 2010.

LYKKESFELDT. J.; TVEDEN-NYBORG, P. The Pharmacokinetics of Vitamin C. **Nutrients.** v. 9, n.11(10). oct. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6835439/>. Acesso em: 23. abr. 2022.

OLIVEIRA, U. D.; MARINS, J. F.; CHIUCHETTA, S. J. R. Avaliação do ciclo celular de *Aspergillus nidulans* exposto ao extrato da planta *Copaifera officinalis* L. **SaBios.** v. 1, n. 2, p. 42-47, 2006.

PALIOTO, N. F.; PALIOTO, G. F.; ROCHA, C. L. M. S. C. Efeito mutagênico de baixa dose de ultravioleta no sistema *methG1* em *Aspergillus nidulans*. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR.** v. 14, 2010.

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**. v. 5, p. 141-238, 1953.

PUHL, G. M. D.; SILVA, E.; FELLER, A. G.; ZIMMERMANN, C. E. A importância do ácido ascórbico no combate ao envelhecimento. **Revista Saúde Integrada**, v. 11, n. 22, 2018.

REIS, M. F. dos.; ROCHA, C. L. M. S. C. Análise citológica do efeito dos extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre os ciclos de desenvolvimento de *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. **SaBios**. v.9, n.1, p.100-107, 2014

SANTOS, J. T. et al. Os efeitos da suplementação com vitamina c. **Revista Conhecimento Online**, v. 1, p. 139–163. abr. 2019. Disponível em: <https://periodicos.feevale.br/seer/index.php/revistaconhecimentoonline/article/view/1187>. Acesso em: 23. abr. 2022.

SENA, M. et al. Efeito da suplementação com selênio e com vitamina C e sobre biomarcadores hematológicos em militares durante treinamento físico vigoroso e prolongado. **Jornal de Investigação Médica** v. 3, n. 1, 2022. Disponível em: <https://revistas.ponteditora.org/index.php/jim/article/view/486>. Acesso em: 23. abr. 2022.

SILVA, G. F. G.; SILVA, J. L.; LOCATELLI, K. M. M.; AMANCIO, N. F. G. Os efeitos da vitamina C na prevenção do envelhecimento cutâneo: Uma revisão integrativa da literatura. **PEER REVIEW**, Vol. 5, Nº 26, 2023.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. **Free Radic Biol Med**. v. 122, p. 116–129, jul. 2018.

STENBÄCK, F. Cellular Injury and Cell Proliferation in Skin Carcinogenesis by UV Light. **Oncology** 1 February 1975; 31 (2): 61–75. <https://doi.org/10.1159/000225008>

STEVENS, J. B. et al. Mitotic cell death by chromosome fragmentation. **Cancer Research**. v. 67, 2007.

TIMBERLAKE, W. E.; CLUTTERBUCK, A. J. Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. (Eds.) **Aspergillus: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994. p. 383.1994.

YURTCU, E., ISERI, O.D. & SAHIN, F.I. Effects of ascorbic acid and  $\beta$ -carotene on HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. **Mol Biol Rep** v. 38, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0549-5>

## Financiamento

Não houve financiamento para este estudo.

**Conflitos de interesses**

Não há conflitos de interesses.

**Aspectos éticos**

Não se aplica.

**Apresentação prévia**

Este artigo é resultante da dissertação de mestrado intitulada Efeito do Ácido Ascórbico, Ascorbato e Luz UV Sobre Células HepG2 e o Fungo Filamentoso *Aspergillus nidulans*, de autoria de Mário Sérgio Braga do Couto, pelo Programa de Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade do Oeste do Paraná, defendida em 2024.

## 7. ANEXOS

Normas de publicação da revista “Trabalho, Educação e Saúde”

### **Instruções aos autores**

Solicitamos que, antes de submeter o seu manuscrito, os autores leiam a Política editorial da TES e a seção Sobre a revista para avaliar se seu texto está de acordo com o nosso escopo editorial.

Os manuscritos devem ser submetidos somente pelo sistema de avaliação *online* da Revista, disponível aqui . Não serão consideradas contribuições enviadas por *e-mail*. Para o envio do texto à revista, o autor responsável deve **cadastrar-se no sistema** e **depois cadastrar seu texto**, informando o seu ORCID e os de eventuais coautores.

Ao submeter um manuscrito, é imprescindível a leitura e o atendimento das normas para publicação referidas pela revista.

Para informações adicionais, consultar os editores: [revtes.epsjv@fiocruz.br](mailto:revtes.epsjv@fiocruz.br)

### **Forma e preparação de manuscritos**

A revista aceita como submissões espontâneas artigos e artigos de revisão.

Os **Artigos** devem apresentar resultados de pesquisas de natureza empírica ou conceitual. Tamanho entre 4.000 e 7.000 palavras, sem contar referências bibliográficas, figuras e notas.

Os **Artigos de revisão** devem apresentar análises críticas, sistematizadas e metodologicamente consistentes da literatura científica sobre um tema prioritário para o periódico. Deverão explicitar objetivos, fontes pesquisadas, aplicações dos critérios de inclusão e exclusão. Tamanho: 4.000 a 7.000 palavras, sem contar referências bibliográficas, figuras e notas.

### **Apresentação do manuscrito**

Colaborações devem ser digitadas no Word, na fonte Times New Roman, em corpo 12, em espaço duplo. Artigos, ensaios, notas de conjuntura e debates devem ainda conter um resumo em português, espanhol e inglês de, no máximo, 200 palavras, e título em inglês e espanhol, além do título na língua original. Os manuscritos podem

ser apresentados em português, espanhol, inglês e francês. O título deve ser conciso e representativo do conteúdo do texto. O(s) autor(es) deve(m) indicar se a pesquisa é financiada, se é resultado de dissertação de mestrado ou tese de doutorado, se foi aprovada por Comitê de Ética da área e se há conflitos de interesse.

**Palavras-chave** Mínimo de três e máximo de cinco palavras-chave descritoras do conteúdo do trabalho, apresentadas na língua original, em espanhol (*palabras clave*) e em inglês (*keywords*).

**Figuras** Tabelas, quadros, diagramas, fotografias, gráficos e ilustrações devem, necessariamente, estar inseridos no seu devido lugar no corpo do texto e ser também enviados separadamente como material suplementar. Não devem ultrapassar o máximo de seis por artigo, salvo exceções específicas ao campo temático do manuscrito, caso em que o autor deverá manter uma comunicação prévia com os editores. Todas as figuras, com exceção de fotografias, devem ser numeradas e ter título, estando apenas as iniciais do título em maiúsculas. As referências devem ser feitas por números (ex. Gráfico 3) e não por expressões como “a figura abaixo”.

**Notas** As notas devem vir ao fim do texto, sucintas e numeradas de forma consecutiva. Não devem ser utilizadas para referências bibliográficas.

**Grifos** Solicita-se a não utilização de sublinhados e negritos. As aspas simples podem ser usadas para chamar a atenção para um item particular do texto. Palavras de outras línguas, que não o português, devem ser italicizadas, assim como títulos de obras mencionadas.

**Citações** Para elaboração das citações, *Trabalho, Educação e Saúde* (TES) baseia-se na norma NBR 10520:2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), com ligeiras modificações. A TES adota o sistema Autor-data, com os sobrenomes dos autores escritos em caixa alta e baixa e ano da publicação, no corpo do artigo.

Exemplo:

(Frigotto; Ciavatta, 2001).

A *citação direta*, no corpo do texto, de até três linhas, deve vir entre aspas duplas, sobrenome do autor e, entre parênteses, o ano e a página. Ou: citação direta, entre parênteses o nome do autor, ano e página. Aspas simples indicam citação no interior da citação. Exemplos:

Minayo (2001, p. 74) descreve: “[...] a análise de conteúdo é compreendida muito mais como um conjunto de técnicas”.

Monografia “no sentido lato, é todo trabalho científico de ‘primeira mão’, que resulte da investigação científica” (Salomon, 1978, p. 219).

Se a citação direta exceder três linhas, deverá vir com recuo de 4 cm da margem esquerda, em corpo 11. Exemplo:

O uso intensivo da microeletrônica e a crescente automação dos laboratórios, principalmente a partir da década de 1980, vem causando mudanças importantes no processo produtivo, na organização do trabalho e nas relações sociais (Deluiz, p. 99, 1995).

Nas *citações indiretas*, a indicação da(s) página(s) consultada(s) é opcional. A citação indireta ocorre quando o autor faz um texto baseado na obra do autor consultado.

Exemplo:

As emoções, independentes da vinculação ou não com o ambiente organizacional, influenciam no desempenho das pessoas (Frost, 2003).

Se a citação tiver texto traduzido pelo autor, deve incluir o termo “tradução nossa”.

Exemplo:

“Ao final de duas semanas, avalie sua experiência” (McGraw, Deane e Francis, 2009, p. 28, tradução nossa).

No caso de citação com três autores, todos devem ser nomeados; mais de três autores, somente o sobrenome do primeiro deverá aparecer no texto, como em Spink *et al.* (2001).

Para enfatizar trechos da citação, destaque-os com a expressão “grifo nosso” entre parênteses, após a chamada da citação, ou “grifo do autor”, caso o destaque já faça parte da obra consultada. Exemplos:

A *hipótese da escassez* não explica sozinha o processo de mudança de valores de uma sociedade. (Okado; Ribeiro, 2017, p. 10, grifo do autor).

Em *termos de comportamento*, a motivação pode ser conceituada como esforço e tenacidade exercidos pela pessoa para fazer algo ou alcançar algo. (Chiavenato, 1994, p. 165, grifo nosso)

Adotar a ordem cronológica em que os documentos foram publicados, separados por ponto e vírgula, no caso de vários citados em sequência. Exemplo: (Crespo, 2005; Costa; Ramalho, 2008; Moresi *et al.*, 2010).

**Referências** Para elaboração das referências, a *Trabalho, Educação e Saúde* baseia-se na norma NBR 6023:2018, da ABNT, com ligeiras modificações. As referências bibliográficas devem ser elencadas, em ordem alfabética de autores, ao final do manuscrito e conter todas as obras citadas no corpo do texto, compondo assim a lista de referências, sem numeração de entrada e com espaço simples entre elas. Quando houver até três autores, todos devem ser indicados. No caso de mais de três autores, indicar apenas o primeiro, seguido da expressão *et al.* O primeiro nome dos autores deve ser escrito por extenso nas referências. Diferentes títulos de um mesmo autor publicados no mesmo ano deverão ser distinguidos, adicionando-se uma letra (a, b, c...) em minúscula após a data, tanto nas citações no corpo do texto quanto na lista de referências bibliográficas. Os títulos dos periódicos devem ser escritos por extenso. O autor é responsável pela exatidão e pertinência das referências. Para os casos não exemplificados, o autor deve consultar a norma NBR 6023:2018, da ABNT. No caso de existir um número DOI para o documento, ele deve ser incluído ao final da referência. Observem-se os exemplos a seguir:

#### **Artigo em periódico eletrônico**

TESSER, Charles D.; NORMAN, Armando H.; VIDAL, Tiago B. Acesso ao cuidado na Atenção Primária à Saúde brasileira: situação, problemas e estratégias de superação. *Saúde em Debate*, Rio de Janeiro, v. 42, núm. esp. 1, p. 361-378, 2018. <https://doi.org/10.1590/0103-11042018S125>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sdeb/a/cLcqmXhpPLWJjJMWrq9fL4K/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 17 mar. 2022.

SPINK, Mary J. P. *et al.* A construção da Aids-notícia. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 851-862, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102->

311X2001000400019. Disponível em: <https://scielosp.org/pdf/csp/v17n4/5291.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2020.

Se não houver DOI:

FONTES, Virgínia. Capitalismo em tempos de uberização: do emprego ao trabalho. *Marx e o Marxismo*: Revista do NIEP, Rio de Janeiro, v. 5, n. 8, p. 46-67, jan./jun. 2017. Disponível em: <https://www.niepmarx.blog.br/revistadoniep/index.php/MM/article/view/220>. Acesso em: 10 out. 2020.

### **Artigo fora de periódico eletrônico**

MACHADO, Antônio B. Reflexões sobre a organização do processo de trabalho na escola. *Educação em Revista*, Belo Horizonte, n. 9, p. 27-31, jul. 1989.

CARVALHO, Jorge. Agora é o desafio local-global. Entrevistado: Peter Senge. *HSM Management*, São Paulo, n. 76, p. 50-57, set./out. 2009.

### **Livro e tese**

GRAMSCI, Antonio. *Os intelectuais e a organização da cultura*. 4. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982.

MENDES-GONÇALVES, Ricardo B. *Medicina e história: raízes sociais do trabalho do médico*. 1979. 253f. Dissertação (Mestrado em Medicina Preventiva) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

### **Capítulo de livro**

BOURDIEU, Pierre. O campo científico. In: ORTIZ, Renato (org.). *Pierre Bourdieu: sociologia*. São Paulo: Ática, 1983. p. 122-155.

### **Congresso (evento) no todo**

CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, 10., 2017, Florianópolis. *Anais* [...]. Florianópolis: Associação Brasileira de Saúde Coletiva (Abrasco), 2017. Tema: Epidemiologia em defesa do SUS: formação, pesquisa e intervenção.

### **Partes de congresso (Evento)**

SILVA, Levy S. Uma análise experimental do impacto da seleção de atributos em processos de resolução de entidades. *In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCO DE DADOS*, 34., 2020, Fortaleza. *Anais [...]*. Fortaleza, 1994. p. 1-12.

### **Dados oferecidos por agências governamentais (Secretarias, Ministérios, IBGE etc.)**

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. *Plano de contingência para resposta às emergências em saúde pública: doença pelo SARS-CoV-2: Covid-19*. Florianópolis: SES-SC, 2020.

RIO DE JANEIRO (Município). Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (SMS-RJ). *Dados sobre acidentes ocupacionais com material biológico*. Rio de Janeiro: SMS-RJ, 2000.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E CULTURA (Unesco). *Política de mudança e desenvolvimento no ensino superior*. Rio de Janeiro: Garamond, 1999. 98p.

### **Leis, decretos, portarias etc.**

BRASIL. Lei n. 9.394, de 20 de dezembro de 1996. Estabelece as Diretrizes e Bases da Educação Nacional. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*: Seção 1, Brasília, DF, p. 27.839, 23 dez. 1996.

### **Legislação em meio eletrônico**

BRASIL. [Constituição (1988)]. *Constituição da República Federativa do Brasil de 1988*. Brasília, DF: Presidência da República, [2016]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Constituicao/Constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constituicao.htm). Acesso em: 1 jan. 2017.

### **Relatórios técnicos**

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Educação. *Referencial curricular para curso técnico de agente comunitário de saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. 64 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

### **Relatórios final ou de atividades**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Boletim observatório Covid-19 após 6 meses de pandemia no Brasil*. Rio de Janeiro: Observatório Covid-19, Edição Oficial, [2020]. 22 p. Disponível em: [https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/boletim\\_covid\\_6meses.pdf](https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/boletim_covid_6meses.pdf). Acesso em: 27 out. 2020.

### **Jornal**

- a) Sem indicação de autoria, entra pelo título: FÓRUM de debates discute o projeto Educando o Cidadão do Futuro. *O Globo*, Rio de Janeiro, 6 jul. 2001. Caderno 1, p. 18.
- b) Com autoria: TOURAINE, Alain. Uma resistência possível. *Folha de S. Paulo*, São Paulo, 3 jul. 2001. Mais, Caderno 7, p. 18-20.

### **Internet**

a. *Entrevista em periódico eletrônico:*

AZZARÀ, Stefano G. Crítica ao liberalismo, reconstrução do materialismo. Entrevista com Domenico Losurdo. *Crítica Marxista*, Campinas, n. 35, p. 157-169, 2012. Disponível em: [http://www.ifch.unicamp.br/criticamarxista/arquivos\\_biblioteca/entrevista19Entrevista.pdf](http://www.ifch.unicamp.br/criticamarxista/arquivos_biblioteca/entrevista19Entrevista.pdf). Acesso em: 7 out. 2013.

b. *Reportagem em jornal eletrônico:*

NUBLAT, Johanna. 38,7% dos usuários de *crack* das capitais do país estão no Nordeste. *Folha de S. Paulo*, São Paulo, 19 set. 2013. Seção Cotidiano. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2013/09/1344256-40-dos-usuarios-de-crack-das-capitais-do-pais-estao-no-nordeste.shtml>. Acesso em: 27 set. 2013.

LIMÓN, Raúl. Pfizer afirma que sua vacina contra o coronavírus tem eficácia de 90%. *El País*, Brasil, 9 nov. 2020. Disponível em: <https://brasil.elpais.com/brasil/2020-11-09/pfizer-afirma-que-sua-vacina-contra-o-coronavirus-tem-uma-eficacia-de-90.html>. Acesso em: 18 nov. 2020.

c. *Texto disponível* (fora de revista ou jornal):

BRASIL. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Média e Tecnológica. *Educação profissional: referenciais curriculares nacionais da educação*

profissional de nível técnico. Área profissional: saúde. Brasília: MEC, 2000. Disponível em: <http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/saude.pdf>. Acesso em: 3 out. 2013.

d. *Redes sociais*

LIMA, Nísia T. Um importante debate sobre as ações da Fiocruz no combate à pandemia da Covid 19, no momento em que a instituição comemora 120 anos. Rio de Janeiro, 22 maio, 2020. Facebook: nisia.trindadelima. Disponível em: <https://www.facebook.com/nisia.trindadelima>. Acesso em: 29 jul.2021.

CARNEIRO, Sueli. Carta compromisso pelo direto à educação das meninas negras – Geledés. 10 jun. 2021. Twiter: @suelicarneiro. Disponível em: <https://twitter.com/SueliCarneiro/status/1403020818544840708?s=08>. Acesso em: 30 jul. 2021.

e. *Listas de discussão*

BVS Educação Profissional em Saúde: lista de discussão. Rio de Janeiro: EPSJV, 2020. Disponível em: <http://www.bvseps.iciet.fiocruz.br/>. Acesso em: 1 jul. 2021.

f. *Wikipédia*

TRANSPLANTE de medula óssea. *In*: WIKIPEDIA: thefreeencyclopedia. [San Francisco, CA: Wikimedia Foundation, 2017]. Disponível em: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Transplante\\_de\\_medula\\_%C3%B3ssea](https://pt.wikipedia.org/wiki/Transplante_de_medula_%C3%B3ssea). Acesso em: 15 maio 2017.

g. *Blog*

PACKER, Abel L. *et al.* SciELO pós 20 Anos: o futuro continua aberto. *In*: SciELO - Scientific Electronic Library Online. *Blog Scielo em Perspectiva*. São Paulo, 19 dez. 2018. Disponível em: [https://blog.scielo.org/blog/2018/12/19/scielo-pos-20-anos-o-futuro-continua-aberto/#.YNtqkuhKg\\_4](https://blog.scielo.org/blog/2018/12/19/scielo-pos-20-anos-o-futuro-continua-aberto/#.YNtqkuhKg_4). Acesso em: 29 jun. 2021.

h. *Live no Youtube*

ÁGORA Abrasco. Painel: desafios da proteção social em tempos de pandemia. Coordenação: Cristiani Machado. Convidados: Esther Dweck, Paola Carvalho, Eduardo Fagnani, [S. I.]: TV Abrasco, 10 jun. 2020. 1 vídeo (158 min). *Live*. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=eKt8xqXJ-1Q>. Acesso em: 27 maio 2021.

### **Revisão de texto em língua portuguesa**

A revista se reserva o direito de sugerir alterações em usos informais da língua e de corrigir variantes não padrão do português.

A responsabilidade pelos custos de revisão profissional de idioma é dos autores, a ser realizada por revisores habilitados pela revista ou por profissional de sua preferência, desde que siga o manual de estilo da TES para revisores, disponível sob demanda. A tradução para outro idioma é opcional.

## COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

**Para:** Mário Sérgio Braga do Couto <mario.sergio775@hotmail.com>

**Assunto:** [Fiocruz/TES] Agradecimento pela submissão

Prezado(a) Mário Sérgio Braga do Couto

Agradecemos a submissão do manuscrito de sua autoria intitulado "EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO, ASCORBATO E LUZ UV SOBRE CÉLULAS HEPG2 E O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus nidulans*" à TES Trabalho, Educação e Saúde.

Informamos que os textos serão avaliados numa primeira etapa pelas editoras, em um prazo médio de 15 dias. Após conclusão dessa primeira avaliação, entraremos em contato.

Acompanhe o progresso da sua submissão por meio do sistema, disponível em:

URL da submissão:

<https://www.tes.epsjv.fiocruz.br/index.php/tes/authorDashboard/submission/2941>

Login: 01586935666

Atenciosamente,

Coordenação editorial

### **TES | Trabalho, Educação e Saúde**

*Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Fundação Oswaldo Cruz*

*Avenida Brasil, 4.365 - Manguinhos - CEP 21040-360*

*Rio de Janeiro - RJ - Brasil*

*Tels.: (21) 3865-9850 / (21) 3865-9853*

*e-mail: revtes.epsjv@fiocruz.br*

 Responder

 Encaminhar