



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR – PPBM

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOPROTETORA DE
TANINOS HIDROLISÁVEIS COMO PROTEÇÃO CONTRA A AÇÃO TÓXICA DE
METAL PESADO**

JANAÍNA ESMERALDO ROCHA

**CRATO – CE
2018**

JANAÍNA ESMERALDO ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOPROTETORA DE
TANINOS HIDROLISÁVEIS COMO PROTEÇÃO CONTRA A AÇÃO TÓXICA DE
METAL PESADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri– URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Coorientador:

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares

**CRATO – CE
2018**

JANAÍNA ESMERALDO ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOPROTETORA DE
TANINOS HIDROLISÁVEIS COMO PROTEÇÃO CONTRA A AÇÃO TÓXICA DE
METAL PESADO**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Dissertação apresentada em: 23/07/2018

Resultado: APROVADA

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – URCA
(Orientador da Dissertação)

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares—UNILEÃO
(Coorientador da Dissertação)

Prof. Dr. Raimundo Nonato Pereira Teixeira—URCA
(Avaliador Interno)

Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro- UFCA
(Avaliador Externo)

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha- URCA
(Avaliador Interno – Suplente)

Dedico este trabalho ao meu amado avô,
minha mãe e minha avó (*in memoriam*) e ao
meu amado e querido, Pereira Júnior!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à Deus, tudo que eu já conquistei na minha vida devo à Ele. Obrigada Senhor por nunca me abandonar e nunca permitir que eu perca a fé, e a força pra lutar! Que o Senhor esteja sempre do meu lado, te amo meu Pai!

Quero agradecer também a Maria Terezinha (minha mãe), Zé Bento (voinho) e Socorro Bento (vovó), sei que hoje vocês estão presente apenas no meu coração, mas saibam que essa vitória é graças a vocês também! Que possam sentir todo o meu amor e toda a minha gratidão.

A minha irmã Juliana, por todo amor, companheirismo e por todas as vezes que orou e ora por mim, pedindo a Deus que realize meus sonhos e me abençoe. Agradecer a meu querido sobrinho Enzo, que mesmo pequeno é tão grande e importante na minha vida. Tudo que faço é também por vocês. Saibam que os amo muito.

A meu tio João, por todo incentivo de sempre, por me apoiar seja financeiramente seja com seu exemplo de estudo, obrigado por suas palavras, pela contribuição nos meus estudos e em tudo. A minha tia Lia, que mesmo as vezes sem entender o que faço, torcer por mim, orar e querer sempre o meu bem. A vocês minha eterna gratidão.

A meu melhor amigo, companheiro, confidente, amor da minha vida, Pereira Júnior (mozão), amor me falta palavras pra descrever o quanto você é importante e especial na minha vida. Obrigada por todo carinho, atenção, cuidado, amor. Obrigado por me incentivar em todos os sentidos, inclusive nos meus estudos. Saiba que tenho muito orgulho de você, que pra mim é um exemplo de pessoa e de profissional. Essa vitória é tão minha quanto sua. Sem você nada disso aconteceria. Nada melhor na vida do que admirar quem a gente ama. Te amo pra sempre!!!

A meu orientador Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, por ter aceitado me orientar (sei que não é fácil), por todos os conselhos, ajuda. O senhor é mais que um orientador, é um incentivador! Tenho muito orgulho de ser sua aluna. Lhe admiro pelo profissional e pessoa que é! Certamente não estaria aqui sem a sua ajuda. Obrigada pela pesquisa, pela ciência, pelas risadas, brincadeiras e principalmente por todos os seus ensinamentos.

A meu coorientador Prof. Dr. Aracélio Viana Colares, por toda ajuda, não somente nesse momento mas em todos aqueles que o antecederam, foram cruciais para que eu pudesse chegar até aqui. Professor muito obrigada por todos os conselhos, ajuda, por sempre me acalmar nos meus momentos de agoniação (e não são poucos). Obrigada por tudo.

A Prof. Dra. Maria Flaviana, por seu jeito doce e delicado de ser. Por sempre ter uma palavra amiga e uma abraço apertado pra oferecer. Obrigada por todos os conselhos e por torcer por mim. Sei que em você tenho uma amiga e uma incentivadora.

Ao Prof. Dr. Francisco Cunha, por todos os momentos de descontração, mas também de aprendizado. Por muitas vezes parar pra aconselhar, pra explicar algum assunto e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Raimundo Nonato e Prof. Dr. Juan Alvarez pelo aceite em fazer parte da minha banca e por todas as contribuições no meu trabalho.

A Maria Karollyna (Karol), por sua amizade e por tornar essa jornada mais amena. Amiga muito obrigada por todos os seus conselhos, por todas as vezes e olhe que não foram poucos, de desabafos, risos, do nosso vai da certo, a gente vai conseguir, pode parecer bobagem mas isso é muito importante na caminhada. Obrigada por estar ao meu lado desde a graduação e também no mestrado, que a nossa amizade possa se perpetuar por longos anos.

A minha companheira de laboratório e querida amiga Camila. Amiga obrigada por toda a ajuda, todos os conselhos, todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório. Obrigada por tudo amiga, você fez essa caminhada ser muito mais branda. Que nossa amizade e parceria seja duradoura.

A Amanda Karine, Elba, Corrinha, Fábria, Yedda e Thiago, por toda a ajuda nos testes e por toda amizade a mim dedicada. Minha gente sem vocês esse trabalho não teria sido concluído, obrigada por toda ajuda, saibam que sempre podem contar comigo.

A todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Saulo, Datiane, Raquel, Raimundo, Debóra, Cristina, Jacqueline, Judson, Rafael, Audilene, Joara, Linkon, Carol, Maciel, Thassya por todo companheirismo e por todos os momentos vividos dentro do laboratório.

A Tássia Guedes, pela colaboração na execução dos artigos.

A todos os meus colegas e amigos do PPBM, por todos os momentos compartilhados.

A Dayna Belo, Rodrigo Figueiredo e Eduardo Santos, por toda amizade e conselhos. A amizade de vocês é muito importante para mim.

A todo o corpo docente da UNILEÃO, onde fiz minha graduação, que me inseriu dentro da pesquisa. A todos os professores muito obrigada por todo conhecimento repassado. Em especial ao Prof. Dr. José Galberto, pelo primeiro conselho dado a quase seis anos atrás “guardem papéis”, e foi esses papéis (cursos, certificados...) que também me ajudaram a entrar no mestrado.

A todos os professores do PPBM por todos os ensinamentos.

A Universidade Regional do Cariri (URCA) pelo acolhimento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Em fim, a todos que de alguma forma contribuíram para o meu trabalho e meu crescimento profissional e pessoal!

“Tudo posso Naquele que me fortalece”
(FILIPENSES, 4:13)

RESUMO

As atividades realizadas pelo homem, seja na mineração, na indústria, entre outras, vêm contribuindo para o aumento da contaminação no solo por metais tóxicos, como por exemplo, o mercúrio. Este metal é encontrado em pequenas concentrações, porém bem distribuído na crosta terrestre. Possui elevada toxicidade, podendo ligar-se à proteínas causando bloqueio de enzimas. Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, conseguindo quelar alguns metais de transição. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante dos taninos, ácido gálico, ácido caféico e pirogálico e seu efeito citoprotetor em modelos procarioto, eucarioto unicelular e vegetal. Para determinação da atividade antioxidante, foi utilizado o radical DPPH e também a quelação de íons ferro, onde as três substâncias acima citadas, demonstraram um elevado potencial antioxidante, em alguns pontos apresentando valores próximos ao controle. Para os testes microbiológicos, foi feita a microdiluição seriada, obtendo-se assim o valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e a partir da concentração subinibitória, foi determinado a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Fungicida Mínima (CFM). O ácido gálico apresentou uma citoproteção ao modelo fúngico, conferindo um maior número de sobrevivência do microrganismo na presença do cloreto de mercúrio quando o produto também estava presente. Para avaliar o efeito citoprotetor em sementes de *Lactuca sativa*, foi utilizado uma concentração sub-alelopática do produto (32µg/mL) e diferentes concentrações do metal tóxicos (1,25, 0,5, 0,05 e 0,01mM). O produto conferiu uma citoproteção as sementes de alface permitindo que houvesse um maior alongamento das caulículas e radículas e também permitiu um melhor desenvolvimento dessas partes. Esses resultados se mostram além de inovadores, promissores, para que se permita um melhor crescimento de vegetais em solos contaminados por metais pesados.

PALAVRAS-CHAVE: Metal pesado; Taninos; Citoproteção

ABSTRACT

The activities carried out by man, whether in mining, in industry. among others, have contributed to the increase of soil contamination by heavy metals, such as mercury. This metal is found in small concentrations, but well distributed in the earth's crust. It has high toxicity, being able to bind to proteins causing enzyme blockade. The phenolic compounds have antioxidant activity, being able to chelate some transition metals. The objective of this work was to evaluate the antioxidant activity of tannins, gallic acid, coffee, and pyrogallol and to evaluate its cytoprotective effect in prokaryotic and unicellular and vegetable eukaryotic models. For the determination of the antioxidant activity, the DPPH radical and the iron chelation test, where the three substances mentioned above, demonstrated a potential antioxidant activity, in some points presenting values close to the control. For the microbiological tests, the serial microdilution was done, thus obtaining the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) value, and from the subinhibitory concentration, Minimal Bactericidal Concentration and Minimum Fungicide (CBM) and (CFM) were determined, respectively. Gallic acid presented a cytoprotection to the fungal model, conferring a greater number of survival of the microorganism in the presence of mercury chloride when the product was also present. To evaluate the cytoprotective effect in *Lactuca sativa* seeds, a sub-allelopathic product concentration (32 µg / mL) and different concentrations of heavy metal (1,25, 0,5, 0,05 and 0,01mM) were used. The product conferred a cytoprotection on the lettuce seeds allowing a greater elongation of the rootlets and radicles and also allowed a better development of those parts. These results are in addition to promising innovators to allow better plant growth in soils contaminated with heavy metals.

KEYWORDS: Heavy metal; Tannins; Cytoprotection

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química do Ácido Caféico	24
FIGURA 2: Estrutura química do Ácido Gálico	25
FIGURA 3: Estrutura química do Pirogalol	26

LISTA DE ABREVIATURAS

HgCl ₂	Cloreto de Mercúrio
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CA	<i>Candida albicans</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônia
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentrações Bactericidas Mínimas
CRD	Delineamento Experimental Inteiramente Casualizado
GRI	Índice de Taxa de Germinação
HIA	Agar Heart Infusion
NCCLS	Comitê Nacional de Normas de Laboratórios Clínicos
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EC ₅₀	Concentração Efetiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Metais Tóxicos	19
3.1.1 Mercúrio	20
3.2 Compostos Fenólicos.....	21
3.2.1 Taninos	22
3.3 Citoproteção	26
3.4 Atividade Antioxidante.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Substâncias	30
4.1.1 Taninos	30
4.1.2. Cloreto de mercúrio.....	30
4.2 Atividade Antioxidante (DPPH).....	30
4.3 Atividade Quelante de Ferro.....	30
4.4 Teste de citoproteção em modelo procarioto e eucarioto	31
4.4.1 Meios de Cultura e Inoculação dos Microrganismos	31
4.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	31
4.4.3 Avaliação do potencial efeito citoprotetor em bactérias e fungos contra cloreto de mercúrio	32
4.5 Testes de alelopátia dos taninos em sementes de <i>Lactuca sativa</i> L.	33
4.6 Avaliação do efeito citoprotetor dos taninos em um modelo de planta (<i>L. sativa</i>) contra cloreto de mercúrio	33
4.7 Análise Estatística	34
5. RESULTADOS	36
5.1 Resultado 1	36
5.2 Resultado 2	56
5.3 Resultado 3	78
5 CONCLUSÃO.....	102

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As atividades antropogênicas em diversos setores, como a indústria, tem colaborado para liberação de rejeitos orgânicos e inorgânicos, como também de metais pesados no solo (BHARGAVA et al., 2012). Estes não são biodegradáveis e causam toxicidade aos organismos vivos (CHAVES, 2008).

Um desses metais é o mercúrio, que se encontra em pequenas concentrações, e se apresenta na forma orgânica e inorgânica, possuindo elevada toxicidade. A dimensão dos efeitos tóxicos apresentados por ele, pode ter uma grande variação, dependendo por exemplo, da dose exposta, do tempo de exposição na presença do metal e a idade do indivíduo (AZEVEDO, 1994; LACERDA, 2004; CLARKSON E MAGICIANS, 2006). Segundo a OMS (2003) se esses sintomas aumentarem, o paciente pode vir a óbito.

Procura-se alternativas para descontaminação desses ambientes, assim permitindo a sobrevivência dos organismos existentes naquela área. Os vegetais apresentam metabolismo secundário e um dos seus produtos são os compostos fenólicos, que advem da via do ácido chiquímico. Nestes compostos fenólicos, dentre outras atividades que possuem, pode-se citar a antioxidante (SIMÕES et al., 2007; OLIVEIRA et al, 2013).

Dentre esses compostos podemos citar os taninos. Estes são compostos fenólicos e apresentam diversas atividades, como adstringente e habilidade de se ligar a proteínas, possuindo elevado peso molecular. Os taninos podem ser facilmente encontrados em várias partes das plantas, como casca, fruto e folhas. Apresentam também atividade antioxidante. Dentre os taninos podemos citar o ácido gálico, ácido caféico e pirogalol. O ácido gálico é o ácido 3,4,5-trihidroxibenzeno, o caféico tem fórmula química $C_9H_8O_4$ e o pirogalol $C_6H_6O_3$ (MEDONÇA, et al., 2003; GODOY, 2007; SIMOES et al, 2007; PAES, et al 2005).

Esses taninos podem ser divididos em duas classes de acordo com sua estrutura química, os taninos condensados, que possui a ligação entre dois ou mais monômeros de flavan-3-diol ou flavan-3-4-diol e os hidrolisáveis que possuem ligações éster-carboxílica. Dentre estes podemos citar o ácido gálico, ácido caféico e pirogalol (ZUANAZZI, 2000; HAGERMAN; BUTLER, 1978; PRASAD et al, 2010; ALHAN et al, 2011; HERGERT, 1989).

Antioxidantes são substâncias que em pequenas concentrações conseguem retardar, dificultar ou até mesmo inibir a oxidação do substrato. Os compostos fenólicos possuem essa atividade, podendo também quelar os metais de transição (ATOUI, A.K et al.,2005; SOARES, S.E.,2002).

Diante do exposto este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do ácido gálico, ácido caféico e pirogálico, como também avaliar o seu efeito citoprotetor em modelo bacteriano, fúngico e vegetal, contra ação tóxica causada pelo cloreto de mercúrio.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante e citoprotetora do ácido gálico, ácido caféico e pirogalol em modelos procarioto e eucarioto frente a ação tóxica do cloreto de mercúrio.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a atividade antioxidante por DPPH do ácido gálico, ácido caféico e pirogalol;
- Determinar a ação quelante do ácido gálico, ácido caféico e pirogalol;
- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima dos taninos acima citados frente à bactéria e fungo;
- Avaliar a Concentração Bactericida e Fungicida Mínima do ácido gálico, ácido caféico e pirogalol;
- Avaliar o efeito citoprotetor dos taninos acima citados em modelo procarioto e eucarioto unicelular frente a ação tóxica do cloreto de mercúrio;
- Determinar a concentração alelopática das substâncias em modelo eucarioto vegetal;
- Avaliar a atividade citoprotetora do ácido gálico, ácido caféico e pirogalol em modelo vegetal de *Lactuca sativa* frente a ação tóxica do cloreto de mercúrio;

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Metais Tóxicos

O nome metal pesado é dado ao grupo tanto de metais como de metaloides que possuem densidade maior que 4.000 kgm^{-3} , sendo encontrados naturalmente na crosta terrestre (HASHIM, MUKHOPADHYAY, SAHU & SENGUPTA, 2011). Para Tsutiva (1999), esses elementos possuem um número atômico maior que 20, e o termo metal pesado pode também ser utilizado para fazer referência a elementos metais ou ametais que contaminem o meio ambiente, causando toxicidade aos organismos vivos. Dentre eles podemos citar o alumínio, chumbo, cobre, ferro, mercúrio, dentre outros.

As atividades realizadas pelo homem tanto na mineração, indústria e agricultura, têm provocado alterações na biosfera, ao passo que libera rejeitos orgânicos, inorgânicos e metais pesados oriundos em grande parte dos rejeitos industriais (BHARGAVA et al., 2012). Estes metais como possuem alta mobilidade e solubilidade, podem acumular-se na cadeia alimentar e desta forma trazerem impactos relevantes à saúde humana (BORBA et al., 2008).

Os metais são não degradáveis, o que resulta no acúmulo dos mesmos ao longo da cadeia trófica, apresentando toxicidade aos organismos vivos (CHAVES, 2008). Porém a maioria das plantas, por exemplo, tem a capacidade de absorver ou degradar contaminantes (CUNNINGHAM & OW, 1996), os metais de transição, como zinco e ferro, são necessários para que haja o crescimento normal da planta, desta forma apresentando funções no seu metabolismo. Porém, em altas concentrações podem causar genotoxicidade levando à mutações (MACOVEI et al., 2010; RASCIO & NAVARI-IZZO, 2011).

Os metais pesados são encontrados em pequenas concentrações nos solos e nos organismos vivos (VALLE, 2012), e são colocados facilmente nos sistemas aquáticos através de processos geoquímicos e intemperismo (YABE & OLIVEIRA, 1998). Desta forma, a contaminação hídrica não se limita apenas ao consumo direto da água, mas alastra-se nos ecossistemas e nos meios de produção alimentar humana. Um destes exemplos, é a contaminação dos peixes por metilmercúrio, que desta forma contamina outros níveis tróficos (SANTOS et al., 2006).

Vários são os malefícios ocasionados pela intoxicação dos metais na saúde do homem, os mesmo são descritos na literatura, sendo que a gravidade desta contaminação depende de alguns fatores, como o grau em que houve a exposição ao metal, que pode resultar em

prejuízos ao sistema nervoso central, ao fígado, rins, esqueleto, como também ao sistema hematopoiético (SEGURA-MUÑOZ, 2002).

Determinados metais são de grande importância biológica, como o ferro, zinco, selênio, entre outros. Porém se eles estiverem presentes em altas concentrações irão acarretar em danos à saúde, desta forma se tornando um problema tanto de saúde pública quanto ambiental (VALLE, 2012).

Outro problema está associado a aquisição de fertilizantes, que envolve uma alta demanda de água, desta forma há uma apreensão com o último destino deste efluente como também de como ele será aproveitado. Sendo o setor das indústrias constituída na mais diversa e importante fonte de introdução de metais pesados na água. Esta quando não há o tratamento eficaz, ocorre a bioacumulação na cadeia trófica, a falta de oxigênio na água e na vida dos organismo que ali vivem e a contaminação dos lençóis freáticos (JORDÃO, et al. 1998).

Altas concentrações de metais pesados são geralmente encontradas na natureza. Sendo que elas podem tanto ocorrer naturalmente como também por ação do homem, esta última forma é decorrente de descargas tanto de esgotos domésticos quanto industrial (KABATA-PENDIAS, 2001; PAULA, 2006; SEYLER; BOAVENTURA, 2003). Quando o metal encontra-se na forma de cátion ou ligado às proteínas, é considerado mais tóxico, pois nesta forma ele causa alteração nas propriedades celulares. Neste contexto pode-se citar o metal mercúrio, que possui o Hg^{+2} , como forma catiônica (BAIRD, 2002).

3.1.1 Mercúrio

O mercúrio é encontrado em pequenas concentrações, porém encontra-se bem distribuído na crosta terrestre, podendo ser encontrado na forma orgânica ou inorgânica. Nesta última pode estar em três estágios de oxidação, o elementar (Hg^0), o íon mercurioso (Hg_2^{2+}) e o íon mercúrico (Hg^{2+}). Quando está na forma orgânica, temos por exemplo o metilmercúrio e dimetilmercurio (AZEVEDO, 1994; MICARONI; BUENO; JARDIM, 2000).

Mesmo sendo encontrado naturalmente, a presença deste metal no ambiente tem sido intensificada por atividades produzidas pelo homem (NIU et al., 2013), como mineração, queima de combustíveis fósseis, fertilizantes agrícolas, dentre outras, contribuindo para a contaminação do solo por esse metal (RIBEIRO, 2013).

O mercúrio é visto como um dos metais pesados que apresenta maior toxicidade. Porém ele é capaz de sofrer biomagnificação em quase todos os níveis tróficos, sendo o homem bem mais exposto a contaminação dele, por estar no nível mais alto da cadeia alimentar (UNEP, 2002). O mercúrio encontrado dentro das células pode se juntar a aminoácidos e causar por exemplo bloqueio de enzimas e hormônios (LACERDA, 2004). Os rins podem sofrer nefrite devido ao acúmulo deste metal (RIBEIRO, 2013).

Os microrganismos conseguem fazer a transformação do mercúrio inorgânico em orgânico, sendo esta forma de alta toxicidade para os humanos (HSU-KIM, 2013). A quantidade de mercúrio pode ser identificada tanto no solo, como no ar e em amostras biológicas (WHO, 2003). Muitas formas químicas do mercúrio no ambiente são voláteis, desta forma podendo atingir lugares distantes (MALM, 1993).

3.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário dos vegetais, e são caracterizados por apresentarem na sua estrutura química um ou mais grupos fenóis (CABRITA et al., 2008). Estes compostos possuem grande importância para o crescimento e reprodução dos vegetais, além de estarem presente, quando esse vegetal se encontra em situações de estresse, como é o caso de infecções, por exemplo (NACZK, M; SHAHIDI, F, 2004).

De acordo com sua estrutura química, eles possuem anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxilicos. Possuem variadas funções, e dentre este grande grupo de compostos, podemos citar os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos, dentre outros. São largamente encontrados nas frutas cítricas. Possuem atividade anticarcinogênica, como a quercertina e o ácido caféico (PIMENTEL, C.V.M.B; FRANCKI, U.M; GOLLUCKE, A.P.B, 2005).

Ainda de acordo com sua estrutura química estes compostos podem ser divididos em flavanoides e não flavanoides. O primeiro possui 15 carbonos em sua estrutura básica, estrutura química C6-C3-C6, onde os C6 são anéis aromáticos. O segundo possui estrutura C6-C1, C6-C3, C6-C2-C6, como o ácido gálico, ácido caféico e trans e cis-resveratrol-glicosídeo, respectivamente (PEREIRA, 2015; VOLP et al., 2008).

Os compostos fenólicos são produtos naturais, produzidos pelos vegetais, exibindo funções importantes como proteção contra herbívoros e patógenos (DUTRA, 2009). Possuem

elevada importância para a saúde humana por agirem como antioxidantes. Também possuem atividade microbiológica, como os taninos e flavanoides (BRAVO et al., 2007; KING, A; YOUNG, G, 1999; OLIVEIRA et al., 2013).

Os compostos fenólicos podem ser moléculas mais simples ou possuírem elevado grau de polimerização. Neste último caso eles podem se encontrar livre nas plantas ou podem se associar a moléculas como proteínas e açúcares. Nesta classe encontra-se em destaque, dentre outros, os taninos (ANGELO; JORGE, 2007). Estes compostos, são substâncias que possuem uma origem natural, e que sua formação não ocorre no homem. Possuem diversas características que atribui aos mesmos efeitos anti-inflamatório, antiviral, antimicrobiano, analgésico, dentre outros (DEGASPARI et al., 2004). Muitos destes compostos fenólicos, como os taninos possuem atividade antioxidante (REIS et al., 2011).

3.2.1 Taninos

Os taninos são produtos do metabolismo secundário dos vegetais, originados do metabolismo do carbono (NOGUEIRA et al., 2008) são polifenóis, que apresentam alto peso molecular e podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, em hidrolisáveis e condensados. Esses dois grupos, embora possuam diferenças entre si, contém em comum grupos poli-hidroxifenóis, que permite desta maneira a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas. No primeiro grupo existe os taninos derivados do ácido gálico e do ácido elágico. Os condensados tem grande importância nos alimentos e existem em proporções maiores, sua estrutura química é parecida com a dos flavanoides. Quando presentes em altas concentrações nos alimentos os taninos conferem aos mesmos funções adstringentes (DEGASPARI et al., 2004; DESHPANDE; CHERYAN; SALUNKHE, 1986).

Os taninos podem ser encontrados em várias partes das plantas, como em cascas, frutos, dentre outros (PAES et al., 2010). Por causar precipitação de glicoproteínas salivares, esses compostos têm função adstringente (MONTEIRO et al., 2006), por possuírem atividade antimicrobiana, eles oferecem proteção a planta contra o ataque patogênico de diversos microrganismos (VITAL et al., 2001; COLLI et al., 2007). Diante de suas atribuições os taninos caracterizam-se como compostos fenólicos que apresentam elevado interesse tanto econômico quanto do ponto de vista ambiental (MONTEIRO et al. 2006). Possuem utilização na indústria de petróleo e tratamento de água (PAES et al., 2006; TANAC, S.A., 2013, SILVA, 1999; PELEGRINO, 2011; KLUMB & FARIA, 2013).

Os taninos de ação medicinal, agem sobre diversos microrganismos, desta forma dificultando ou até mesmo bloqueando seu crescimento (LOGUERCIO et al., 2005; MICHELIN et al., 2005; ANDRADE JR et al., 2006; PEREIRA et al., 2009; BEZERRA et al., 2011).

Os taninos hidrolisados são encontrados nas dicotiledôneas lenhosas e em herbáceas, caracterizando-se por possuir um núcleo estereificado com ácidos gálicos ou elágicos, eles são formados pela via metabólica do ácido chiquímico. Já os ditos condensados estão presentes especialmente nas angio e gimnospermas (BRUNETON, 1991). Os taninos hidrolisáveis possuem baixa reatividade com formaldeído e um caráter nucleofílico diminuído (PIZZI; MITTAL, 2003).

Como os taninos estão inclusos dentro dos compostos fenólicos, eles possuem uma intensa reatividade química, desta forma, formando ligações de hidrogênio, intramoleculares e intermoleculares. Também devido essa reatividade química são fáceis de oxidarem, tanto pela ação das enzimas encontradas em plantas como também pela ação de metais (MELLO; SANTOS, 2001, MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos hidrolisáveis tem seu esqueletos (C6 e C1)_n, exibem na sua constituição monômeros de ácido gálico ou ácido elágico, já os taninos condensados protocianidinas, derivados de esqueletos (C6-C3-C6)_n, são formados pela polimerização de unidades de catequina (CARVALHO, 2016).

Eles também possuem a capacidade de formarem complexos insolúveis quando presentes com água e alcaloides, proteínas, dentre outras. A complexação existente entre proteínas e taninos é a base de suas características como controlador de fungos, bactérias e insetos (CASTEJON, 2011). Dentre os taninos hidrolisáveis podemos citar o ácido gálico, ácido caféico e pirogalol.

3.2.1.1 Ácido Caféico

Este composto possui fórmula química C₉H₈O₄ (Figura 1), apresentando variadas funções e atividades farmacológicas importantes, como atividade antioxidante, atividade anti-hipertensiva, dentre outras (PRASAD et al., 2010). É um dos metabólitos hidroxicinamatos, mais encontrado nos tecidos vegetais. Presente também em alguns alimentos, como também em café, cidra, entre outros (CLIFFORD, 2000).

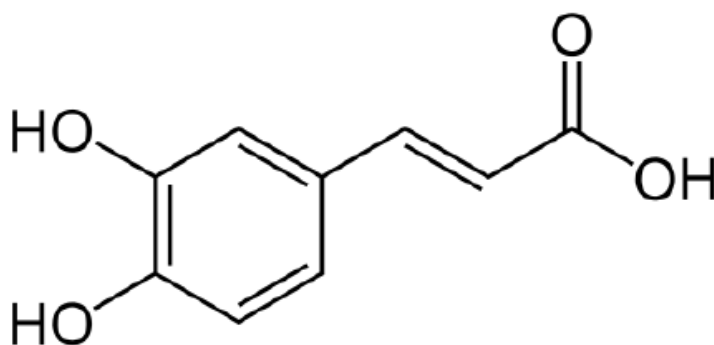
Este composto fenólico também se encontra em alguns medicamentos de uso tradicional, como é o caso daqueles à base de propólis. Também podem ter ação como inibidor carcinogênico, antioxidante, antibacteriano, podendo também prevenir algumas doenças cardiovasculares (LUSTOSA et al., 2008; HUANG et al., 1992; GREENWALD et al., 2008; SANCHEZ-MORENO et al., 2000; TRADIGAN & ADVERTISING, 2014)

Outras de suas conhecidas funções é que tanto ele como seus derivados, possui atuação contra o câncer de boca, de cólon, tem função biológica na proteção contra herbívoros e patógenos, conseguem inibir a ciclo-oxigenase II, atuam na proteção da fosfatidilcolina da peroxidação causada pela radiação ultra violeta, causam citotoxicidade em tumores, dentre outras (MICHALUART et al., 1999; WEYANT et al., 2000; CESCHEL et al., 2002; CHIAO et al., 1995; RUSSO et al., 2002; SAIJA et al., 1999; KAMPA et al., 2004; MOLGAAND, P; RAVN, H, 1988).

Na sua estrutura química possui duas hidroxilas no anel do ácido cinâmico e pode se apresentar como ésteres e amidas. Possuem elevada lipofilicidade com células eucarióticas (NARDINI et al., 1998; FU et al., 2010). Possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante (JUMAN et al., 2012; TOYODA et al., 2009; Yang et al., 2011), e também capacidade de impedir filamentos de *Candida*, desta forma apresentando uma atividade antifúngica (BREGER et al., 2007).

O ácido caféico além das atividades acima citadas e de outras que ele possui, apresenta um papel bastante relevante no que se refere à química do solo, desta forma atuando com um transportador de metais iônicos. Pode também atuar como quelante de metais (CONRAD; LAPOUGE, 2004; HYNES, O'COINCEANAINN, 2004).

FIGURA 1: Estrutura química do Ácido Caféico



FONTE: SHI; YU; KAKUDA, 2003

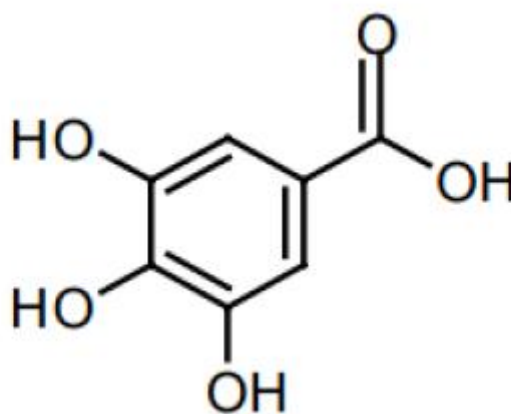
3.2.1.2 Ácido Gálico

O ácido gálico pode ser extraído das folhas de chás, casca de carvalho e de outras plantas. Ele é o ácido 3,4,5-trihidroxibenzeno. Possui atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, dentre outras (ALKAN et al., 2011; GIFTSON et al., 2010). Pode também alterar as propriedades mecânicas de materiais que tenham como base polímeros naturais (SUN et al., 2014).

Este ácido é vastamente encontrado nos vegetais lignificados. São exibidos na sua forma livre, mas também podem se apresentar como monômero base para os taninos hidrolisáveis. O ácido gálico é o fenólico que possui alta capacidade de captar radicais livres quando o mesmo é comparado aos outros ácidos que compõem os compostos fenólicos. Os ésteres que derivam do ácido gálico são ditos degalatos (ESCARPA & GONZALEZ, 2001; KOSINSKA & PEGG, 2005).

O ácido gálico (Figura 2) é um ácido orgânico, composto por uma estrutura fenólica trihidroxilada, presente nos taninos hidrolisáveis, podendo ser encontrado de forma livre, o qual é chamado de galoil ou de forma ligada, sendo chamado de elagitaninos. Uma forma de obtenção do ácido é utilizando a enzima tanase. Esta, é uma enzima produzida por alguns microrganismos, como bactéria, fungos, leveduras, quando na presença de ácido tânico (GRUNDHOFER et al, 2001; CHÁVES-GONZÁLES et al., 2012; MACEDO et al., 2005).

FIGURA 2: Estrura química do Ácido Gálico



FONTE: GRUNDHOFER et al., 2001

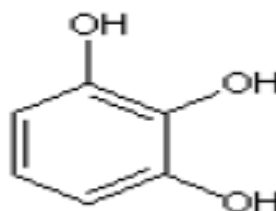
Outras aplicações que podem ser atribuídas ao ácido gálico é que ele pode agir no tratamento de diabetes e albuminúria, possui propriedades antivirais e antifúngicas, antioxidante, adstringente, efeito antitumoral, causando desta forma um citotoxicidade em

algumas células que são acometidas pelo câncer. Na indústria alimentícia ele previne à rancidez oxidativa em alimentos que contém lipídios (HSIEH et al., 2007; KIM, 2007; UOZAKI et al., 2007; KUBOLA & SIRIAMORPUN, 2008; HURRELL; REDDY; COOK, 1999; DE MEJA et al., 2006; BRASIL, 1999).

3.2.1.3 Pirogalol

O pirogalol (Figura 3) é um fenol simples, de origem sintética, que possui fórmula molecular $C_6H_6O_3$, é um redutor de sais de mercúrio, por exemplo (HERGERT, 1989; GUEDES, 2016; MAZZI, 2009). Seu uso em cosméticos não pode ultrapassar 5% e o pH tem que ser no máximo até 5 (BRASIL, 2013).

FIGURA 3: Estrutura química do Pirogalol



FONTE: SANDINI et al., 2011

3.3 Citoproteção

Devido ao aumento da contaminação de solos e águas por metais pesados, vários trabalhos feitos com produtos naturais, buscam alternativas na redução desta toxicidade. Abaixo são citados alguns estudos em que os autores procuram avaliar atividade citoprotetora dos seus produtos frente a contaminação de metais pesados.

Sobral-Souza et al. (2014) avaliou o efeito citoprotetor em modelo bacteriano e eucarioto vegetal do extrato etanólico das folhas de *Eugenia jambolana* contra ação tóxica do cloreto de mercúrio. Em seu estudo os autores encontraram resultados significativos, onde seu extrato permitiu uma citoproteção, possibilitando um melhor crescimento das radículas e caulículos de *Lactuca sativa*.

Os extratos das folhas de *Eugenia uniflora* também apresentou uma citoproteção as sementes de alface, permitindo melhor crescimento das radículas e caulículos. Além disso, o

extrato também apresentou um resultado significativo em modelo bacteriano, desta forma preservando os microrganismo quando na presença de cloreto de mercúrio (CUNHA et al., 2016).

Figueiredo et al. (2016) avaliou o potencial citoprotetor do extrato de *Lygodium venustum* em *Candida krusei* frente a ação tóxica do $HgCl_2$, porém o extrato não apresentou citoproteção ao modelo eucarioto testado. Os extratos de *Psidium guajava* var *pyrifera* e *P. guajava* var *pomífera* foram utilizados para avaliar o efeito citoprotetor em bactéria e fungo contra ação tóxica do sulfato de ferro II, porém o produto natural não conferiu proteção, desta forma não causando alteração no perfil de sobrevivência dos modelos (LEITE et al., 2014).

Sobral-Souza et al. (2014b) utilizou o extrato de *Eugenia uniflora* e *P. sobroleanum* para avaliar se os mesmos possuíam ação citoprotetora para *Escherichia coli* e *C. albicans* frente a ação tóxica do ferro. Porém o extrato não conferiu uma citoproteção aos modelos testados. Mesmo estudo foi realizado por Leite et al. (2016) com os extratos de *E. jambolona* e *P. myrsintes*, onde o mesmo resultado anterior foi encontrado.

Os extratos de *Lygodium venustum* demonstrou ação citoprotetora a bactéria *E.coli*, reduzindo significativamente a toxicidade do cloreto de mercúrio (FIGUEREDO et al., 2016b). Leite et al. (2017) avaliou o efeito redutor de toxicidade do $HgCl_2$ do extrato de *P. brownianum* em modelo procarioto, obtendo como resultado que o produto conseguiu proteger a *E. coli*.

O extrato de *Stryphnodendron rotundifolium* tem efeito citoprotetor em modelo vegetal, permitindo que haja um maior crescimento das radículas e caulículos do alafce, quando o mesmo é submetido a tratamentos contendo o extrato e os metais pesados $HgCl_2$ e o cloreto de alumínio $HgAl_3$, do que quando submetidas ao tratamento apenas com metal pesado. Desta forma o produto natural consegue reduzir a toxicidade deste metal nas sementes de *L. sativa* (COUTINHO et al., 2017).

Muitos dos extratos acima citados, possuem em sua constituição taninos ou outros compostos fenólicos, e o efeito citoprotetor que eles apresentam, diminuindo a toxicidade do cloreto de mercúrio, do cloreto de alumínio ou do ferro, é associado a atividade antioxidante que os mesmo possuem.

3.4 Atividade Antioxidante

Antioxidantes, são aquelas substâncias, que mesmo estando presentes em concentrações pequenas quando comparadas ao substrato, ainda assim conseguem retardar ou

até mesmo inibir a oxidação do substrato. Esses antioxidantes formam radicais não reativos, com isso forma produtos que tem estabilidade ou que ainda podem ser usados por outro antioxidante, esta estabilidade é devido à ressonância do anel aromático, que está presente nas estruturas que possuem esta atividade (ATOUI, A.K. et al, 2005; VAIKO, M et al., 2004; CHUN et al., 2005).

Existem duas classes de antioxidantes, os que tem e os que não tem atividade enzimática. Os que possuem essa atividade, são os compostos que possibilitam o bloqueio de iniciação da oxidação, neste caso, removendo as espécies reativas de oxigênio. Os que não possuem essa atividade, são moléculas que interagem com as espécies reativas de oxigênio, porém são consumidas no processo (MOREIRA, A.V.B; MANCINI-FILH, J, 2004)

Os compostos fenólicos, como os taninos, possuem atividade antioxidante. Desta forma, exibindo condições de neutralizar ou de sequestrar radicais livres, e também podem quelar os metais de transição (SOARES, S.E., 2002). Desta forma, tem-se grande interesse em antioxidantes naturais advindos de plantas, e que podem por exemplo, prevenir doenças (PATEL, 2014).

Através do modo como os antioxidantes agem, eles são classificados em dois grupo, primários, que cessa a cadeia da reação pela doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, e/ou também reagindo com estes radicais, produzindo o complexo lipídio-antioxidante, e desta forma podendo reagir com outro radical que esteja livre. Já os secundários dificultam a etapa de iniciação da autoxidação, por vários mecanismos, por exemplo, sequestro de oxigênio, complexação de metais, entre outros (ADEGOKE, G.O,1998).

Os compostos fenólicos são constituintes de elevado interesse, pois apresentam características benéficas à saúde, desta forma agindo como antioxidantes naturais (BRAVO et al., 2007).

MATERIAIS E METÓDOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias

4.1.1 Taninos

Os compostos isolados, ácido gálico, ácido caféico e pirogalol, fabricados pela Sigma® foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais (LFPN) da Universidade Regional do Cariri-URCA.

4.1.2. Cloreto de mercúrio

O cloreto de mercúrio (HgCl_2) fabricado pela Vetec Química Fina LTDA foi fornecido gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri-URCA.

4.2 Atividade Antioxidante (DPPH)

O potencial antioxidante de cada tanino utilizado no trabalho foi avaliado usando o método fotolorimétrico *in vitro* do indutor radicais livres de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) descrito por Mensor et al. (2001) e Nascimento et al. (2017). Neste ensaio, foram adicionados 300 μL de cada amostra de tanino (250 a 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) em 1500 μL de DPPH (0,3 mM) e 1200 μL de etanol P.A. Todas as leituras foram realizadas em triplicata, e com os dados médios obtidos, calculou-se a diferença de absorvância entre as amostras e o controle negativo, e a porcentagem de atividades antioxidantes (AA) obtidas por regressão linear para cada fase, obtendo assim a concentração da amostra que promove a redução para metade da redução de 50% da concentração inicial de DPPH, respectivamente, conforme definido Concentração Efetiva (EC_{50}).

4.3 Atividade Quelante de Ferro

A determinação de atividade quelante de Fe^{2+} é determinada pela capacidade de quelar $\text{Fe}(\text{II})$. 225 μL de solução preparada recentemente de 500 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ é adicionada a uma mistura de reação contendo 38 μL de solução água (branco), ácido ascórbico (controle) e

o tanino em diferentes concentrações. A mistura de reação foi incubada durante 15 min, antes da adição de 20 µL de solução de 0, 25% de 1,10-fenontrolina (c/v). A absorbância foi subsequentemente medida a 510 nm num espectrofotômetro.

Para determinação de atividade quelante Fe^{3+} , seguiu os mesmos procedimentos acima citados, só que a solução foi de 500 µM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (PUNTEL et al., 2005).

4.4 Teste de citoproteção em modelo procarioto e eucarioto

4.4.1 Meios de Cultura e Inoculação dos Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram a bactéria *Escherichia coli* 06 (EC 06) e o fungo *Candida albicans* 40006 (CA INCQS 40006), fornecido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB e FIOCRUZ através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), respectivamente.

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada pelo fabricante, Brain Heart Infusion - BHI e Sabouraud Dextrose Agar - SDA (Sambrook et al., 1989, modificado). Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente. A bactéria foi inoculada em HIA (Difco Laboratories Ltda) e o fungo em SDA. Ambos foram incubados a 35 °C, aproximadamente, durante 24 horas.

4.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima foi determinada pelo método de microdiluição (JAVADPOUR et al., 1996). Para preparação da solução teste foi pesado 10 mg dos taninos para o teste com bactéria e 15 mg para o teste com fungo, sendo em seguida diluída em água destilada estéril até atingir a concentração de 1024 µg/mL e 16384 µg/mL, para bactéria e fungo, respectivamente.

Um arrasto bacteriano foi retirado das placas de Petri previamente cultivadas e diluídos em tubos de ensaio contendo cada um deles 3 mL de solução salina à 0,9%. A turvação de cada tubo foi comparada com a turvação da escala 0,5 de McFarland (1×10^6 UFC/mL), mesmo procedimento foi realizado com o fungo. Este procedimento foi feito em triplicata. A CIM é definida como a menor concentração onde não é observado crescimento microbiano. Para realizá-la foi utilizada uma placa de microdiluição estéril com 96 poços, e preparado um meio de distribuição contendo 1,5 mL da solução, composta por 1350 µL de

meio e 150 μL de inóculo, que em seguida foi colocado em tubos eppendorf®. A placa de microdiluição foi preenchida no sentido numérico, adicionando 100 μL da solução de distribuição em cada cavidade, posteriormente foi realizada a microdiluição seriada com 100 μL da solução teste, com concentrações finais variando de 512 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (para bactérias) 8 192 a 8 $\mu\text{g/mL}$ (para fungo) até a penúltima cavidade, pois a última foi destinada ao controle do crescimento microbiano. Em seguida as placas foram incubadas durante 24 h a 35° C. Para revelação das placas com bactérias, foi adicionado 20 μL de resazurina, e após 1 hora em temperatura ambiente foi realizada a leitura. A resazurina apresenta colorações distintas nas suas formas oxidada e reduzida. A forma adicionada no poço foi a oxidada (azul). Nos poços em que o crescimento bacteriano superou uma densidade celular acima de 10^6 UFC/mL, a resazurina foi reduzida, tornando-se rosa (GALLUCCI et al., 2009).

Para leitura do teste com fungo, foi feita a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Em cada poço da placa foi adicionada uma haste estéril, que após homogeneizar o meio contido na cavidade, foi subcultivada em placa de Petri contendo ASD, através da transferência de uma pequena alíquota da solução teste (meio + inóculo + substância). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e verificadas quanto ao crescimento ou não-crescimento de colônias de *Candida*. A CFM foi definida como a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento visível da colônia fúngica (ALVES et al., 2013).

4.4.3 Avaliação do potencial efeito citoprotetor em bactérias e fungos contra cloreto de mercúrio

Para a avaliação do efeito protetor dos taninos sobre o HgCl_2 , os *eppendorfs* contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e suspensões a 10^6 UFC / ml de *Escherichia coli* 06 (EC 06) e *Candida albicans* (CA 40006) foram preparados em BHI a 10% e CSD, respectivamente. A solução foi distribuída nos poços da placa de microdiluição. Imediatamente depois, foram adicionados 100 μL de cloreto de mercúrio ao primeiro poço, seguidos de microdiluições sucessivas à penúltima cavidade. A concentração de metal variou de 5 mM a 0,00488 mM. As placas de microdiluição foram incubadas durante 24h a 37 ° C numa incubadora. Em seguida, as concentrações bactericidas mínimas (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas como a menor concentração capaz de matar toda a população de microrganismos. Foram utilizadas placas de Petri com Agar Infusão de Coração (HIA) e (CSD) para transferir as soluções incubadas nas placas de

microdiluição. Uma alíquota de cada poço da placa de microdiluição foi sub-cultivada em placas de HIA. Após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C, a leitura foi feita, com o objetivo de observar o crescimento das colônias. As leituras de CBM e CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles microbianos, considerando o CBM e o CFM a menor concentração do tanino que inibiu o crescimento visível da subcultura (SHADOMY et al., 1985).

4.5 Testes de alelopatia dos taninos em sementes de *Lactuca sativa* L.

Foram realizados testes piloto para determinar o efeito alelopático das amostras em estudo. Para realizar o teste, foram utilizadas placas de Petri limpas, secas e estéreis. Elas estavam alinhadas com dois discos de papel filtro, onde foram dispostas 20 (vinte) sementes de *Lactuca sativa*. Foram adicionados 3 ml das soluções de amostra a cada placa a concentrações de 512 µg / mL, 256 µg / mL, 128 µg / mL, 64 µg / mL e 32 µg / mL e as placas foram devidamente identificadas e preparadas em triplicatas. Após a adição da solução, as placas permaneceram embaladas em película plástica (SOBRAL-SOUZA et al., 2014). Os experimentos foram conduzidos em uma câmara de germinação a uma temperatura de aproximadamente 25 °C \pm 2 °C e fotoperíodo natural por sete dias. Os tratamentos foram organizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três repetições de 20 sementes por placa. O parâmetro analisado no final dos sete dias foi a contagem do número de sementes germinadas. As sementes cujas raízes atingiram 1 mm de comprimento ou mais foram consideradas germinadas. Os testes foram feitos em triplicatas e expressos como significativos.

4.6 Avaliação do efeito citoprotetor dos taninos em um modelo de planta (*L. sativa*) contra cloreto de mercúrio

Para realizar o teste, utilizaram-se placas de Petri preparadas conforme relatado anteriormente. Quanto às concentrações, utilizou-se uma concentração sub-alelopática dos taninos (32 µg / mL) e do cloreto de mercúrio (HgCl₂), variando entre 1,25 e 0,01 mM. A placa de controle foi umedecida com 3 mL de água destilada estéril. Os experimentos foram conduzidos em uma câmara de germinação a uma temperatura de aproximadamente 25 °C \pm 2 °C e fotoperíodo natural por sete dias. Os tratamentos foram organizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado (CRD), com três repetições de 20 sementes por placa. Os parâmetros analisados no final dos sete dias foram: contagem de

sementes germinadas, índice de taxa de germinação (GRI), biometria radicular, ocorrência de necrose radicular e anormalidades de plântulas, seguindo o Manual de Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes cujas raízes atingiram 1 mm de comprimento ou mais foram consideradas germinadas. Os testes foram feitos em triplicado e expressos como significativos. Após esse período houve a medição dos caulículos e radículas. Foram retiradas amostras de caulículos e radículas na maior e menor concentração do metal, na associação delas com os taninos, só dos taninos e do controle com água destilada e foram pesadas, em seguida foram levadas à estufa 60 °C por 24 h e após este intervalo foram novamente pesadas para obtenção do volume de massa seca.

4.7 Análise Estatística

Os dados dos microrganismos são apresentados como a média geométrica \pm SEM de três repetições. A análise estatística do teste utilizou uma ANOVA de dois sentidos seguida de teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,0001$. Todos os outros resultados foram apresentados utilizando a média aritmética \pm SEM de três repetições com ANOVA de dois sentidos, seguido de teste pós-hoc de Tukey com $p < 0,0001$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Resultado 1

Identificação do mecanismo de ação do ácido gálico na redução da toxicidade por cloreto de mercúrio usando espectroscopia no infravermelho e ensaios com antioxidantes

Autores: **Janaina E. Rocha**, Tássia T. A. M. Guedes, Camila F. Bezerra, Maria do S. Costa, Fabia F. Campina, Thiago S. de Freitas, Amanda K. Souza, Celestina E. Sobral Souza, Yedda M. Lobo, Francisco N. Pereira-Junior, João H. da Silva, Irwin R. A. Menezes, Raimundo N. P. Teixeira, Aracélio V. Colares, Henrique D. M. Coutinho

Manuscrito submetido para revista **International Biodeterioration & Biodegradation**

Qualis em Biodiversidade : B1 Fator de Impacto : 3,5

Situação: Aceito para publicação

Identification of the Gallic acid mechanism of action on Mercury chloride toxicity reduction using infrared spectroscopy and antioxidant assays

Janaina E. Rocha^a, Tássia T. A. M. Guedes^a, Camila F. Bezerra^a, Maria do S. Costa^a, Fabia F. Campina^a, Thiago S. de Freitas^a, Amanda K. Souza^a, Celestina E. Sobral Souza^a, Yedda M. Lobo^a, Francisco N. Pereira-Junior^b, João H. da Silva^b, Irwin R. A. Menezes^c, Raimundo N. P. Teixeira^d, Aracélio V. Colares^e, Henrique D. M. Coutinho^{a*}

^aMicrobiology and Molecular Biology Laboratory, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil;

^bFederal University of Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil;

^cPharmacology and Molecular Chemistry Laboratory, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil;

^dNatural Products Research Laboratory, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil;

^eUniversity Center UNILEAO, Juazeiro do Norte, CE, Brazil;

*Corresponding author: Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Biological Chemistry Department, Microbiology and Molecular Biology Laboratory, Regional University of Cariri, Av. Cel. Antônio Luiz, 1161. Pimenta, 63105-000 Crato-CE, Brazil. Tel.: (+55) 88-3102-1212, Fax: (+55) 88-3102-1212.

E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com

Abstract

Human activities have enhanced environmental contamination by heavy metals such as mercury. One of the possible approaches to reducing mercury toxicity is chelation, with several plant compounds demonstrating this effect, such as gallic acid. The objective of this study was to evaluate the antioxidant, metal chelating and cytoprotective activity of gallic acid against the action of Mercury Chloride (HgCl₂). Iron II and III chelation as well as antioxidant activity assays were performed using the DPPH (1,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. The interaction between the metal and the phenolic compound was identified by infrared spectroscopy. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microdilution. From these results, and using a sub-inhibitory concentration (64 µg.mL⁻¹ for bacterial and fungal assay respectively) of the phenolic compound, the Minimum Bactericidal (MBC) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) were evaluated. Allelopathy and cytoprotection assays were performed using eukaryotic and prokaryotic models, with a

protection of the fungi being observed. When using a plant model with a sub-allelopathic concentration ($32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the results demonstrated the cytoprotective effect of gallic acid against HgCl_2 , increasing the extension of caulicles and radicles as well as their dry mass. This protection may be associated with the chelating effect of gallic acid. These results demonstrate that natural products such as gallic acid may be used for toxic metal chelation allowing plant development in polluted environments thus retrieving land usage for crops or forestry initiatives.

Key-words: tannins; remediation; mercury chloride; gallic acid; infrared spectroscopy; phytotoxicity.

1. Introduction

Heavy metals are found in nature at low concentrations (Andrade et al., 2011), however, human action has been causing increased concentrations of these in the environment (Figueredo et al., 2016a). Heavy metal levels in the environment are of concern because they pose risks to both human health, as well as to animals and plants (Figueredo et al., 2016a). Among these metals mercury (Hg), which occurs for example in the form of inorganic compounds (Boening, 2000), can be cited. As an approach to reverse environmental contamination, remediation technologies are being used. These techniques are classified as those which include i) removal of the contaminant, ii) separation, iii) destruction and iv) protection against mercury toxicity, without its reduction or removal from the environment (Oyetibo et al., 2014, 2017).

Many plants have in their composition elements, such as phenolic compounds, that have antioxidant activity that protects plants against toxic metal contamination (Figueredo et al., 2016b). Among the phenolic compounds, gallic acid which is a tannin found in several plants with different bioactivities, can be cited (Soong and Barlow, 2006).

Infrared (IR) spectroscopy has become an essential technique for the structural analysis and identification of organic substances (Lopes and Fásccio, 2004). This technique is based on the vibrations from a molecule's atoms under incident IR radiation. The main objective of this analysis is to determine the chemical composition of the sample's functional groups, since different functional groups absorb the IR radiation at characteristic frequencies, thus being an important tool for compound identification or to evaluate the interaction between compounds and metals (Settle, 1997; Johari et al., 2016).

Many studies seek to clarify the interaction of phenolic compounds and heavy metals in the environment. Therefore, the objective of this study was to evaluate the gallic acid effect

when reducing mercury chloride toxicity in prokaryotic and eukaryotic models due to its antioxidant and chelating activity as well as to identify the interaction of the gallic acid functional groups with mercury through the infrared technique.

2. Materials and methods

2.1. Substances

Gallic acid was purchased from Sigma® (St. Louis, USA). Mercury chloride was purchased from Vetec Química Fina LTDA.

2.2. Microorganisms

The microorganisms used were the bacteria *Escherichia coli* 06 (EC 06) and the yeast *Candida albicans* 40006 (CA INCQS 40006), provided by the Mycology Laboratory from the Federal University of Paraíba - UFPB and FIOCRUZ through the National Institute of Quality Control in Health (INCQS), respectively.

2.3. Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR)

Initially, the gallic acid solution was prepared by weighing 10 mg and diluting it in 1 mL of Dimethyl sulfoxide (DMSO) to give a concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. From this solution, a volume of 512 μL was diluted in 4488 μL DMSO to obtain a final concentration of 1024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A 10 mM solution of HgCl_2 was also prepared by weighing 2.35 mg of HgCl_2 and diluting it in 1 mL DMSO. To obtain a final concentration of 0.05 mM mercury chloride, a 25 μL aliquot of the 10 mM HgCl_2 solution was withdrawn and diluted in a test tube containing 1.25 mL of the tannin solution (1024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 3.275 mL of DMSO, resulting in a final solution of 5 mL. Meanwhile, to obtain a final concentration of 1.25mM mercury chloride, a 625 μL aliquot of the 10 mM HgCl_2 solution was withdrawn and diluted into a test tube containing 1.25 ml of the tannin solution (1024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 3.125 mL DMSO, resulting in a final solution of 5 mL. The samples were then subjected to infrared radiation using a Bruker Vertex 70 spectrometer combined with an attenuated total reflectance (ATR) accessory made of Zinc Selenide (ZnSe). The spectral region analyzed ranged from 200 to 4000 cm^{-1} using a resolution of 1 cm^{-1} , as illustrated in Figures 1 and 3. All spectra were processed using the OriginPro 8.5 Software.

2.4 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the gallic acid was evaluated by a microdilution assay according to Coutinho et al. (2008).

2.5 Cytoprotective potential against mercury chloride toxicity evaluation in bacteria and fungi

For the evaluation of the gallic acid protective effect against mercury chloride, Eppendorfs containing sub-inhibitory concentrations of the samples and suspensions at 10^5 CFU/ml of *Escherichia coli* 06 (EC 06) and *Candida albicans* (CA 40006) were prepared in 10% Brain Heart Infusion (BHI) medium. The assays were performed by microdilution according to Leite et al (2017). The metal concentration ranged from: 5 mM to 0.00244 mM of mercury. The microdilution plates were incubated for 48 h at 37 °C in an incubator. Then, the minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicide concentration (MFC) were determined. Petri dishes with Heart Infusion Agar (HIA) were used to transfer the incubated solutions in the microdilution plates. An aliquot of each well of the microdilution plate was sub-cultured onto HIA plates. After 24 hours of incubation at 35 ± 2 °C, the MBC and MFC readings were performed based on the growth of the microbial controls, considering the MBC and MFC as the lowest concentration of the product that visibly inhibited subculture growth (Shadomy et al., 1985).

2.6 Gallic acid phytotoxicity test on *Lactuca sativa* L. seeds.

Pilot tests were carried out to determine the phytotoxicity effect of the samples under study using the method described by Sobral-Souza et al. (2014) and Coutinho et al., (2017). The assays were performed in triplicates and expressed as a mean.

2.7 Evaluation of the gallic acid cytoprotective effect against mercury chloride in a plant model (*L. sativa*)

To conduct the test, Petri dishes prepared as previously reported were used. A sub-phytotoxicity concentration of the extract and fractions (32 µg/mL) as well as of Mercury Chloride (HgCl₂), ranging from 1.25mM to 0.01mM, according Coutinho et al. (2017) were used. The parameters analyzed at the end of the seven days were: germinated seed count, germination rate index (GRI), root and radicular biometry, occurrence of root necrosis and seedling abnormalities, following the Rules Manual for Seed Analysis (Brasil, 2009). The tests were performed in triplicates and expressed as a mean.

2.8 DPPH antioxidant assay

The antioxidant potential of each phase's methanolic fraction was evaluated using the *in vitro* photolorimetric DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) free radical method as described by Mensor et al. (2001) and Nascimento et al. (2017). In this assay, 300 µL of each

sample's gallic acid methanolic fraction (250 to 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were added to 1500 μL of DPPH (0.3 mM) and 1200 μL of ethanol P.A. All readings were performed in triplicates, and the average data was obtained, with the absorbance difference between the samples and the negative control being calculated, while the percentage antioxidant activities (AA) were obtained by linear regression for each phase, thereby obtaining the sample concentration that promotes the reduction of half the initial DPPH concentration as defined by the 50% Effective Concentration (EC_{50}).

2.9 Fe^{2+} and Fe^{3+} chelating effect

The ability of gallic acid to chelate Fe (II) and its capacity to chelate Fe(III) were determined according to the method by Puntel et al. (2005).

2.10 Statistical Analyses

Data from microorganisms are presented as the geometric mean \pm SEM of three repetitions. The statistical analysis of the test used a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test with $p < 0.05$. All other results were presented using an arithmetic mean \pm SEM of three repetitions with a two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test with $p < 0.0001$.

3. Results and discussion

3.1 Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FTIR)

For the tests, two regions were used in the Infrared spectrum, one located in the 2000 to 4000 cm^{-1} range and another in the 2000 to 200 cm^{-1} range. Figure 1 shows the infrared spectra of pure gallic acid and the complexes formed with the Hg^{2+} ion at the concentrations of 0.05 mM and 1.25 mM, respectively. A peak at 3494 cm^{-1} relative to the phenolic $\nu(\text{OH})$ and a broad band at 3267 cm^{-1} relative to the carboxyl $\nu(\text{OH})$ are observed in the spectrum for gallic acid. In the spectrum that presents the complex formed by gallic acid and the Hg^{2+} ion two broad bands are observed at 3391 and 3405 cm^{-1} for the Hg^{2+} concentrations of 0.05 and 1.25 mM respectively. According to Terkhi et al. (2008), there are two coordination possibilities for the Hg^{2+} ion and gallic acid complex. These two possibilities occur through the phenolic hydroxyl and the carboxyl groups. These two coordination possibilities were described by Deguchi (2014) according to Figure 2.

Verza (2006), when studying the total tannin content of a substance through infrared spectroscopy, showed that gallic acid had the following characteristic bands: a band near 3200 cm^{-1} due to the O-H axial deformation and 3100 cm^{-1} due to the aromatic C-H axial

deformation; the appearance of a band at 1700 cm^{-1} represented the C=O axial deformation; the C=C axial deformation in aromatics appeared around 1600 and 1500 cm^{-1} while the band at 1350 cm^{-1} indicated the O-H deformation; 1250 cm^{-1} the C-O axial deformation and 650 cm^{-1} the C-H axial deformation in aromatics.

In the region between 2000 and 200 cm^{-1} , shown in Figure 2, the band at 1705 cm^{-1} , referring to the $\nu(\text{C}=\text{O})$, shown in the pure gallic acid spectrum stands out. With the formation of the Hg^{2+} ion complex, a decrease in the intensity of this band is observed, thus evidencing a possible coordination of the metal ion to the gallic acid carboxyl group at the concentrations studied. The decrease in peak intensity at 1241 cm^{-1} relative to the $\delta(\text{OH})$ in the pure gallic acid spectrum is also observed when compared to the Hg^{2+} complexes spectra. This decrease in intensity at this peak may show the coordination of the Hg^{2+} ion to the phenolic group, thus hindering its possible angular deformation. In complexes with transition metals, the metal ions can accept both σ electrons from the ligand as well as π electrons from the aromatic ring when filling the d orbitals available for coordination. On the other hand, no differences were observed between the peaks in the regions between 1200 and 720 cm^{-1} for the C-H bonds angular deformations in the aromatic ring.

Deguchi (2014) in a study on the gallic acid and Zn (II) metal interaction evaluation by potentiometric titration showed the complexation between these two elements, indicating that this metal has a preference for bonding to the gallic acid carbonyl group.

Carboxylic acid dimers have as their main feature a broad and intense axial deformation absorption of the O-H bond in the region between 3300 - 2500 cm^{-1} , with axial stretching of the carbonyl group band in saturated aliphatic carboxylic acids around 1760 cm^{-1} (Solomons et al., 2009).

Absorption peak displacement occurs in both gallic acid and caffeic acid conjugated to the metal spectra and in both metal concentrations. This result profile resembles studies carried out by Kryukova (2005) and Rizzi (2000), where complexation between amino acids and metals presented a shift in the band spectrum of the carboxylic group to a region of higher energy due to the rearrangement of the C=O and a decrease in frequency of the symmetrical stretch band justified by R-O binding.

3.2 Chelating effect of Fe^{2+} and Fe^{3+} in antioxidant iron reduction assay (DPPH)

The values for the chelating (IC_{50}) and DPPH (EC_{50}) effect were measured in Table 1. According to the data presented in Table 1, gallic acid had a considerable antioxidant activity, as well as managed to chelate iron ions, which can be observed when compared to the control,

with the best result being obtained for the chelating effect, where gallic acid presented a value approximately 16 times lower than the control.

Antioxidant activity is attributed to phenolic compounds due to both its chemical structure and its reducing properties, playing an important role both in free radical sequestration and in transition metal chelation. Cunha et al. (2016) when working with the *Eugenia uniflora* extract also obtained that the extract, whose composition possessed phenolic compounds such as gallic acid, had a good antioxidant activity with an EC₅₀ of 2430.86 µg.mL⁻¹, using the chelating effect methodology. Figueredo et al. (2016b) in their study also observed that their extract possessed antioxidant activity, which was attributed to phenolic compounds and flavonoids present in the sample. Leite et al., (2016) when using the DPPH technique also evaluated the antioxidant activity of the *Eugenia jambolana* and *Psidium myrsinites* extracts where the two extracts presented an excellent activity, the first one obtaining a value of 96.81 mg.mL⁻¹ and the second one of 7.52 mg.mL⁻¹. Some of the extract results obtained EC₅₀ and IC₅₀ values lower than those found in this study as they worked with complex mixtures, which in addition to the tannin present in this study, also contains several phenolic compounds and flavonoids.

3.3 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MICs observed for the bacteria and fungi were 1024 and 16384 µg.mL⁻¹ respectively. The substance in question did not confer cytoprotection to the prokaryotic model when associated with mercury chloride at a sub-inhibitory concentration (64 µg.mL⁻¹), which can be evidenced by the greater number of microorganismal death when compared to the control, which is the metal used in isolation, thus not altering the survival profile of the tested strain (Supplementary material 1). Many papers in the literature depict the antibacterial activity of phenolic compounds. Results from Leite et al. (2014), when working with the *Psidium guajava* var *pyrifera* and *Psidium guajava* var *pomifera* extracts using the same bacterial strain, corroborate with our study, however, they used iron as the heavy metal and not mercury chloride. Moreover, the results from Figueredo et al (2016b) are contradictory to ours since both the extracts and the *Lygodium venustum* fractions, which present in their composition phenolic acids such as gallic acid, presented cytoprotection against mercury chloride in *E. coli* 25922.

Gallic acid conferred cytoprotection to the fungus used in the assay using the same sub-inhibitory concentration (64 µg.mL⁻¹). This result is evidenced by the higher survival rate of the fungi when using the metal in association with the isolated substance compared to when using metal in isolation. In this way, a greater concentration of mercuric chloride is

necessary to obtain the same result when this is used in isolation (Supplementary material 2). Our data disagree with that from Figueredo et al (2016a), who used the *Lygodium venustum* SW ethanolic extract, which had in its constitution phenolic compounds and fractions, and which did not confer cytoprotection to the *Candida krusei* 02 fungus. The disagreement in our results may be attributed to the fact that the author used a complex substance, that is the extract, where in its composition a host of substances exist which while possessing phenolic constituents, gallic acid may be absent or even at lower concentrations than those used in this study.

3.4 Allelopathic effect on lettuce seeds

Some plants may present and release substances from their constitution with allelopathic potential, thus hindering the germination of seeds or even compromising the development of other plants (Rezende et al., 2003).

The gallic acid allelopathic concentration was greater than $512 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Supplementary material 3). The sub-allelopathic concentrations ranged from 512 to $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the isolated substance, that is, any of these concentrations would allow the growth of *Lactuca sativa* seeds, such that any of these could be used in the seed cytoprotection study against mercury chloride. However, in a visual analysis, the $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration presented the best radicle and caulicle development, therefore this was the concentration chosen to be used in the tests.

3.5 Germination time

The germination time was evaluated with both the control using water, with the substance in question and with different concentrations of the metal (1.25, 0.5, 0.05 and 0.01 mM) as well as with the association of the product with the metal during 7 days. No significant differences between the water and gallic acid controls, the lowest metal concentrations (0.01 and 0.05 mM) or with their association with gallic acid were observed (Supplementary material 3). The fact that even in the presence of the metal the seeds can still germinate is due to the fact that some metals can be beneficial for the growth of organisms such as plants at low concentrations (Celere et al., 2007).

At the 0.05 mM HgCl_2 concentration associated with gallic acid, a larger growth was observed than when HgCl_2 (0.05Mm HgCl_2) was used in isolation. At the highest concentration of the metal (1.25mM), this produced a better result in isolation than when it was associated with gallic acid, which may be explained by the fact that gallic acid has its own toxicity, such that when it was associated to the metal at this concentration, synergism

occurred increasing in this way the overall toxicity, nevertheless lettuce seed germination was above 50%.

3.6 Cytoprotective effect against HgCl₂ on lettuce seeds

As for the cytoprotection test using lettuce seeds (Figure 4), the lowest concentrations of HgCl₂ (0.05 mM and 0.01 mM) in association with gallic acid had better radicle growth than when the metal was used at the same concentration in isolation. According to Grant et al (1998) the roots are among the plant structures which generally engage with absorption, in this way, the highest metal concentrations are found in this part. As for the caulicles, no differences in any of the concentrations were observed, neither for the isolated metal nor for the associations. Our results partially disagree with that of Sobral-Souza et al (2014) and Cunha et al (2016), since in the first study which used the *Eugenia jambolana* extract, a cytoprotection of the lettuce seeds against mercury chloride action was observed, allowing greater caulicle and radicle growth. In the second study, which used the *Eugenia uniflora* extract, which had in its constitution phenolic compounds, among them, gallic acid, a better growth of caulicles and radicles was observed.

However, it should be noted that the studies mentioned above were performed with complex mixtures, such is the case of extracts, which present in addition to the compound tested here, a great diversity of tannins and flavonoids, which may have contributed to the increased cytoprotection observed in their studies.

3.7 Dry caulicle and radicle mass

According to Figure 5, at the highest concentration a difference was observed between the dried caulicle and radicle masses when used in association with gallic acid compared to in the presence of the metal in isolation. At the lowest concentration of the metal in isolation (0.01mM HgCl₂) a reduction in dry mass was observed for both caulicles and radicles, demonstrating that it not only interferes in the growth of these structures, but it also interferes in the tissue formation of these plant parts. At the same metal concentration when in association with gallic acid, a better result for the dry mass is observed, demonstrating that gallic acid not only confers a cytoprotection element to the seeds, it also contributes to a better development of these, such as in the protection of nutrients that are essential for the development of the plant, thus preserving plant tissues.

Mercury chloride is a soluble inorganic solvent with liposolubility in biological membranes. In cells, it is a strong protein denaturant and plays a role in metabolic functions. In this way, it causes serious damage to the cell membrane, as well as interfering in the transport through it (Ishikawa et al., 2007; Vassalo et al., 1996; Souza and Barbosa, 2000).

4. Conclusion

Gallic acid did not present cytoprotection in the bacterial model, however cytoprotection was demonstrated in the microbial and plant model, thus allowing better plant growth, which can be observed by the measurement of caulicles and radicles, as well as by the preservation of *Lactuca sativa* plant tissues, demonstrated by the increase in dry mass. This cytoprotection is associated with the antioxidant and chelating activity of the tested compound, demonstrated by the assays and confirmed by infrared spectroscopy. This is the first report using an infrared spectroscopy and antioxidant approach to elucidate the mechanism of cytoprotection permitting organisms to survive and develop in fields contaminated with mercury and possibly, other heavy metals. These results as well as innovative are promising in the search for alternatives for the decontamination of environments polluted by mercury chloride.

Declaration of interest

None.

fig.1. Infrared spectra of DMSO, pure gallic acid, gallic acid + DMSO, and gallic acid complexed to 1.25 mM and 0.05 mM mercuric chloride in the region between 4000 cm^{-1} to 2000 cm^{-1} .

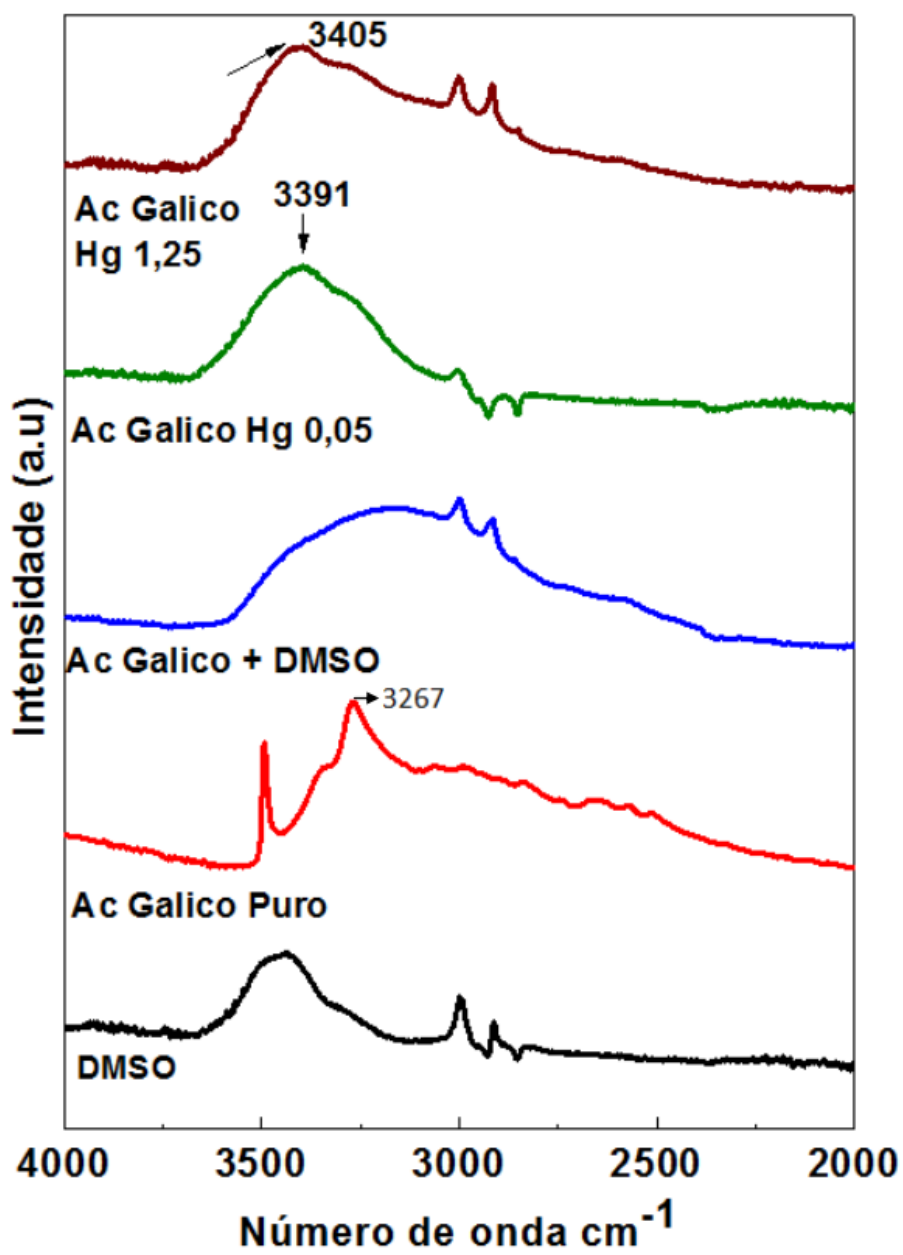


Fig. 2. Infrared spectra of DMSO, pure gallic acid, gallic acid + DMSO, and gallic acid complexed to 1.25 mM and 0.05 mM mercuric chloride in the region between 2000 cm^{-1} at 200 cm^{-1} .

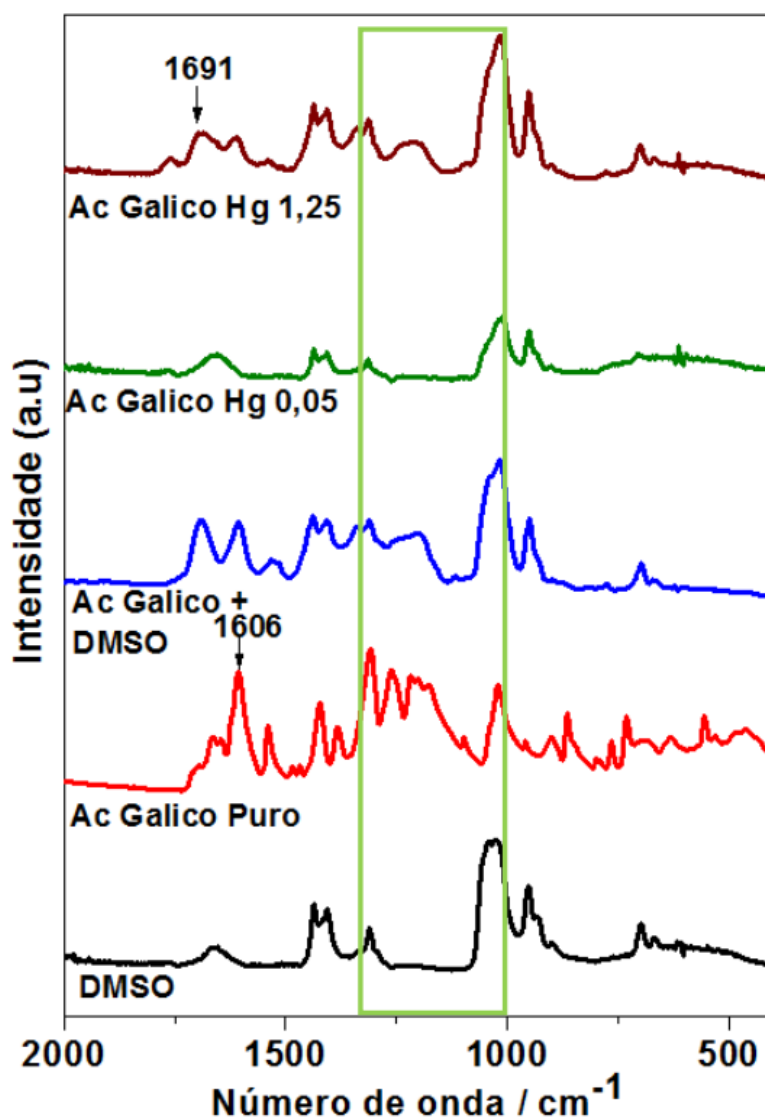


Table 1. Values of ferric ion reduction, metal chelation and activist antioxidant.

	EC50 (DPPH) (mmol/g)	IC50(Fe ²⁺) (µg/g of sample)	IC50(Fe ³⁺) (µg/g of sample)
Ac. Asc	1,61 ± 1,64	35,9000	16,38 ± 1,00
Áci. Gál	1,47 ± 0,78	2,1400	202, 53 ± 1,03

Fig.3. Bactericidal concentrations of mercury chloride and associated with gallic acid

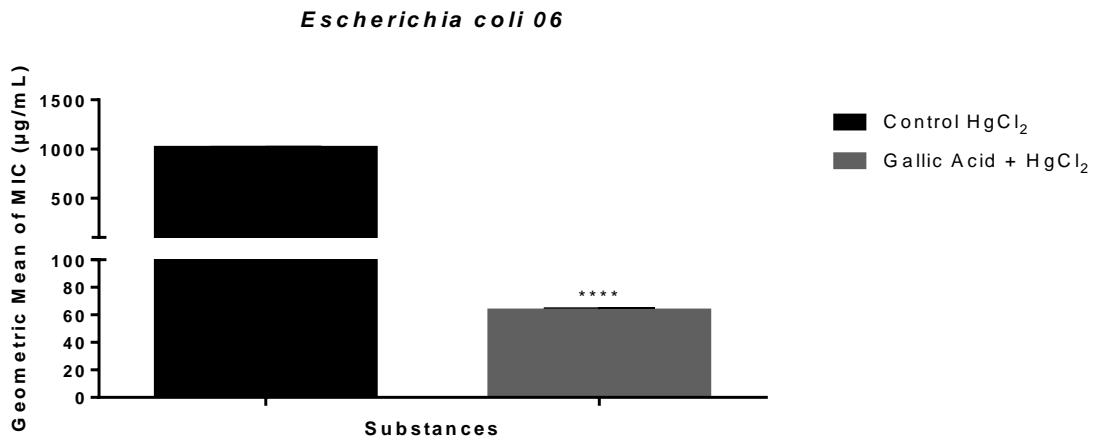


Fig. 4. Fungicidal concentrations of Mercury chloride alone and associated with gallic acid

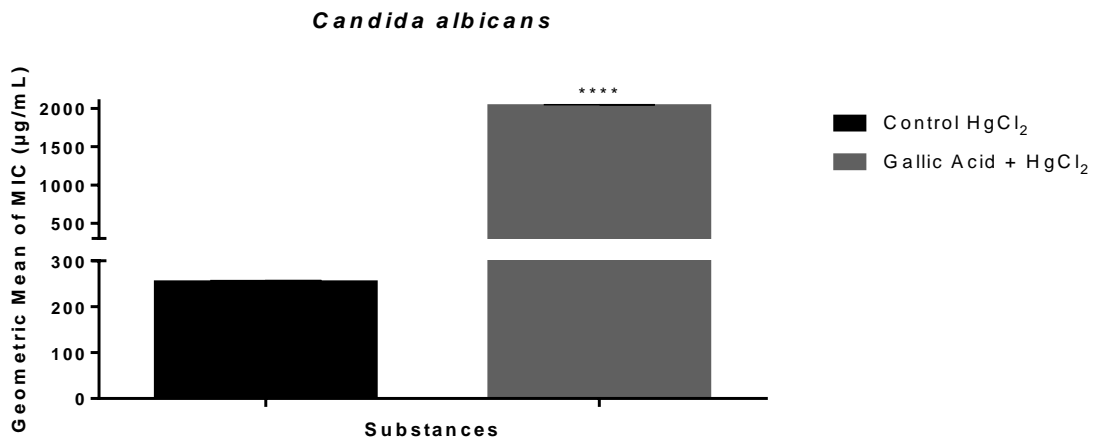


Fig. 5. Evaluation of *Lactuca sativa* seeds in different concentrations of gallic acid

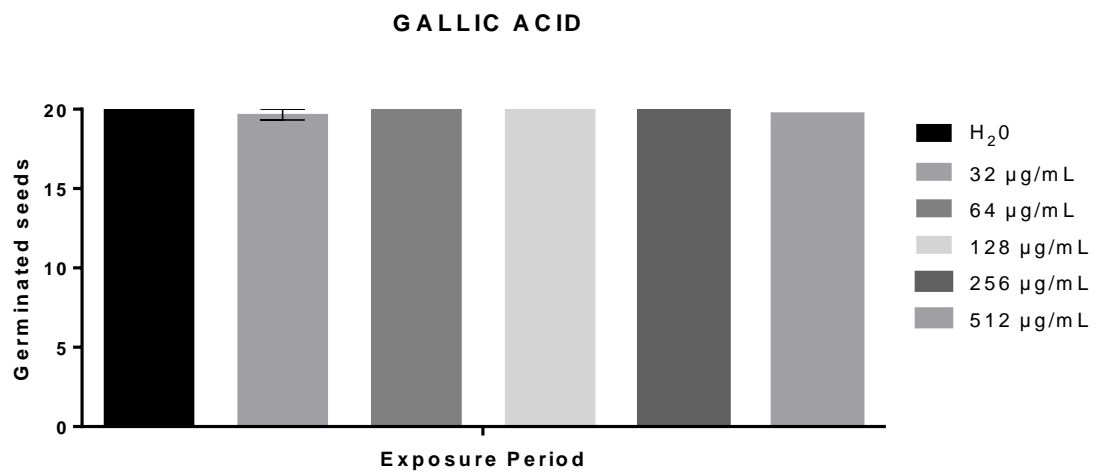


Fig.6. Speed of germination of *Lactuca sativa* seeds submitted to treatment with water, gallic acid, different concentrations of mercury chloride and the association of these with the isolated substance.

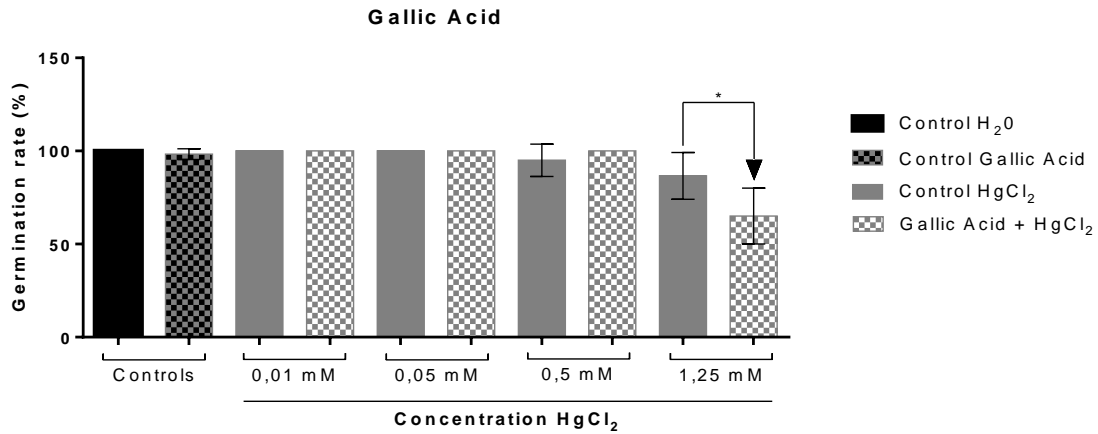


Fig.7- Measurement of cauliflower and radish of *Lactuca sativa* submitted to treatment with mercury chloride at the highest and lowest concentration tested, and the association of this with gallic acid

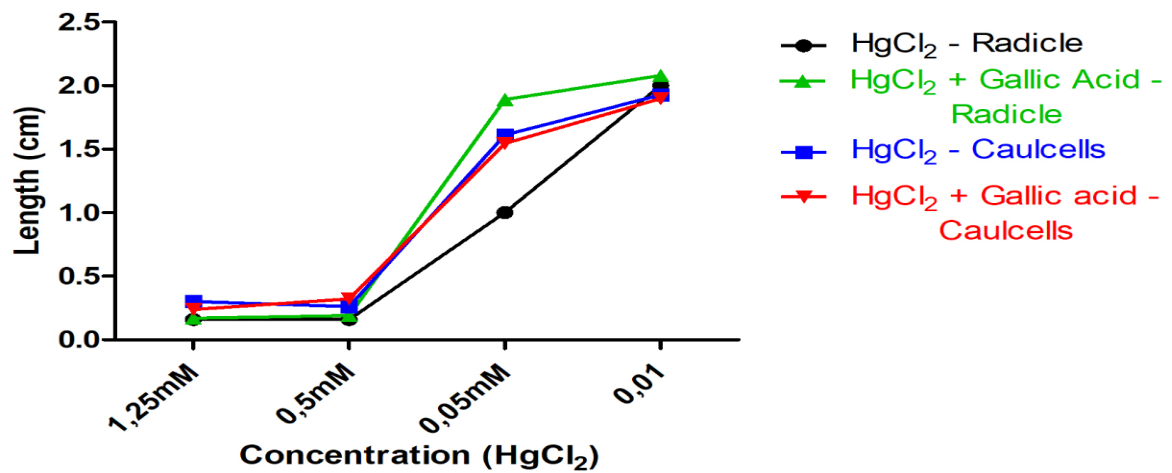
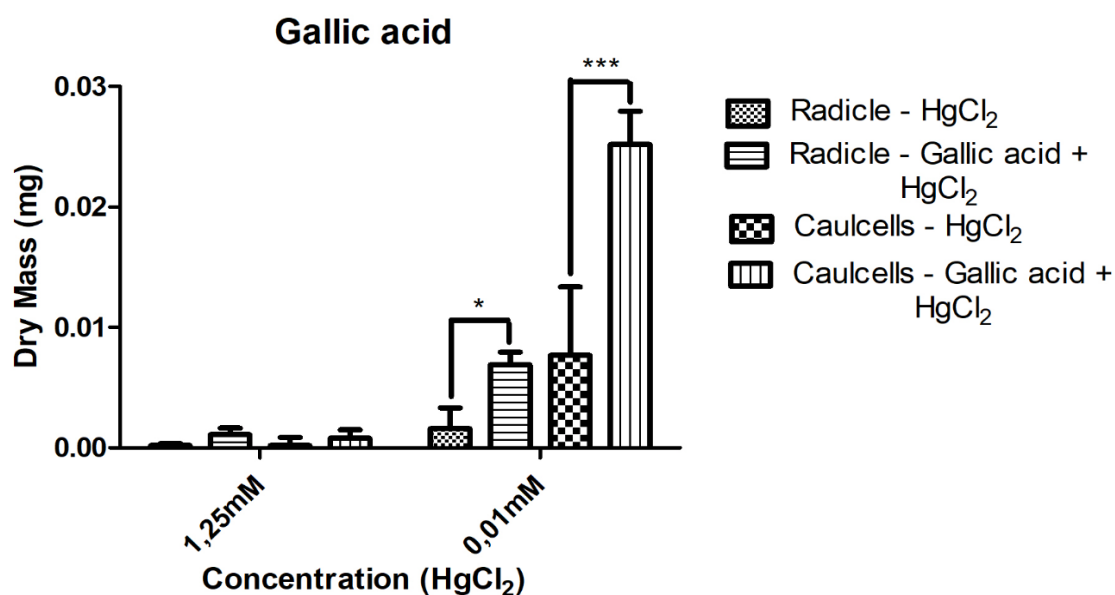


Fig. 8. Dry matter of the *Lactuca sativa* seed submitted to treatment with the highest and lowest concentration of mercury chloride, and the association of these with gallic acid



REFERÊNCIAS

Alves, L.A., Freires, A., Pereira, T.M., Souza, A.D., Lima, O., Castro, R.D., 2013. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. *Acta Odontol. Scand.*

Andrade, S.F., Matos, T.B., Carvalho, C.E.V., 2011. “Variação Sazonal de Metais Pesados em Siris *Callinectesornatus* (Ordway,1863) da Lagoa de Iquimar’i. Brasil,” *Revista Virtual de Quimica.* 3, 129–137.

Boening, D.W., 2000. Ecological Effects, Transport and Fate of Mercury: a General Review. *Chemosphere.*40, 1335-1351.

Brazil, 2009. Ministério da Agricultura, Departamento de Produção Vegetal. Divisão de Sementes e Mudás. Regras para análise de sementes. LANARV/SNAD/MA, Brasília, 188.

Celere, M.S., Oliveira, A.S., Trevilato, T. M. B., Segura- Muñoz, T. M. B., 2007. Metais presentes no chorume coletado no aterro sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua relevância para saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública.* 23, 4, 939–947.

Counter, S.A., Buchanan, L.H., Ortega, F., Laurell, G., 2002. Elevated blood mercury and neuro-otological observations in children of the Ecuadorian gold mines. *Journal of Plant Science*. 78, 1-17.

Cunha, F.A.B., Pinho, A.I., Santos, J.F.S, Sobral-Souza, C.E., Albuquerque, R.S., Matias, E.F.F, Leite, N.F., Tintino, S.R., Costa, J.G.M., Bolignon, A.A., Waczuk, E.P., Rocha, J.B.T, Posser, T., Coutinho, H.D.M., Quintans-Junior, L.J., Franco, J.L., 2016. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant Mercury chloride. *Arabian Journal of Chemistry*.

Deguchi, T.G.F., 2006. Estudo do equilíbrio químico de compostos modelo de taninos com íons metálicos para o tratamento de efluentes industriais. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos materiais)- PIPE, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. *Environment Health*. 49, 221-70.

Figueredo, F.G., Lima, L.F., Morais-Braga, M.F.B., Tintino, S.R., Farias, P.A.M., Matias, E.F.F, Costa, J.G.M, Menezes, I.R.A., Pereira, R.L.S., Coutinho, H.D.M., 2016b. Cytoprotective effect of *Lygodium venustum* Sw. (Lygodiaceae) against mercurium chloride toxicity. *Scientifica*.

Figueredo, F.G., Lima, L.F., Morais-Braga, M.F.B., Figueredo, J.G., Pinto, N.B., Matias, E.F.F., Menezes, I.R.A., Almeida, R.S., Cunha, F.A.B, Coutinho, H.D.M., 2016a. Avaliação do potencial citoprotetor contra o efeito tóxico do cloreto de mercúrio e antioxidante de *Lygodium venustum* SW (Lygodiaceae). *Revista Interfaces*. 39(9), 44-49.

Gallucci, M.N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygodlo, J., Demo, M., 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr. J.* 24, 348-354.

Grant, C.A., Buckley, W.T., Bailey, L.D., Selles, F., 1998. Cadmium accumulation in crops. *Canadian Journal of Plant Science*. 78, 1-17.

Guedes, T.T.A.M., 2016. Espectroscopia vibracional entre cloreto de mercúrio e taninos hidrolisáveis. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato, Ceará.

Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., 2007. Acute Toxicity of Mercury (HgCl₂) to Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. B. Inst. Pesca. 33, 99-104.

Jain, R.K., 2013. Study of heavy metals effect in response to linum seed germination. African Journal of Plant Science. 7(3), 93-109.

Kryukova, N.P., Frolov, V.Y.U., Kolokolov, F.A., Bolotin, S.N., Panyushkin, V.T., 2005. Synthesis and Study of Copper(II) Complexes with Aspartic Acid, Serine, and Valine, Russian Journal of General Chemistry. 75, 503-506.

Leite, N.F., Sobral-Souza, C.E., Lavor, A.K.L.S., Brito, D.I.V., Figueredo, F.G., Ferreira, J.V.A., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M., 2014. Composição fenólica e avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Psidium guajava* L. var *Pyrifera* e *Psidium guajava* L. var *Pomífera*. Caderno de Cultura e Ciência, Universidade Regional do Cariri-URCA, 13,1.

Leite, N.F., Sobral-Souza, C.E., Matias, E.F.F., Alencar, L.B.B., Albuquerque, R.S., Morais-Braga, M.F.B., Souza, E.O., Coutinho, H.D.M., 2016. Efecto citoprotector de extractos de *Eugenia jambolona* y *Psidium myrsinites* DC.A. contra peroxidación lipídica por hierro II. Acta. Toxicol. Argent., 24(3), 187-192

Lopes, W.A., Fascio, M., 2004. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. Química Nova. 7, 670-673.

Puntel, R.L., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2005. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (tbars) production in rat brain in vitro. Neurochem.Res. 30, 225-235

Ratcliffe, H.E., Swanson, G.M., Fischer, L. J., 1996. Human exposure to mercury: A critical assessment of the evidence of adverse health effects. Journal Toxicological

Rezende, C. P., Pinto, J. C., Evangelista, A. R., Santos, I. P. A., 2003. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras: Editora UFLA. 54, 55.

Rizzi, A.C., Piro, O.E., Castelanno, E.E., Nascimento, O.B., Brondino, C.D., 2000. Structure and single crystal EPR study of Cu(II)(l-threonine)₂·H₂O. Inorganica Chimica Acta. 305, 19-25.

Sanchez-Moreno, J.A., Larrauri, F., Saura-Calixto, A.A., 1998. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J Sci Food Agricult. 76,270-6.

Settle, F.A., 1997. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Prentice Hall.

Shadomy, S., Espinel-Ingroff, A., Cartwright, R., 1985. Laboratory studies with antifungal agentes: susceptibility test and bioassay In: Lennette,E.H., Ballows,A., Hauslers JR.V., Shadomy,H.J. (Eds). 4ed.J. Virol. 991-999

Sobral-Souza, C.E., Leite, N. F., Cunha, F.A.B., Pinho, A.I., Albuquerque, R.S., Carneiro, J.N.P., Menezes, I R.A., Costa, J.G.M., Franco, J.L., Coutinho, H.D.M., 2014. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. Arabian Journal of Chemistry. 7, 165–170.

Solomons, T.W., Graham, F., Craig, B., 2009. Química orgânica. 71-81.

Soong, Y.Y., Barlow, P.J.,2006. Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus indica* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) and their effects on antioxidant activity. Food Chemistry. 97, 524–530.

Souza, C.M.M., Silva, H.R, Vieira-JR., G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H.,2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim. Nova, 30, 2, 351-355.

Souza, J.R., Barbosa, A.C., 2000. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. Química Nova na Escola. 12.

Sweet, L.I., Zelikoff, J.T., 2001. Toxicology and immunotoxicology of mercury: A comparative review in fish and humans. Journal Toxicological Environment Health. 4,161–205.

Vassalo, D. V., Massaroni, L., Oliveira, E.M., Rossoni, L.V., Amaral, S.M.C., Vassalo, P.F., 1996. Ações tóxicas e agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. Centro Biomédico da UFGS, Vitória e Hospital Universitário da UFSM, Santa Maria RS, Vitória ES. Arq. Bras. Cardiologia. 67, 54-61.

Verza, S.G., 2006. Avaliação das variáveis analíticas de métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias proteicas e derivados da polivinilpirrolidona. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

5.2 Resultado 2

Uso de métodos FTIR e antioxidantes para identificar o mecanismo de redução da toxicidade do cloreto de mercúrio pelo ácido cafeico

Autores: Janaina Esmeraldo Rocha, Tássia Thaís de Alencar Martins Guedes, Camila Fonseca Bezerra, Maria do Socorro Costa, Fabia Ferreira Campina, Thiago Sampaio de Freitas, Amanda Karine Sousa, Celestina Elba Sobral Souza, Maria Karollyna do Nascimento Silva, Yedda Maria Lobo Soares de Matos, Francisco Nascimento Pereira-Junior, João Hermínio da Silva, Irwin Rose Alencar Menezes, Raimundo Nonato Pereira Teixeira, Aracélio Viana Colares, Henrique Douglas Melo Coutinho.

Manuscrito submetido para **Journal of Inorganic Biochemistry**

Qualis em Biodiversidade : B1 **Fator de Impacto :** 3,06

Situação: Submetida

Uso de métodos FTIR e antioxidantes para identificar o mecanismo de redução da toxicidade do cloreto de mercúrio pelo ácido cafeico

Janaina Esmeraldo Rocha, Tássia Thaís de Alencar Martins Guedes, Camila Fonseca Bezerra, Maria do Socorro Costa, Fabia Ferreira Campina, Thiago Sampaio de Freitas, Amanda Karine Sousa, Celestina Elba Sobral Souza, Maria Karollyna do Nascimento Silva, Yedda Maria Lobo Soares de Matos, Francisco Nascimento Pereira-Junior, João Hermínio da Silva, Irwin Rose Alencar Menezes, Raimundo Nonato Pereira Teixeira, Aracélio Viana Colares, Henrique Douglas Melo Coutinho.

RESUMO

Nos últimos tempos observa-se uma crescente preocupação com a contaminação do ambiente, principalmente pela presença de metais pesados no solo e nas águas. Um dos responsáveis por essa contaminação é o mercúrio. O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade antioxidante, quelante de metal e citoproteção do ácido cafeico contra a ação do Cloreto de Mercúrio (HgCl₂). Teste de DPPH e quelante de ferro foram realizados pra avaliar a atividade antioxidante, onde o produto exibiu uma considerável atividade. Através da espectroscopia de Infravermelho foi analisada a interação entre o metal e o ácido cafeico. Os testes microbiológicos foram realizadas por microdiluição obtendo-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a partir da concentração sub-inibitória foi avaliado a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para avaliar a citoproteção em modelo vegetal, foi utilizado uma concentração sub alelopática do produto (32µg/mL) e diferentes concentrações do metal pesado, onde pode-se observar que o ácido cafeico conferiu uma citoproteção as sementes de *Lactuca sativa*, permitindo um melhor crescimento e desenvolvimento das radículas e caulículos da planta. Este resultado pode ser atribuído ao efeito quelante e antioxidante do produto, reduzindo desta forma a toxicidade do metal. Estes resultados demosntram a possibilidade do uso de produtos naturais como alternativa de quelação de metais pesados e possibilitam um melhor desenvolvimento de vegetais presentes em áreas contaminadas.

PALAVRAS-CHAVES: ácido cafeico, toxicidade, metal pesado

1. Introdução

O mercúrio (Hg) é um metal pesado encontrado no ambiente que se origina tanto de fontes naturais como de fontes antropogênicas[1]. A contaminação de águas residuais com altas taxas desses metais tem resultado numa redução significativa na biodiversidade [2, 3,4]

Nas últimas décadas, tem sido observado uma crescente preocupação com a contaminação ambiental. Isto é resultante da ação humana e a principal fonte de contaminação [5]. Níveis altos de metais no ambiente são preocupantes pois os mesmos trazem riscos tanto para a saúde humana, como para animais e plantas [6]. Uma das alternativas de evitar ou reverter a toxicidade deste metal nos organismos é através de mecanismos de antioxidação e quelação [7]. Os compostos fenólicos estão entre as principais classes de metabólitos secundários com ação antioxidante de ocorrência natural, sobretudo por inibirem tanto a peroxidação lipídica quanto a ação da lipooxigenase [8].

Dentre esses compostos fenólicos podemos citar os taninos, que são solúveis em água e tem a capacidade de formar complexos insolúveis em meio aquoso, quando nestes estão presentes proteínas, alcaloides, gelatinas, dentre outros [9]. Dentro desta classe encontramos o ácido caféico que é um composto químico com elevado efeito antioxidante [10, 11, 12].

Cada vez mais tem-se aumentado a busca por estudos que tentem esclarecer a interação existente entre compostos fenólicos e metais pesados, como cloreto de mercúrio. Neste intuito o objetivo do nosso estudo foi avaliar se o ácido caféico possuía efeito citoprotetor em modelos procarioto, eucarioto animal e vegetal contra a ação tóxica do cloreto de mercúrio, como também avaliar a sua atividade antioxidante e quelante de ferro.

2. Materiais e Métodos

2.1. Substâncias

O ácido cafeico foi adquirido da Sigma® (St. Louis, EUA). O cloreto de mercurio foi adquirido da Vetec Química Fina LTDA.

2.2. Microrganismos

Os microorganismos utilizados foram a bactéria *Escherichia coli* 06 (EC 06) e o fungo *Candida albicans* 40006 (CA INCQS 40006), fornecido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB e FIOCRUZ através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), respectivamente.

2.3 Espectroscopia de Transformação de Fourier-Infrared (FTIR)

Inicialmente, a solução de ácido cafeico foi preparada pesando 10 mg e diluído em 1 mL de DMSO para dar uma concentração de 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$. A partir desta solução, um volume de 512 μL foi diluído em 4488 μL de DMSO, para obter uma concentração final de 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Adicionou-se também uma solução 10 mM de HgCl_2 pesando 2,35 mg de HgCl_2 e diluiu-la em 1 mL de DMSO. Para obter uma concentração final de cloreto de mercúrio a 0,05 mM, uma alíquota de 25 μL da solução 10 mM de HgCl_2 foi retirada e diluída num tubo de ensaio contendo 1,25 mL da solução de tanino (1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e 3,275 mL de DMSO, resultando em uma solução final de 5 mL. Enquanto isso, para obter uma concentração final de cloreto de mercúrio de 1,25 mM, uma alíquota de 625 μL da solução 10 mM de HgCl_2 foi retirada e diluída para um tubo de ensaio contendo 1,25 mL da solução de tanino (1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e 3,25 mL de DMSO, resultando em uma solução final de 5 mL. As amostras foram então submetidas a radiação infravermelha usando um espectrômetro Bruker Vertex 70 combinado com um acessório atenuado de reflectância total (ATR) feito de Seleno de Zinco (ZnSe). A região espectral analisada variou de 200 a 4000 cm^{-1} usando uma resolução de 1cm^{-1} . Todos os espectros foram processados usando o Software OriginPro.

2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (MIC) foi avaliada por um ensaio de microdiluição de acordo com Coutinho et al. [13], com modificações.

2.5 Avaliação do potencial citoprotetor em bactérias e fungos contra cloreto de mercúrio

Para a avaliação do efeito protetor do produto no cloreto de mercúrio, Eppendorfs contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e suspensões a 10^6 UFC / ml de *Escherichia coli* 06 (EC 06) e *Candida albicans* (CA 40006) foram preparados em meio BHI a 10%. Os ensaios foram realizados por microdiluição de acordo com Leite et al [14]. A concentração de metal variou de: 5 mM a 0,00244 mM para mercúrio. As placas de microdiluição foram incubadas durante 48 h a 37 ° C numa estufa em seguida, as concentrações bactericidas mínimas (cbm) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada. Foram utilizadas placas de Petri com Agar Infusão de Coração (HIA) para transferir as soluções incubadas nas placas de microdiluição. Uma alíquota de cada poço da

placa de microdiluição foi sub-cultivada em placas de HIA. Após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C. As leituras de CBM e CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles microbianos, considerando o CBM e CFM a menor concentração do produto que inibiu o crescimento visível da subcultura [15].

2.6 Teste de alelopatia do ácido galo em sementes de *Lactuca sativa*.

Foram realizados testes piloto para determinar o efeito alelopático das amostras em estudo utilizando o método descrito por Sobral-Souza et al. [7] e Coutinho et al., [16]. Os ensaios foram realizados em triplicado e expressos como significados.

2.7 Avaliação do efeito citoprotetor do ácido caféico em um modelo de planta (*L. sativa*) contra cloreto de mercúrio

Para realizar o teste, utilizaram-se placas de Petri preparadas conforme relatado anteriormente. Quanto às concentrações utilizou-se uma concentração sub-alelopática do tanino ($32 \mu\text{g} / \text{mL}$) e do Cloreto de Mercurio (HgCl_2), variando de 1.25mM a 0.01mM , de acordo com Coutinho et al. [16]. Os parâmetros analisados no final dos sete dias foram: contagem de sementes germinadas, índice de taxa de germinação (GRI), biometria radicular e radicular, ocorrência de necrose de raízes e anormalidades de plântulas, seguindo o Manual de Regras para Análise de Sementes [17]. Os testes foram feitos em triplicado e expressados como significativos.

2.8 Ensaio antioxidante DPPH

O potencial antioxidante do ácido caféico de cada fase foi avaliado usando o método fotolorimétrico in vitro do radical livre de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) descrito por Mensor et al. [18] e Nascimento et al. [19]. Neste ensaio, foram adicionados $300 \mu\text{L}$ de ácido cafeico (250 a $5 \mu\text{g} / \text{mL}$) em $1500 \mu\text{L}$ de DPPH ($0,3 \text{mM}$) e $1200 \mu\text{L}$ de etanol P.A. Todas as leituras foram realizadas em triplicado, e com os dados médios obtidos, calculou-se a diferença de absorvância entre as amostras e o controle negativo, e a porcentagem de atividades antioxidantes (AA) obtidas por regressão linear para cada fase, obtendo assim a concentração da amostra que promove a redução para metade da redução de 50% da

concentração inicial de DPPH, respectivamente, conforme definido Concentração Efetiva (EC_{50}).

2.9 Fe^{2+} e Fe^{3+} efeito quelante

A capacidade do ácido caféico para quelar Fe (II) e a capacidade de quelar Fe (III) foram determinados de acordo com o método de Puntel et al. [20].

2.10 Análise Estatística

Dados dos microrganismos são apresentados como a média geométrica \pm SEM de três repetições. A análise estatística do teste utilizou uma ANOVA de dois sentidos seguida de teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,0001$. Todos os outros resultados foram apresentados utilizando a média aritmética \pm SEM de três repetições com ANOVA de dois sentidos, seguido de teste pós-hoc de Tukey com $p < 0,0001$.

2 Resultados e Discussão

3.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para uma avaliação das possíveis coordenações do íon Hg^{2+} à molécula de ácido caféico foram realizadas análises espectroscópicas na região do infravermelho para o ácido caféico puro e misturado com $HgCl_2$. Para um melhor entendimento destaca-se que a molécula do ácido caféico possui dois sítios de coordenação para um metal M^{2+} , sendo um na porção catecol e o outro na função carboxílico como mostrado na fig. 1.

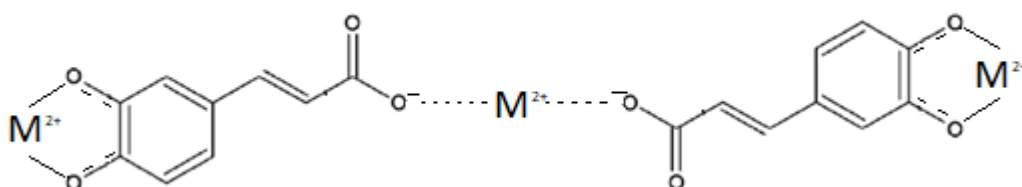


Fig. 1. Molécula do ácido caféico com os possíveis sítios de coordenação para íons metálicos.

A Fig. 2. mostra o espectro de absorção do ácido cafeico na região de 2000 a 200 cm^{-1} . A banda que ocorre na região de 1681 cm^{-1} no tanino puro, característica da deformação axial da ligação C=O de ácido carboxílico, sofre um deslocamento para as regiões de 1668 e 1658 cm^{-1} no conjugado tanino- metal 1,25 e 0,05 mM, respectivamente.

Santos & Sussuchi [21] durante estudo da complexação entre o Cobalto (III) e a Quercetina (integrante de outra classe de compostos fenólicos) notaram o deslocamento da banda característica do grupo carbonila, que nesse composto ocorre em 1664 cm^{-1} para a região de menor energia 1610 cm^{-1} , um indício de que a coordenação do composto ao íon metálico pode ocorrer através do oxigênio da carbonila. A presença de uma banda em 1009 cm^{-1} no tanino puro é característico do estiramento C-O. É possível notar que, ao conjugar o tanino, com o metal a 1,25 mM e 0,05 mM as bandas que representam esse estiramento tem um aumento bastante significativo na sua intensidade. A descoberta de uma banda em 1445 cm^{-1} no tanino puro, característica da presença do anel aromático, são confirmados pelas bandas em 1439 cm^{-1} no tanino conjugado em ambas as concentrações do metal [22,23, 24].

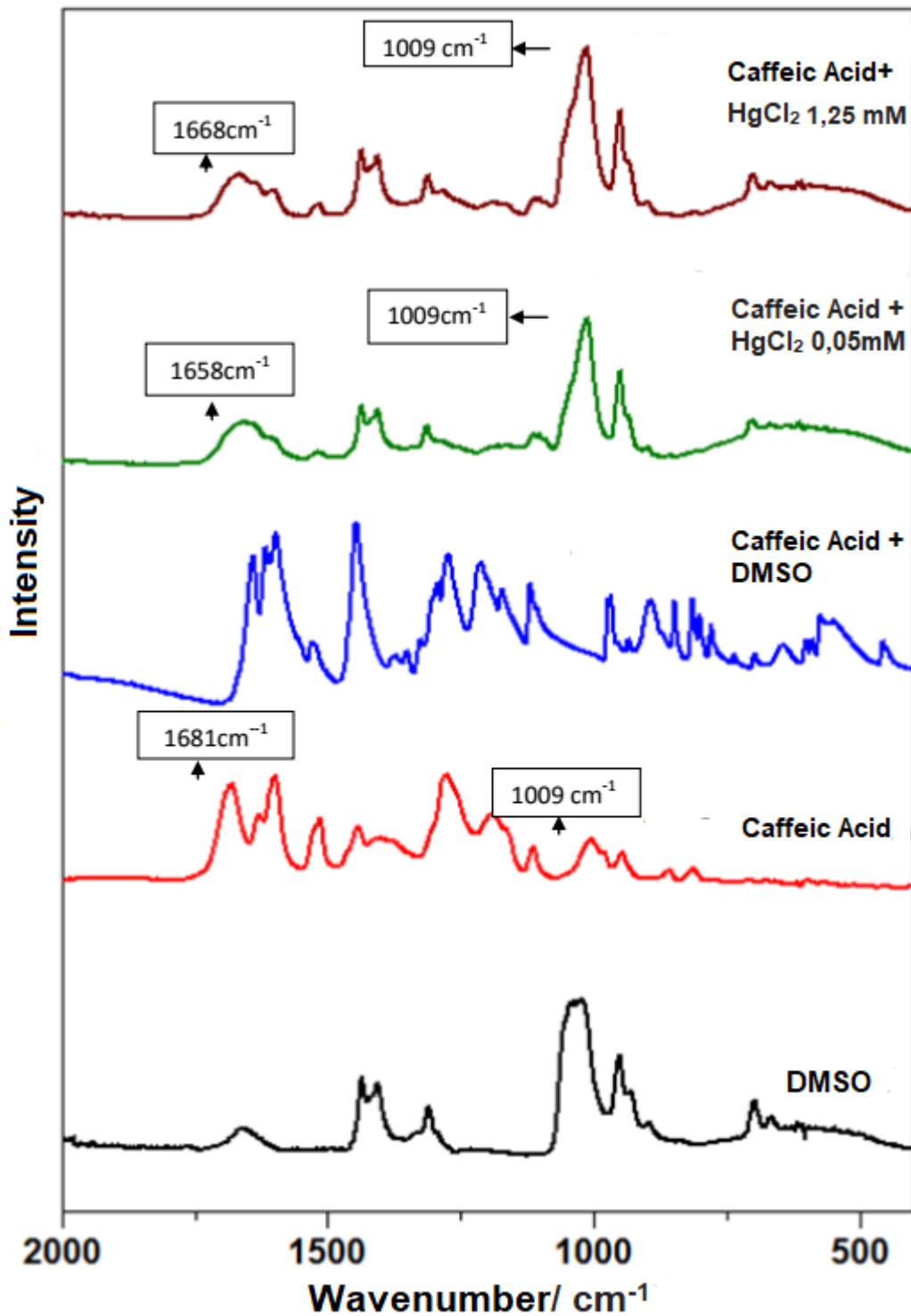


Fig.2. Espectro de Infravermelho do DMSO, Ácido caféico puro, Ácido caféico + DMSO e Ácido caféico complexado ao cloreto de mercúrio 1,25 mM e 0,05 mM na região entre 4000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} .

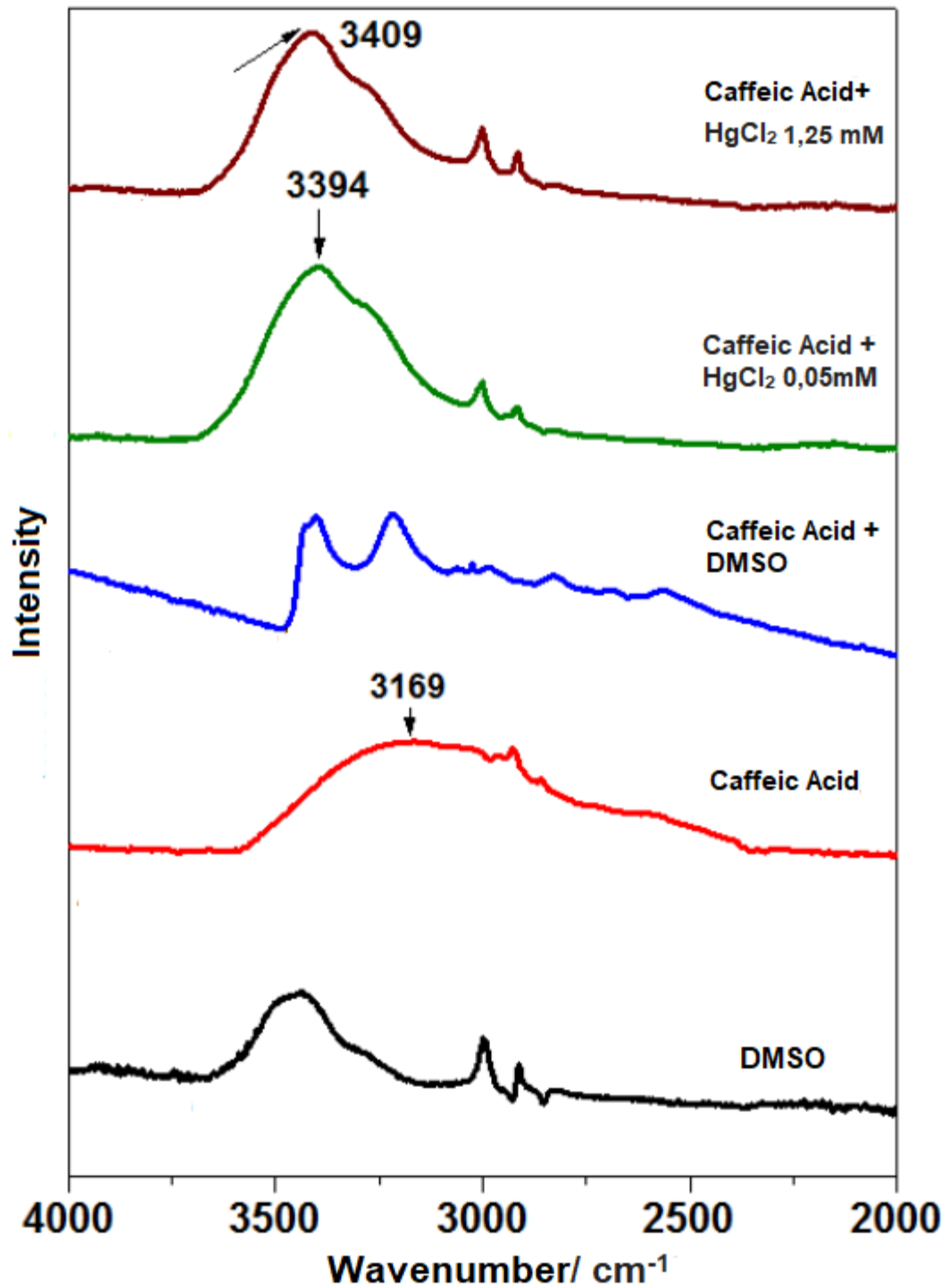


Fig. 3. Espectro de Infravermelho do DMSO, Ácido cafeico puro, Ácido cafeico + DMSO e Ácido cafeico complexado ao cloreto de mercúrio 1,25 mM e 0,05 mM na região entre 2000 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} .

A Fig. 3. mostra o espectro de infravermelho do ácido cafeico na região de 4000 a 2000 cm^{-1} , quando este é conjugado ao HgCl_2 0,05 e 1,25 mM, respectivamente. Comparando o espectro de infravermelho do ácido cafeico puro, ou seja, quando este não está conjugado ao metal, nota-se que a banda dos grupamentos fenólicos no ácido cafeico que ocorre em 3172 cm^{-1} é deslocada para as regiões de 3394 cm^{-1} e 3409 cm^{-1} quando este tanino é conjugado ao metal nas concentrações de 0,05 e 1,25 mM, respectivamente, o que indica a coordenação do metal que ocorre por meio da ligação deste com os grupos fenólicos do ácido cafeico.

A partir da análise dos dois espectros, percebe-se que existem as duas possibilidades de coordenação do íon Hg^{2+} ao ácido cafeico uma na posição dos grupos fenólicos e na carboxila.

3.2 Efeito quelante de Fe^{2+} e Fe^{3+} e teste de redução de ferro antioxidante (DPPH)

Na tabela 1 abaixo encontra-se os valores de DPPH e efeito quelante do Acido caféico

Tabela 1. Valores da redução do íon férrico, quelação de metal e antioxidante.

	EC50 (DPPH) (mmol/g)	IC50(Fe^{2+}) ($\mu\text{g/g}$ of sample)	IC50(Fe^{3+}) ($\mu\text{g/g}$ of sample)
Ac. Asc	1,61 \pm 1,64	35,9000	16,38 \pm 1,00
Áci. Caf	3,24 \pm 1,06	2,3030	18,55 \pm 0,75 \pm

De acordo com os dados obtidos na tabela 1, podemos observar que o ácido caféico tanto apresenta uma considerável ação antioxidante como também consegue quelar os íons ferro. O tanino utilizado no teste consegue quelar o Ferro em até 15 vezes mais que o controle que é o ácido ascórbico. Para o Fe^{3+} o ácido caféico apresenta valores muito próximos ao controle, comprovando desta forma também sua potente ação antioxidante.

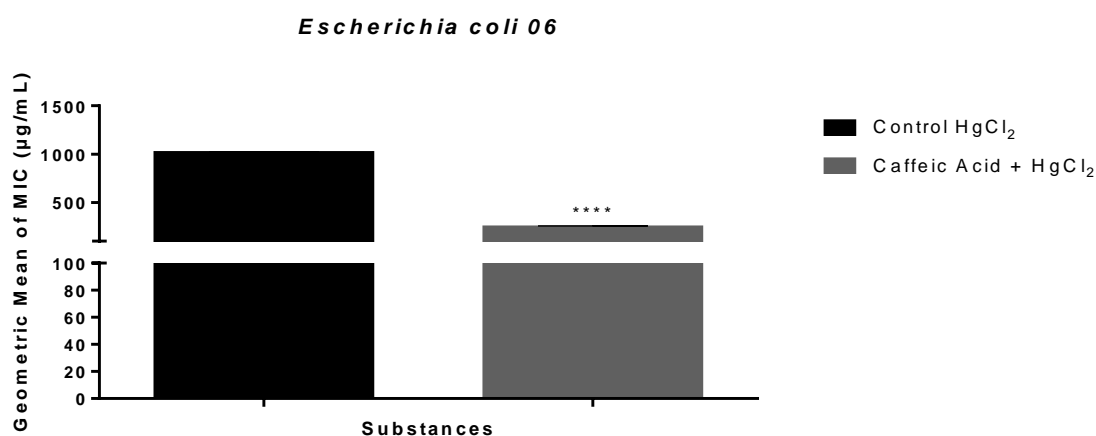
Os antioxidantes definem-se como substancias, que em baixa concentrações previnem ou retardam a oxidação do substrato [8]. Dentre os antioxidantes naturais estão inclusos os compostos fenólicos. Eles estão presentes em organismos vegetais, atuando por exemplo, na proteção contra agravos em seus tecidos. Os ácidos fenólicos, possuem pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila ligado a ele, que atribui defesa contra ataques de radicais livres [25].

Muitos trabalhos na literatura demonstram a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, dentre eles os taninos. Rodrigues et al [26] estudou a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *Croton heliotrpiifolius* e *Croton blanchetianus* que através da prospecção fitoquímica apresentou taninos em sua constituição. Os extratos apresentaram atividade antioxidante como sequestradores do radical DPPH. Viera et al [27] determinou a atividade antioxidante também pelo método de DPPH do extrato metanólico das folhas e cascas do caule de *Myracrodruon urundeuva*, que apresentou em sua constituição uma quantidade significativa de fenóis totais, sendo já relatado em outros trabalhos no seu estudo quantidades de taninos na casca, apresentando uma atividade antioxidante, com valores de 12,9 e 10,9 para as folhas e cascas, respectivamente, valores esses bem abaixo do controle utilizado no estudo que foi de 220, essa ação antioxidante foi atribuída aos compostos fenólicos presentes nos extratos. Em trabalhos realizados com extrato de *Eugenia uniflora*, que apresentava em sua composição química além de outros compostos fenólicos, o ácido caféico, apresentou uma atividade antioxidante pelo efeito quelante [28]. Figueredo et al [29] e Leite et al [30] também demonstraram atividade antioxidante em seus estudos que foi atribuída a presença de compostos fenólicos presentes em seus extratos.

Os antioxidantes advindos de vegetais, possuem caráter bastante variado, mais os que são vistos como responsáveis por maior capacidade antioxidante, são os compostos fenólicos, como taninos, flavanóides, dentre outros [31].

3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Fig. 4. Concentrações bactericidas do cloreto de mercúrio e associadas ao ácido cafeico



De acordo com a fig. 4. podemos observar que o ácido caféico não conferiu citoproteção ao modelo bacteriano utilizado no estudo, visto que, ao realizar a associação da substância com o cloreto de mercúrio, utilizado neste teste como controle, aumentou a toxicidade, causando nesse caso um sinergismo. Isso pode ser evidenciado pelo fato que associação das substâncias necessitam de uma menor concentração para causar a mesma morte do microrganismo. Esse sinergismo é explicado pelo fato que o ácido caféico possui atividade antimicrobiana, então quando associado ao cloreto de mercúrio diminui a concentração necessária para matar a mesma quantidade de cepas bacterianas.

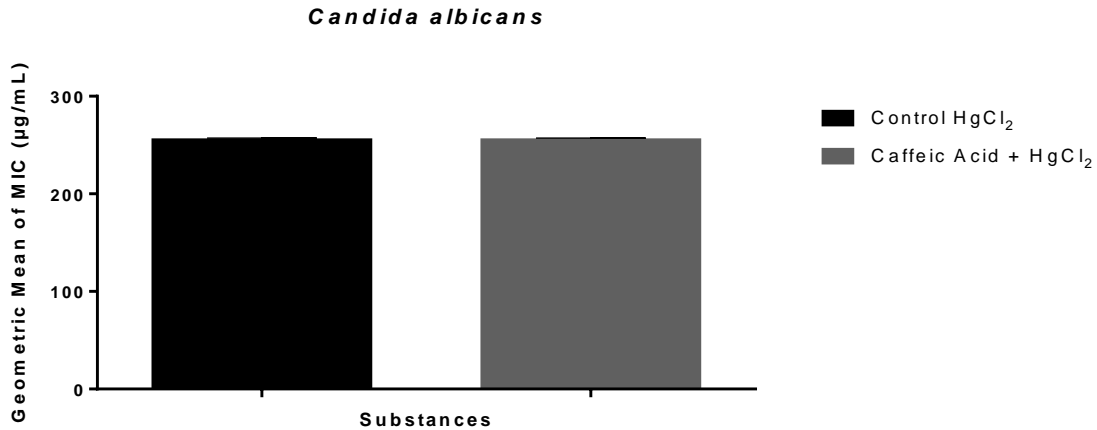
Sobral-Souza [7] e Cunha et al [28] realizando estudos com extratos etanólicos das folhas de *Eugenia jambolana* e *Eugenia uniflora*, respectivamente, frente a cepa bacteriana *Escherichia coli* 11105, encontraram resultados diferentes do nosso, onde no primeiro houve uma leve citoproteção e no segundo uma citoproteção mais considerável. Tanto o extrato de um como do outro apresentava em sua composição compostos fenólicos.

Outros estudos foram realizados para analisar o efeito citoprotetor de extratos em modelo bacteriano de *E. coli* ATCC 11105 frente a ação de metais pesados, só que o metal utilizado nos estudos foi o ferro II. Sobral-Souza et al [25] utilizou o extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora* e *Psidium sbraleanum* e Leite et al [30] utilizou o extrato etanólico de *Eugenia jambolana* e *Psidium myrsinites*, ambos extratos possuíam em sua composição considerável quantidade de compostos fenólicos. Os resultados obtidos nos estudos corroboraram com o presente estudo, pois os extratos não conferiram citoproteção ao modelo procarioto, desta forma não alterando o perfil de sobrevivência bacteriana.

O extrato etanólico, diclorometano e frações de acetato de etila das folhas de *Lygodium venustum*, demonstraram uma significativa citoproteção a *E. coli* ATCC 25922 contra a ação do cloreto de mercúrio, sendo assim necessária uma maior concentração do metal para reduzir o número de cepas bacterianas. Este resultado contradiz com o encontrado no nosso estudo [29]. Lima et al [32] também encontrou em seus estudos com o extrato etanólico e frações metanólica e acetato de etila uma citoproteção ao modelo bacteriano *E. coli* 11105 frente a ação de cloreto de mercúrio, desta forma reduzindo o número de cepas mortas na presença do metal associado ao produto vegetal. A análise fitoquímica das folhas apresentaram taninos dentre outros compostos.

Os resultados contrários ao nosso estudo pode ser explicado devido ao fato dos autores acima citados utilizarem em seus estudos extratos, que são substâncias complexas, que além do ácido caféico possuem em sua composição uma diversidade muito grande de outros compostos fenólicos que podem ter sido os responsáveis nas diferenças de resultados.

FIG. 5. Concentrações fungicidas do cloreto de Mercúrio sozinho e associadas ao ácido cafeico



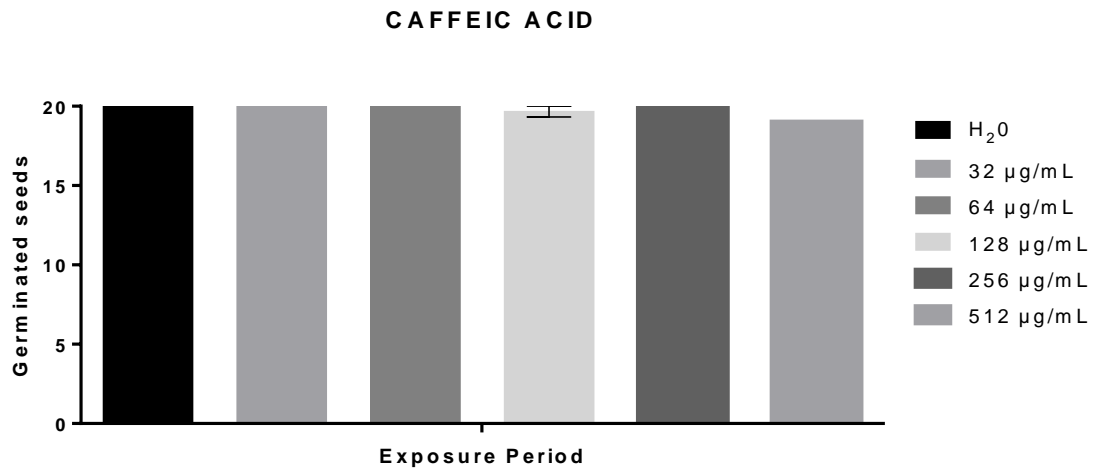
De acordo com a fig. 5. podemos observar que o ácido cafeico não apresentou efeito citoprotetor frente ao modelo eucarioto utilizado no estudo, como também ele não aumento o número de microrganismos mortos quando associado ao cloreto de mercúrio.

Nossos dados corroboram com Figueredo et al [33], Sobral-Souza [25] e Leite et al [30] que utilizaram extratos para verificar ação citoprotetora frente *Candida krusei* 02, contra o cloreto de mercúrio e *Candida albicans* 62 frente íons ferro II, respectivamente. Esses extratos possuíam em sua composição compostos fenólicos.

3.4 Efeito alelopático em sementes de alface

Alelopatia é um processo no qual produtos do metabolismo secundário de uma determinada planta, são liberados, dificultando desta forma a germinação e o desenvolvimento de outros vegetais próximos a ela [34].

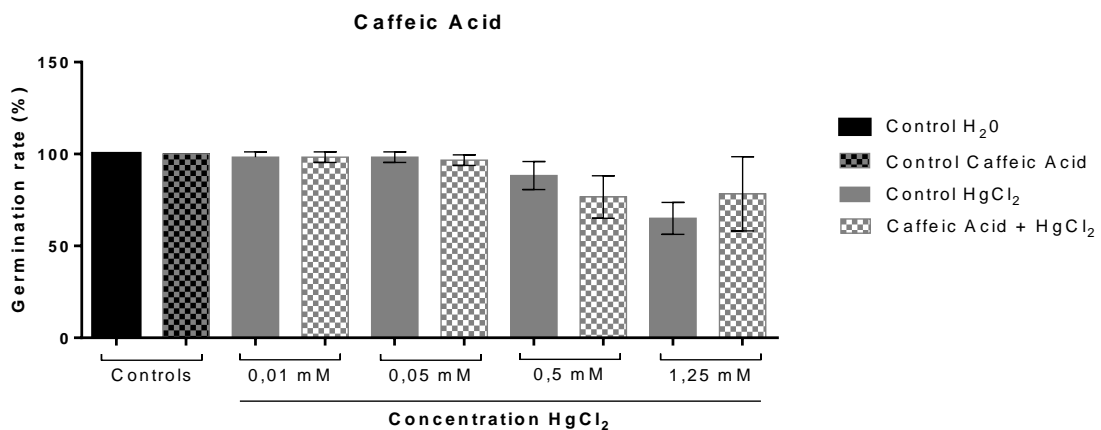
FIG. 6. Avaliação de sementes de *Lactuca sativa* em diferentes concentrações do ácido cafeico



De acordo com a figura acima podemos perceber que a concentração alelopática do ácido cafeico para as sementes de *Lactuca sativa*, foram superiores a 512 µg/mL. Desta forma podendo ser utilizada no teste de citoproteção a semente de alfaces qualquer uma das concentrações inferiores a ela, o que poder observado na figura 5. Porém numa análise visual, a concentração escolhida foi a de 32 µg/mL, pois está apresentou um melhor desenvolvimento e crescimento das radículas e caulículos da *L. sativa*.

3.5 Velocidade de Germinação

FIG. 7. Velocidade de germinação das sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com água, ácido cafeico, diferentes concentrações de cloreto de mercúrio e da associação destes com a substância isolada.

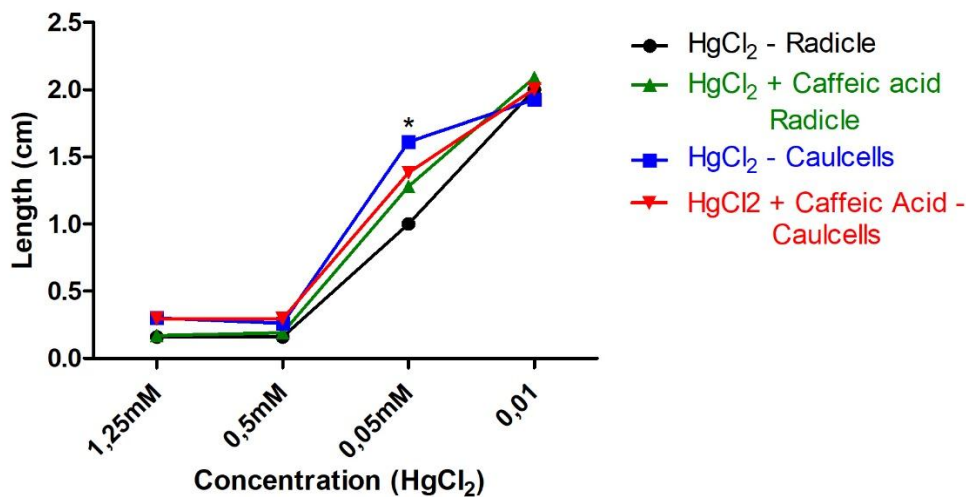


Neste teste foi observado a velocidade com que as sementes de alface germinavam num período de sete dias. Para isso elas receberam os seguintes tratamentos: sementes que receberam apenas água (controle), o ácido caféico na concentração sub-alelopática escolhida para o ensaio, diferentes concentrações de cloreto de mercúrio (1,25 mM, 0,5 mM, 0,05 mM e 0,01 mM) como também associações das diferentes concentrações do metal com o ácido caféico.

Podemos observar de acordo com a figura acima que não houve diferenças significativas entre os resultados. Porém mesmo não havendo essa diferença, é evidente que na maior concentração do metal (1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), houve uma melhor germinação das sementes quando estas receberam o tratamento do metal associado a substância em estudo (1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + ácido caféico). Alguns metais pesados em baixas doses são micronutrientes essenciais para plantas, mas em doses elevadas podem acarretar distúrbios metabólicos e inibição do crescimento para a maioria das espécies de plantas [35,36]

3.6 Efeito citoprotetivo sobre sementes de alface contra HgCl_2

FIG. 8.- Medição de caulículo e radículo de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com cloreto de mercúrio e a associação deste com o ácido caféico



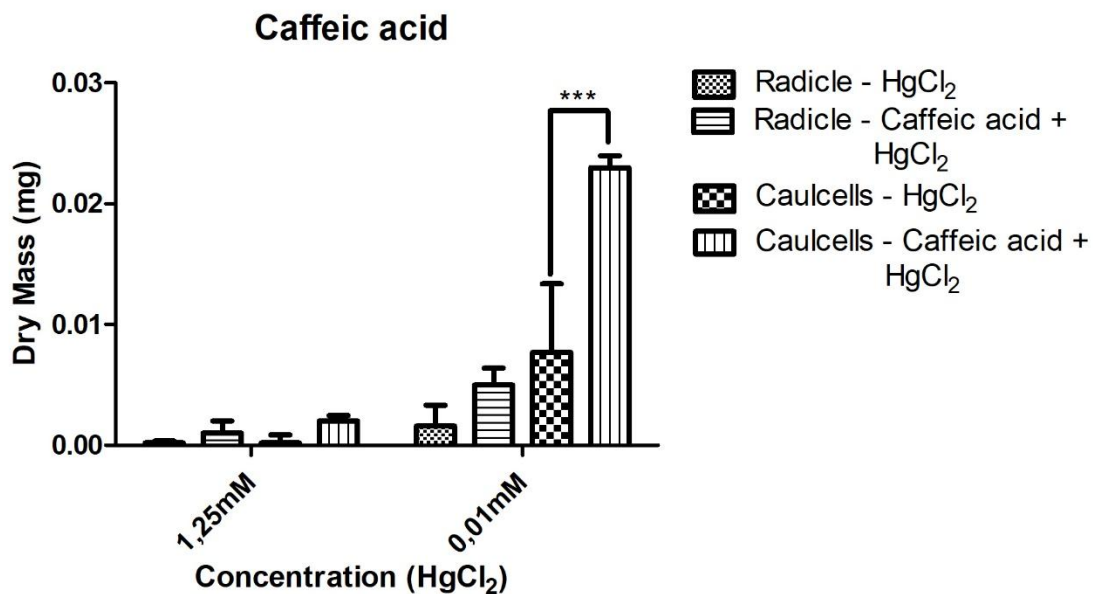
Neste teste foi realizado a medição tanto dos caulículos quanto das radículas das sementes de alface germinadas num período de sete dias, que receberam tratamentos com as diferentes concentrações de metais e com a associação destes ao ácido caféico. Como podemos observar na figura, nas maiores concentrações de metal e da associação deste com

ácido caféico, não houve diferenças quanto ao crescimento tanto de radículas quanto de caulículos. Porém na concentração de 0,05 mM, houve melhor resultado (mesmo que não tenha sido estatisticamente relevante) quando o ácido caféico foi adicionado ao cloreto de mercúrio, desta forma permitindo um maior crescimento das radículas. E na menor concentração estudada tanto os caulículos como as radículas tiveram um crescimento maior quando foi utilizado o metal pesado juntamente a substância em estudo.

Nossos resultados corroboram com Sobra-Souza et al [7], Cunha et al [28] e Leite et al [14] que em seus estudos obtiveram uma citoproteção as sementes de alface contra ação tóxica do cloreto de mercúrio, desta forma permitindo que os caulículos e as radículas tivessem um melhor crescimento do que quando utilizadas somente com o metal pesado. Mas nos trabalhos deles esse resultado foi observado em todas as concentrações utilizadas. Esse fato pode ser devido, aos mesmos, utilizarem extratos, que é uma complexo de substâncias, onde apresentam diversos metabólitos secundários e que podem estar além do ácido caféico, causando este resultado.

3.7 Massa seca de caulículos e radículas

FIG. 9. Massa seca das semente de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com a maior e menor concentração de cloreto de mercúrio, e da associação destes com o ácido caféico



Neste resultado é avaliado a massa seca das sementes de *Lactuca sativa* na maior e menor concentração do cloreto de mercúrio e deles associado ao tanino utilizado no ensaio. Podemos notar que há um maior aumento de massa seca quando as sementes de alface

recebem o tratamento cloreto de mercúrio + ácido caféico, isso pode ser evidenciado tanto na maior concentração (mesmo que não haja diferença significativa) quanto na menor concentração, tanto para os caulículos quanto para as radículas.

Um aumento no percentual de massa seca demonstra que o ácido caféico ele não somente confere uma citoproteção as sementes de alface contra a toxicidade do cloreto de mercúrio, permitindo um maior crescimento nas radículas e caulículos, mas como também ele confere uma maior preservação dos tecidos vegetais das sementes, resultando desta forma numa proteção de nutrientes que são essenciais para o seu desenvolvimento. Como também podemos supor que nos caulículos e radículas que receberam tratamento apenas com o metal pesado, o seu crescimento é devido a incorporação de água presente e não a um melhor desenvolvimento das sementes de alface.

A contaminação de solos com metais pesados, afeta não somente o crescimento e a distribuição na planta, como também interfere nos seus ciclos biológicos [37]. Alguns autores falam, que tanto a inibição como o crescimento da raiz resultante da ação de metais pesados, pode ser devido a interferência deles com a divisão celular [38,39,40].

4. Conclusão

O produto utilizado no estudo não conferiu citoproteção ao modelo procarioto e eucarioto animal. Porém demonstrou ser eficaz na proteção contra ação de metal pesado no modelo eucarioto vegetal, que pode ser evidenciado tanto pelo maior crescimento de caulículos e radículas como também pelo aumento da massa seca, resultando num melhor desenvolvimento das sementes de *Lactuca sativa*. Esta ação citoprotetora apresentada pelo ácido caféico pode estar associada a ação antioxidante e quelante do produto. Estes resultados além de inovadores, tornam-se importante na busca de novos produtos que possam reverter a ação tóxica de metais pesados nos ambientes.

REFERENCIAS

[1] NRC. Toxicological Effects of Methylmercury. In Toxicological Effects of Methylmercury. Washington (DC) (2000).

- [2] S.D. Cunningham, J.R. Shann, D.E. Crowley, T.A. Anderson , Phytoremediation of contaminated water and soil, Phytoremediation of soil and water contaminants, American Chemical Society, (1997) 2-17.
- [3] I. Raskin, B.D. Ensley, Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment (ed) John Wiley and Sons, New York, (2000) 303.
- [4] R.B. Meagher, Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *C. Op, Plant Biol*, 3 (2000) 153-162.
- [5] P.L. Gratão, A. Polle, P.J. Lea, R.A. Azevedo, Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier, *Funct. Plant Biol.* 32 (2005) 481-494.
- [6] R.K.Jain, Study of heavy metals effect in response to linum seed germination, *African Journal of Plant Science*, 7 (2013) 93-109.
- [7] C. E. Sobral-Souza, N. F. Leite, F.A.B.Cunha, A. I. Pinho, R. S. Albuquerque, J. N.P. Carneiro, I. R.A. Menezes, J. G.M. Costa, J. L. Franco, H. D.M. Coutinho, Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam, *Arabian Journal of Chemistry*, 7 (2014) 165–170.
- [8] C. M. M. Sousa, H. R. e Silva, G. M. Vieira-Jr., M. C. C. Ayres, C. L. S. da Costa, D. S. Araújo, L. C. D. Cavalcante, E. D. S. Barros, P. B. de M. Araújo, M. S. Brandão, M. H. Chaves, Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais, 30 (2007) 351-355.
- [9] J. P. C. Mello, S. C. Santos, Em **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.
- [10] M. Nardini, P. Pisu, V.Gentili, F.Natella, M. Di Felice, E. Piccolella, C Scaccini, Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radical Biology and Medicine*, 25 (1998) 1098-1105.

- [11] H.Tapiero, K.D. Tew, G. Nguyen BA, G. Mathé, Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biomed Pharmacotherapy*, 56 (2002) 200- 2007.
- [12] H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, H. Taniguchi, Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its related Compounds, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 2161-2168.
- [13] H.D.M. Coutinho, J.G.M. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira Jr, Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* and chlorpromazine, *Chemotherapy*, 54 (2008) 328-330.
- [14] N.F. Leite, C.E. Sobral-Souza, R.S. Albuquerque, A.I. Pinho, F.A.B. Cunha, H.D.M. Coutinho, Reduction of the toxic effect of mercurium chloride by chelating effect of *Psidium brownianum* Mart. ex DC, *Int. Biodet. Biodeg*, 119 (2017) 538-541.
- [15] S. Shadomy, A. Espinel-Ingroff, R. Cartwright, Laboratory studies with antifungal agentes: susceptibility test and bioassay. In: Lennette, E.H., Ballows, A., Hausler, W.J. Jr. and Shadomy, H.J., (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 4 ed. Washington, American Society of Microbiology (1985)
- [16] H.D.M. Coutinho, G.M.A.B. Martins, M.F.B. Morais-Braga, I.R.A. Menezes, A.J.T. Machado, M.A. Freitas, A.T.L. Santos, M.S. Costa, F.F. Campina, A.R.P. Silva, L.F. Lima, N.F. Leite, S.R. Tintino, *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. As an Adjuvant for the Plant Germination and Development Under Toxic Concentrations of HgCl₂ and AlCl₃, *Water Air Soil Pollut*, 228 (2017) 424.
- [17] BRASIL - Ministério da Agricultura, Departamento de produção vegetal, divisão de sementes e mudas. Regras para análise de sementes. LANARV/SNAD/MA, Brasília. (2009)
- [18] L.L. Mensor, F.S. Menezes, G.G. Leitão, A.S. Reis, T.C. Santos, C.S. Coube, S.G. Leitão, Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother, Res.* 15 (2001) 127-130.

- [19] E.M.M. Nascimento, F.F.G. Rodrigues, W.D. Costa, A.A. Boligon, E.O. Sousa, F.F.G. Rodrigues, H.D.M. Coutinho, J.G.M. Costa, *In Vitro* Evaluation of Antioxidant Properties of Fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at Different Stages of Maturation, *Food Chem. Toxicol.* (2017)
- [20] R.L. Puntel, C.W. Nogueira, J.B.T Rocha, Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (tbars) production in rat brain in vitro, *Neurochem. Res.* 30 (2005) 225-235.
- [21] D.O. Santos, F.M. Sussuchi, Síntese e caracterização do complexo de Cobalto (III)-Quercetina, *Química Nova*, (2009) [online] Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1409-1.pdf>. Acesso em 23 de setembro de 2015.
- [22] W.A. Lopes, M. Fascio, Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho, *Química Nova* 7 (2004) 670-673.
- [23] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.
- [24] J. McMurry, *Química orgânica*. Tradução da 6ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2008.
- [25] C. E. Sobral-Souza, N. F. Leite, F. A. B. Cunha, A. I. Pinho, J. G. M. Costa, H. D. M. Coutinho, Evaluation of Cytoprotective and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium Sobraleanum* Proença & Landrum Against Heavy Metals, *Rev Cienc Salud*, 12 (2014) 401-409.
- [26] O. G. Rodrigues, E. C. Angélico, J. G. M. Costa, M. F. A. Lucena, V. Q. Neto, W. W. Silva, Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotropifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill: Resultados Preliminares, *Agropecuária Científica no Semiárido Centro de Saúde e Tecnologia Rural* (2017).

- [27] L.M. Vieira, C.F.S. Castro, A.L.B. Dias, A.R. Silva, Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae), *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, 17 (2015) 521-527.
- [28] F.A.B. Cunha, A.I. Pinho, J.F.S. Santos, C.E. Sobral-Souza, R.S. Albuquerque, E.F.F. Matias, N.F. Leite, S.R. Tintino, J.G.M. Costa, A.A. Bolignon, E.P. Waczuk, J.B.T. Rocha, T. Posser, H.D.M. Coutinho, L.J. Quintans-Junior, J.L. Franco, Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant Mercury chloride, *Arab. J. Chem.* (2016)
- [29] F.G. Figueredo, L.F. Lima, M.F.B. Morais-Braga, S.R. Tintino, P.A.M. Farias, E.F.F. Matias, J.G.M. Costa, I.R.A. Menezes, R.L.S. Pereira, H.D.M. Coutinho, Cytoprotective effect of *Lygodium venustum* Sw. (Lygodiaceae) against mercurium chloride toxicity, *Scientifica*, (2016) 1-5.
- [30] N.F. Leite, C.E. Sobral-Souza, E.F.F. Matias, L.B.B. Alencar, R.S. Albuquerque, M.F.B. Morais-Braga, E.O. Souza, H.D.M. Coutinho, Citoprotective effect of *Eugenia jambolana* and *Psidium myrsinites* DC. A. against the lipid peroxidation induced by iron II, *Acta. Toxicol. Argent*, 24 (2016) 187-192.
- [31] A.M. Fonseca, A.M.C. Bizerra, J.S.N. Souza, F.J.Q. Monte, M.C.F. Oliveira, M.C. Mattos, G.A. Cordel, R. Braz-Filho, T.L.G. Lemos, Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, 19 (2009) 193-198.
- [32] C. N. F. Lima, T. F. Valero, N. F. Leite, L. B. B. Alencar, E. F. F. Matias, M. R. Kerntopf, H. D. M. Coutinho, Ação protetora de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.)Saff. contra a toxicidade do cloreto de mercúrio em *Escherichia coli*, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19 (2014)179-188.
- [33] F.G. Figueredo, L.F. Lima, M.F.B. Morais-Braga, J.G. Figueredo, N.B. Pinto, E.F.F. Matias, I.R.A. Menezes, R.S. Almeida, F.A.B. Cunha, H.D.M. Coutinho, Potential assessment cytoprotective against toxic effect of chloride of mercury and antioxidant *Lygodium venustum* sw (lygodiaceae), *Rev. Interfaces*, 39 (2016) 44-49.

- [34] G.L.G. SOARES, Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. Grand Rapids) por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae, *Floresta e Ambiente*, 7 (2000)190-197.
- [35] J.C. Fernandez, F.S. Henriquez, Biochemical, physiological and structural effect of excess copper in plants, *Bot. Ver*, 57 (1991) 246–273.
- [36] L.C. Claire, D.C. Adriano, K.S. Sajwan, S.L. Abel, D.P. Thoma, J.T. Driver, Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species, *Water Air Soil Pollut*, 59 (1991) 231-240.
- [37] J. Barceló, C. Poschenrieder, Respuesta de las Plantas a la Contaminación por metales pesados, *Suelo y Plantas*, (1992) 345-361.
- [38] W. Jiang, D. Liu, X. Liu, Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*, *Biol. Plant* 44 (2001) 105-109.
- [39] J. Radha, S. Srivastava, S. Solomon, A.K. Shrivastava, A. Chandra, Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.), *Acta Physiol. Plant*, 32 (2010) 979-986.
- [40] D. Liu, W. Jiang, X. GaO, Effect of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic, *Biol. Plant*, 47 (2003) 79-83.

5.3 Resultado 3

Espectroscopia Infravermelha e atividade antioxidante do Pirogalol como alternativa na redução da toxicidade do Cloreto de Mercúrio

Autores: Janaina Esmeraldo Rocha, Tássia Thaís de Alencar Martins Guedes, Camila Fonseca Bezerra, Maria do Socorro Costa, Fabia Ferreira Campina, Thiago Sampaio de Freitas, Amanda Karine Sousa, Celestina Elba Sobral Souza, Maria Karollyna do Nascimento Silva, Yedda Maria Lobo Soares de Matos, Francisco Nascimento Pereira-Junior, João Hermínio da Silva, Irwin Rose Alencar Menezes, Raimundo Nonato Pereira Teixeira, Aracélio Viana Colares, Henrique Douglas Melo Coutinho.

Manuscrito será submetido para **Science of the Total Environment**

Qualis em Biodiversidade : A2 **Fator de Impacto :**4, 900

Situação: Em processo de tradução

Espectroscopia Infravermelha e atividade antioxidante do Pirogalol como alternativa na redução da toxicidade do Cloreto de Mercúrio

Janaina Esmeraldo Rocha, Tássia Thaís de Alencar Martins Guedes, Camila Fonseca Bezerra, Maria do Socorro Costa, Fabia Ferreira Campina, Thiago Sampaio de Freitas, Amanda Karine Sousa, Celestina Elba Sobral Souza, Maria Karollyna do Nascimento Silva, Yedda Maria Lobo Soares de Matos, Francisco Nascimento Pereira-Junior, João Hermínio da Silva, Irwin Rose Alencar Menezes, Raimundo Nonato Pereira Teixeira, Aracélio Viana Colares, Henrique Douglas Melo Coutinho.

RESUMO

As atividades realizadas pelo, principalmente na indústria, vêm contribuindo para o aumento da contaminação do solo com os metais pesados. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito quelante e atividade antioxidante do pirogalol, como também avaliar atividade citoprotetora do produto em modelo procarioto e eucarioto animal e vegetal, contra ação tóxica do cloreto de mercúrio. A atividade antioxidante foi determinada pelo DPPH, onde o pirogalol apresentou uma atividade considerável, conseguindo também quelar os íons ferro. Para atividade microbiológica, foi realizado o método de microdiluição, obtendo-se assim a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a partir da Concentração sub-inibitória, foi determinada a Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM) e (CFM) respectivamente. O produto em questão não conferiu citoproteção a bactéria e fungo utilizado no teste. Para avaliação da citoproteção em modelo vegetal, utilizou as sementes de *Lactuca sativa* e a concentração sub-alelopática do produto, com diferentes concentrações do HgCl₂. Neste teste podemos observar que o tanino conferiu uma citoproteção ao modelo vegetal, permitindo um melhor crescimento e desenvolvimento dos caulículos e radículas da planta, desta forma preservando tecidos necessários pra sobrevivência do vegetal. Diante destes resultados podemos perceber que o pirogalol apresenta atividade citoprotetora em modelo eucarioto vegetal, podendo atuar como uma alternativa para o crescimento de plantas em áreas contaminadas.

PALAVRAS-CHAVES: Pirogalol, citoproteção, metal pesado

1. INTRODUÇÃO

A expressão metal pesado, é empregado atualmente para designar metais que apresentam uma alta potencialidade tóxica adjunta à poluição (ANZECC; ARMCANZ, 2000). As ações humana contribuem para liberação desses metais na atmosfera (GRATÃO et al., 2005), como a indústria, mineração, dentre outras (BHARGAVA et al., 2012).

Entre os vários metais pesados existentes, podemos citar o Alumínio, Ferro, mercúrio (TSUTIVA, 1999), este último pode chegar a natureza tanto de forma natural como também artificial, como resultado da queima de combustíveis fósseis (BOENING, 2000; CARVALHO et al., 2001). Alguns metais são essenciais, mas quando em níveis altos, podem causar problemas a saúde dos seres vivos, resultando tanto num problema de saúde pública quanto ambiental (VALLE, 2012).

Os compostos fenólicos devido, por exemplo, a capacidade redutora, possui atividade antioxidante. Esta propriedade pode neutralizar os radicais livres e quelar metais de transição (HASLAM, 1996; SOARES, 2002). Dentre os compostos fenólicos, podemos citar o pirogalol que é um tanino, que possui fórmula química $C_6H_6O_3$ de origem sintética (MAZZEI, 2009).

A radiação infravermelha no espectro eletromagnético está inserida entre a região do visível e das microondas onde a faixa mais comumente utilizada está entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , a qual é nomeada de infravermelho médio. Através da energia fornecida pela radiação no infravermelho que corresponde cerca de 2 a 15 kcal, pode ocorrer interferência dos níveis de vibração de uma ligação química resultando em vibrações moleculares (SOLOMONS, 2009).

Mesmo o processo de absorção no infravermelho sendo quantizado, é possível observar no espectro uma série de bandas ao invés de linhas. Isto se deve ao fato que cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de modificações de níveis rotacionais, dessa forma as linhas se sobrepõem dando origem as bandas observadas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005). A espectroscopia infravermelha é uma importante ferramenta para a identificação de compostos (SETTLE, 1997).

Diante do exposto o objetivo do nosso trabalho é analisar a atividade citoprotetora do pirogalol frente à ação tóxica do cloreto de mercúrio, em modelo procarioto e eucarioto, tanto vegetal quanto animal. Também determinar a atividade antioxidante e quelante deste tanino.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Substâncias

O pirogalol foi adquirido da Sigma® (St. Louis, EUA). O cloreto de mercúrio foi adquirido da Vetec Química Fina LTDA.

2.2. *Microorganismos*

Os microorganismos utilizados foram a bactéria *Escherichia coli* 06 (EC 06) e o fungo *Candida albicans* 40006 (CA INCQS 40006), fornecido pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB e FIOCRUZ através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), respectivamente.

2.3. Espectroscopia de Transformação de Fourier-Infrared (FTIR)

Inicialmente, a solução de pirogalol foi preparada pesando 10 mg e diluindo-a em 1 mL de DMSO para se obter uma concentração de 10 µg / mL. A partir desta solução, um volume de 512 µL foi diluído em 4488 µL de DMSO, para obter uma concentração final de 1024 µg / mL. Adicionou-se também uma solução 10 mM de HgCl₂ pesando 2,35 mg de HgCl₂ e dilui-la em 1 mL de DMSO. Para obter uma concentração final de cloreto de mercúrio a 0,05 mM, uma alíquota de 25 µL da solução 10 mM de HgCl₂ foi retirada e diluída num tubo de ensaio contendo 1,25 mL da solução de tanino (1024 µg / mL) e 3,275 mL de DMSO, resultando em uma solução final de 5 mL. Enquanto isso, para obter uma concentração final de cloreto de mercúrio de 1,25 mM, uma alíquota de 625 µL da solução 10 mM de HgCl₂ foi retirada e diluída para um tubo de ensaio contendo 1,25 mL da solução de tanino (1024 µg / mL) e 3,25 mL de DMSO, resultando em uma solução final de 5 mL. As amostras foram então submetidas a radiação infravermelha usando um espectrômetro Bruker Vertex 70 combinado com um acessório atenuado de reflectância total (ATR) feito de Seleno de Zinco (ZnSe). A região espectral analisada variou de 200 a 4000 cm⁻¹ usando uma resolução de 1cm⁻¹. Todos os espectros foram processados usando o Software OriginPro.

2.4 *Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

A concentração inibitória mínima (CIM) do pirogalol foi avaliada por um ensaio de microdiluição de acordo com Coutinho et al. (2008), com modificações.

2.5 Avaliação do potencial citoprotetor em bactérias e fungos contra cloreto de mercúrio

Para a avaliação do efeito protetor do produto no cloreto de mercúrio, Eppendorfs contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e suspensões a 10^5 UFC / ml de *Escherichia coli* 06 (EC 06) e *Candida albicans* (CA 40006) foram preparados em meio BHI a 10%. Os ensaios foram realizados por microdiluição de acordo com Leite et al (2017). A concentração de metal variou de: 5 mM a 0,00244 mM para mercúrio. As placas de microdiluição foram incubadas durante 48 h a 37 ° C numa incubadora. Em seguida, as concentrações bactericidas mínimas (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada. Foram utilizadas placas de Petri com Agar Infusão de Coração (HIA) para transferir as soluções incubadas nas placas de microdiluição. Uma alíquota de cada poço da placa de microdiluição foi sub-cultivada em placas de HIA. Após 24 horas de incubação a 35 ± 2 °C. As leituras de CBM e CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles microbianos, considerando o CBM e o CFM a menor concentração do produto que inibiu o crescimento visível da subcultura (SHADOMY et al., 1985).

2.6 Teste de alelopatia do pirogalol em sementes de *Lactuca sativa* L.

Foram realizados testes piloto para determinar o efeito alelopático das amostras em estudo utilizando o método descrito por Sobral-Souza et al. (2014) e Coutinho et al., (2017). Os ensaios foram realizados em triplicado e expressos como significados.

2.7 Avaliação do efeito citoprotetor do pirogalol em um modelo de planta (*L. sativa*) contra cloreto de mercúrio

Para realizar o teste, utilizaram-se placas de Petri preparadas conforme relatado anteriormente. Quanto às concentrações utilizou-se uma concentração sub-alelopática do pirogalol (32 µg / mL) e do Cloreto de Mercurio (HgCl₂), variando de 1.25mM a 0.01mM, de acordo com Coutinho et al. (2017). Os parâmetros analisados no final dos sete dias foram: contagem de sementes germinadas, índice de taxa de germinação (GRI), biometria radicular e radicular, ocorrência de necrose radicular e anormalidades de plântulas, seguindo o Manual de Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os testes foram feitos em triplicado e expressados como significativos.

2.8 Ensaio antioxidante DPPH

O potencial antioxidante do pirogalol foi avaliado usando o método fotocolorimétrico in vitro do radical livre de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) descrito por Mensor et al. (2001) e Nascimento et al. (2017). Neste ensaio, foram adicionados 300 µL da amostra de pirogalol (250 a 5 µg / mL) em 1500 µL de DPPH (0,3 mM) e 1200 µL de etanol P.A. Todas as leituras foram realizadas em triplicado, e com os dados médios obtidos, calculou-se a diferença de absorvância entre as amostras e o controle negativo, e a porcentagem de atividades antioxidantes (AA) obtidas por regressão linear para cada fase, obtendo assim a concentração da amostra que promove a redução para metade da redução de 50% da concentração inicial de DPPH, respectivamente, conforme definido Concentração Efetiva (EC50).

2.9 Fe²⁺ e Fe³⁺ efeito quelante

A capacidade do pirogalol para quelar Fe (II) e a capacidade de quelar Fe (III) foram determinados de acordo com o método de Puntel et al. (2005).

2.10 Análise estatística

Os dados dos microrganismos são apresentados como a média geométrica ± SEM de três repetições. A análise estatística do teste utilizou uma ANOVA de dois sentidos seguida de teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,0001$. Todos os outros resultados foram apresentados utilizando a média aritmética ± SEM de três repetições com ANOVA de dois sentidos, seguido de teste pós-hoc de Tukey com $p < 0,0001$.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

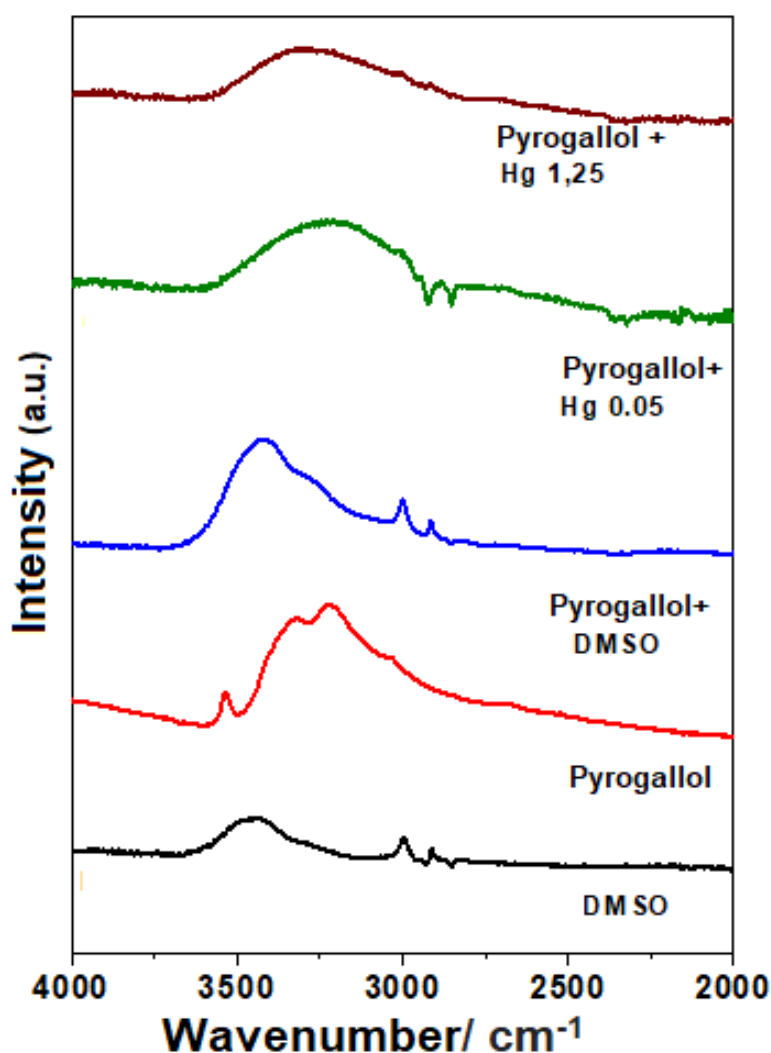
3.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 1 mostra o espectro de absorção do Pirogalol onde a região situada entre 3100- 3650 cm⁻¹ apresenta um pico intenso em 3420 cm⁻¹ característico do estiramento O-H causado pelas pontes de hidrogênio intra e intermolecular presentes no composto (DEGUCHI, 2014). Nota-se que com a adição do metal em ambas as concentrações, há uma significativa

redução na intensidade desta banda. O desaparecimento da banda típica de estiramento O-H sugere que o grupo hidroxila pode estar coordenado ao metal em questão.

Os resultados assemelham-se com os dados obtidos por Verza (2006) onde os picos característicos apresentados pelo Pirogalol encontravam-se em 3400 cm^{-1} representado pela deformação axial de C-H aromático, 1900 e 1700 cm^{-1} bandas características de um anel trissubstituído; 1620 e 1520 cm^{-1} características da deformação axial C=C de anel aromático; deformação angular de O-H e axial de C-O em 1390 e 1180 cm^{-1} respectivamente.

Figura 1. Espectro de IV do DMSO, Pirogalol puro, Pirogalol + DMSO e Pirogalol complexado ao cloreto de mercúrio $1,25\text{ mM}$ e $0,05\text{ mM}$ na região entre 4000 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} .

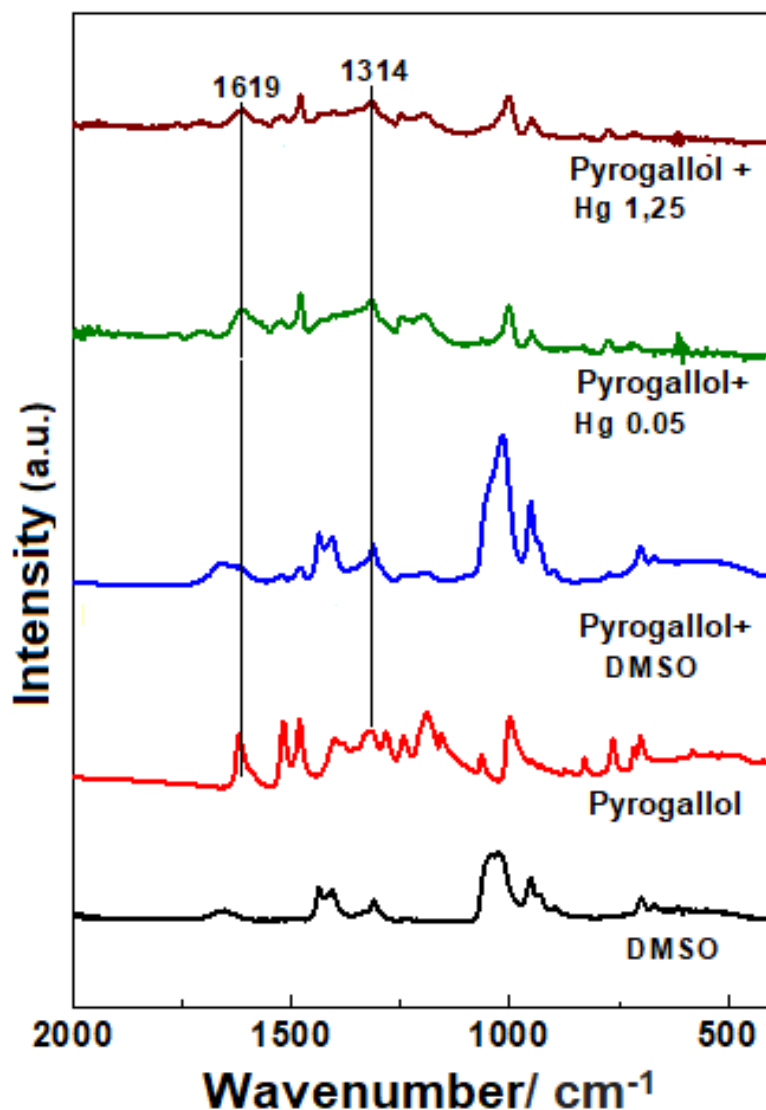


Na região entre 2000-200 cm^{-1} (Figura 2) destaca-se uma redução significativa na intensidade do pico 1015 cm^{-1} que representa o estiramento C-O. A alteração na banda de estiramento C-O (1314 cm^{-1}) é observada quando há coordenação no grupo orto-fenólico (O-H) (BUKHARI et al, 2009; SOUZA & GIOVANI, 2005).

O pico na região de 1662 cm^{-1} , como ilustrado na Figura 2, pode ser característico da presença de água absorvida devido à formação angular (HOH) enquanto que a banda 1619 cm^{-1} relaciona-se a contribuições das ligações C=C, incluindo as do anel aromático presente na estrutura do Pirogalol.

Mohammed-Ziegler & Billes (2002) estudaram também as frequências do Pirogalol através do infravermelho, destacando os picos em 3432 cm^{-1} nas frequências medidas e calculadas respectivamente, onde ambas correspondem ao estiramento O-H. As bandas que ocorrem em aproximadamente 914 e 910 cm^{-1} correspondem ao bending fora do plano C-H; enquanto as bandas na região de 1000 e 1985 cm^{-1} representam o estiramento C-C.

Figura 2. Espectro de IV do DMSO, Pirogalol puro, Pirogalol + DMSO e Pirogalol complexado ao cloreto de mercúrio 1,25 mM e 0,05 mM na região entre 2000 cm^{-1} a 200 cm^{-1} .



Biscarini e Nivellini (1969) ao analisarem compostos adicionais de sulfidras orgânicas mostraram que o coreto de mercúrio (HgCl_2) apresenta absorção entre a região de 200- 200 cm^{-1} que é geralmente representada pela aparição de um dubleto.

Visando elucidar a interação de outras classes de compostos fenólicos, diversos autores estudaram este mecanismos através da espectroscopia de infravermelho.

Falcão e Araújo (2012) caracterizaram as principais bandas dos taninos hidrolisáveis e condensados onde a presença destas na região de 1615 a 1606 cm^{-1} e 1452 a 1446 cm^{-1} são características de vibrações de estiramento do anel aromático junto com 1518 a 1507 cm^{-1} atribuídas às vibrações no esqueleto do anel. Em relação ao estiramento C-O, este é caracterizado pela presença de bandas na região entre 1211- 1196 e 1043- 1030 cm^{-1} .

Decandio & Alexiou (2011) ao estudar o flavonoide 5- hidroxiflavona, enquadrado em outra classe de compostos fenólicos, observou que em seus espectros de IV havia uma mudança na posição das bandas do estiramento C=O o qual passava de 1655 cm^{-1} no flavonoide livre para 1633 cm^{-1} e 1626 cm^{-1} no flavonóide complexado ao Crômio (III). Hiraki e colaboradores (1978) já haviam observado o deslocamento dessas bandas ao estudar a complexação da 5- hidroxiflavona com outros metais.

Como ilustrado anteriormente na Figura 2, houve uma diminuição na intensidade dos picos presentes no infravermelho do Pirogalol nas faixas de 950 e 1015 cm^{-1} o que poderia indicar uma interação deste tanino com o HgCl_2 através de ligações de hidrogênio.

Já se sabe que outra classe de compostos fenólicos, os flavonoides, possuem diversos mecanismos que auxiliam na sua atividade antioxidante como, por exemplo, a captura de espécies reativas de oxigênio, inibição de enzimas que originam ânion superóxido além de sua capacidade de quelar metais de transição (BIESAGA, 2011). Essa interação metal- flavonoide produz complexos que impedem a participação desses íons nas reações que levam a produção de radicais livres (LANGE; PIERPONT, 1994).

Araújo (2008) estudou a interação de complexos de rutênio e ligantes fenólicos no IV, demonstrando que a banda de estiramento $\nu(\text{C-O})$ do complexo sofre um deslocamento quando comparamos esta ao espectro da 3-hidroxiflavona livre (de 1214 cm^{-1} para 1208 cm^{-1}) indicando uma possível coordenação do metal ao oxigênio da ligação C=O.

Decandio e Alexiou (2011) a fim de avaliar a possível coordenação do complexo Crômio (II)-5-hidroxiflavona, comparou o espectro obtido através deste complexo ao espectro da 5-hidroxiflavona livre. Notou-se que também havia uma notável modificação principalmente na vibração de estiramento C=O qual mudava de 1665 cm^{-1} , quando o flavonoide encontrava-se na forma livre, para 1653 e 1626 cm^{-1} quando o mesmo encontrava-se complexado ao metal.

3.2 Efeito quelante de Fe^{2+} e Fe^{3+} e teste de redução de ferro antioxidante (DPPH)

Os valores para o efeito quelante (IC50) e DPPH (EC50) foram medidos na Tabela 1

Tabela 1. Valores da redução do íon férrico, quelação de metal e antioxidante ativista.

	EC50 (DPPH) (mmol/g)	IC50(Fe²⁺) (µg/g of sample)	IC50(Fe³⁺) (µg/g of sample)
Ac. Asc	1,61 ±1,64	35,9000	16,38±1,00
Pyrogallol	2,92 ± 1,04	2,0700	17,06 ±1,20

De acordo com a Tabela 1 podemos observar que o pirogallol apresenta tanta uma atividade antioxidante, conseguindo reduzir o radical DPPH, com valores aproximados ao do controle, como também apresenta uma considerável atividade quelante, conseguindo ser bem mais eficaz que o controle que é o ácido ascórbico em Fe²⁺.

Antioxidantes são aquelas substâncias que estão presentes em níveis baixos, quando elas são comparadas ao substrato. Elas tem como propriedade dificultar ou atrasar ou até mesmo inibir a oxidação do substrato (ATOUI et al., 2005; VALKO et al., 2004). Diversos estudos realizados com compostos fenólicos e também com flavanóides, demonstram a capacidade de capturação de radicais livres, resultando por exemplo, na prevenção de doenças cardiovasculares (NESS & POWLES, 1997; STOCLET et al., 2004).

Pode-se dizer que a eficácia de um antioxidante vai depender da capacidade que ele tem em sequestrar estes radicais livres (SHARMA & SINGH, 2013). A transferência dos hidrogênios neutraliza a ação dos radicais livres, os compostos fenólicos são responsáveis por isso (BREWER, 2011).

Vários trabalhos na literatura demonstram a atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Como o de Paula et al (2015), Macedo et al (2013), Rodrigues et al (2017), Vieira et al (2015), Leite et al (2016), Costa et al (2017), dentre outros.

3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Fig.3. Concentrações bactericidas do cloreto de mercúrio e associadas ao pirogallol

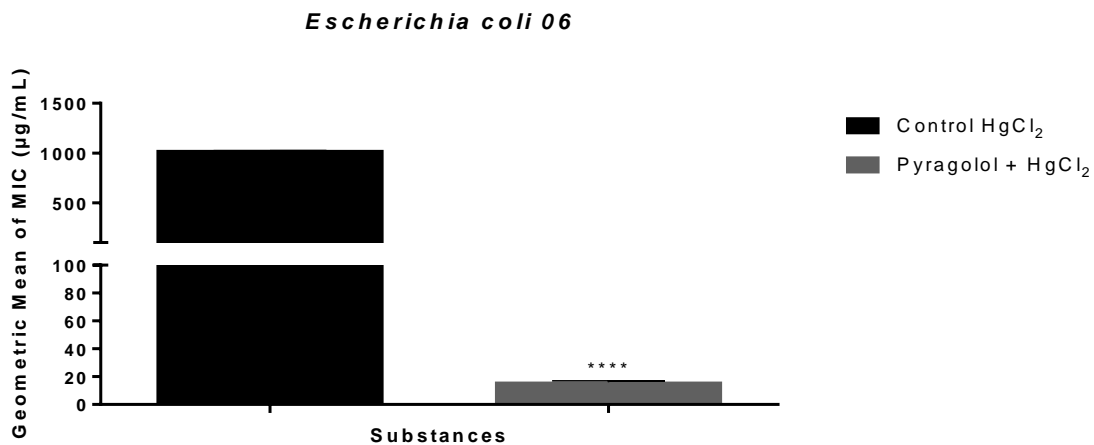
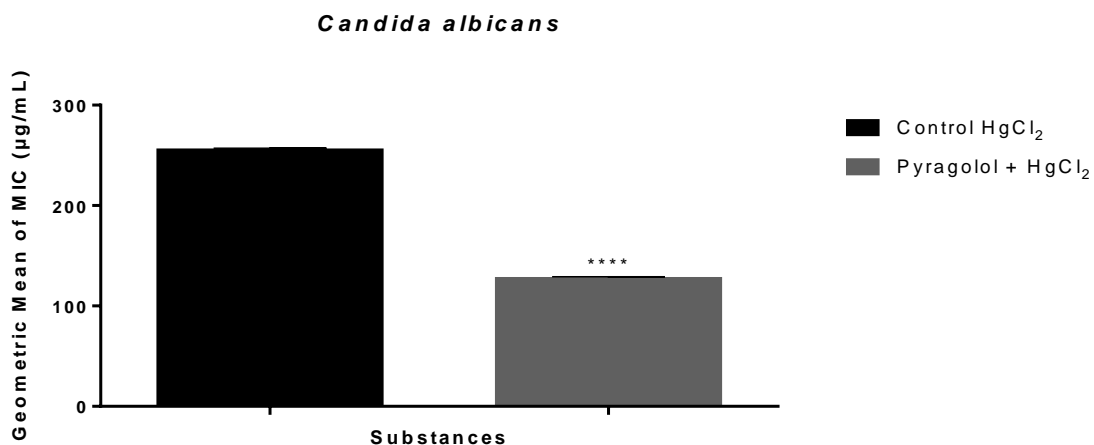


Fig. 4. Concentrações fungicidas do choroeto de Mercúrio sozinho e associadas ao pirogalol



Podemos observar de acordo com a figura 3 e a figura 4, que o tanino utilizado no ensaio não conferiu citoproteção, nem ao modelo procariótico nem ao eucariótico animal, isto pode ser evidenciado devido ao maior número de mortes dos microrganismos com uma concentração menor quando associa-se o pirogalol com o cloreto de mercúrio, do que quando utilizado somente o metal pesado. Desta forma observa-se um sinergismo ao uso concomitante dos dois produtos juntos.

Para o modelo procariótico resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Leite et al. (2014), Sobral-Souza et al. (2014b), Leite et al. (2016) utilizando como metal pesado o ferro e Lima et al. (2014) utilizando o cloreto de mercúrio com a fração hexânica. Já os resultados de Sobral-Souza et al. (2014a), Cunha et al. (2016), Figueredo et al. (2016b), Leite et al. (2017) e Lima et al. (2014) para as outras frações, discordaram com o presente

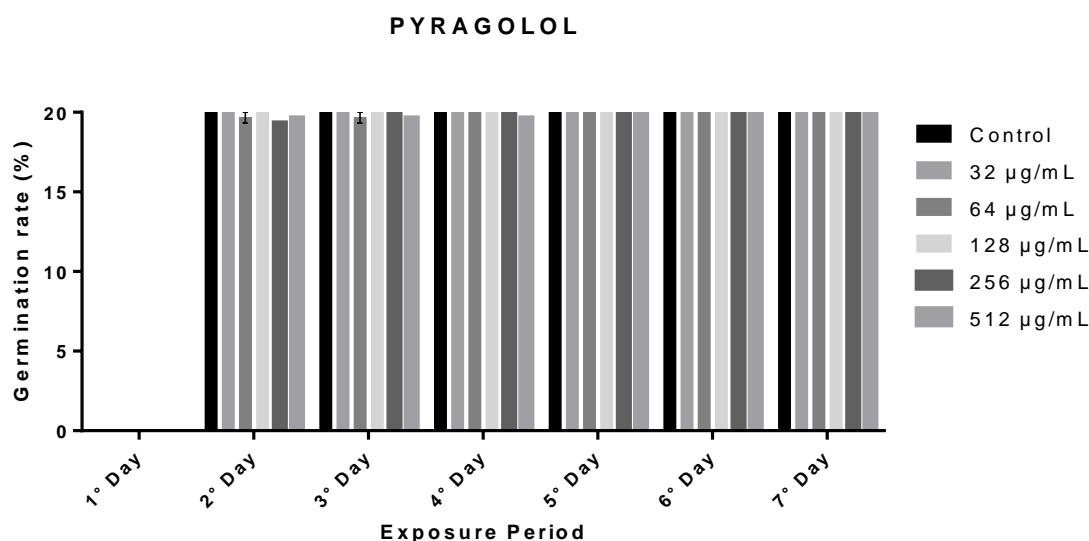
estudo, uma vez que foi conferida a citoproteção a bactéria contra ação tóxica do metal pesado.

Para o modelo eucarioto animal nossos resultados diferem com o de Figueiredo et al. (2016a) utilizando a *Candida krusei* 06, onde no estudo do mesmo houve uma citoproteção ao modelo fúngico. Já os resultados de Leite et al. (2014), Leite et al. (2016) e Sobral-Souza et al. (2014b) corroboram com os nossos resultados, uma vez que não houve uma citoproteção.

Os resultados divergentes entre o presente estudo e o de alguns autores acima citados, pode ser explicado pelo fato deles utilizarem extratos em seus testes, estes são substâncias complexas, que podem ou não ter o tanino em questão, mas além disso possuem um gama de outras substâncias que podem ter contribuído para o resultado de citoproteção.

3.4 Efeito alelopático em sementes de alface

Fig. 5. Avaliação do efeito alelopático de *Lactuca sativa* em diferentes concentrações de pirogalol

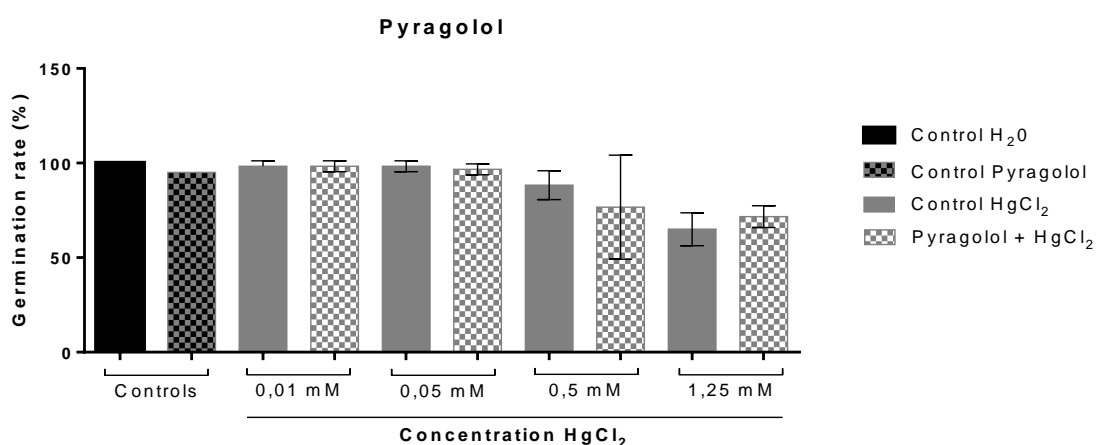


A alelopatia, dentre várias outras definições, é um processo pelo qual os resultados do metabolismo secundário dos vegetais, são liberados e evitam a germinação, como também o desenvolvimento de outros vegetais próximos a ela (SOARES; VIEIRA, 2000). Nesta figura podemos observar que a concentração alelopática do pirogalol é superior a 512µg/mL, podendo desta forma qualquer concentração acima citada (fig 5), ser utilizada no teste de citoproteção do modelo vegetal. Porém numa análise visual, aquela que melhor demonstrou

um maior e melhor crescimento de caulículos e radículas foi a de 32 $\mu\text{g/mL}$, sendo por isto a escolhida para os demais testes.

3.5 Velocidade de Germinação

Fig.6. Velocidade de germinação das sementes de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com água, pirogalol, diferentes concentrações de cloreto de mercúrio e da associação destes com a substância isolada.

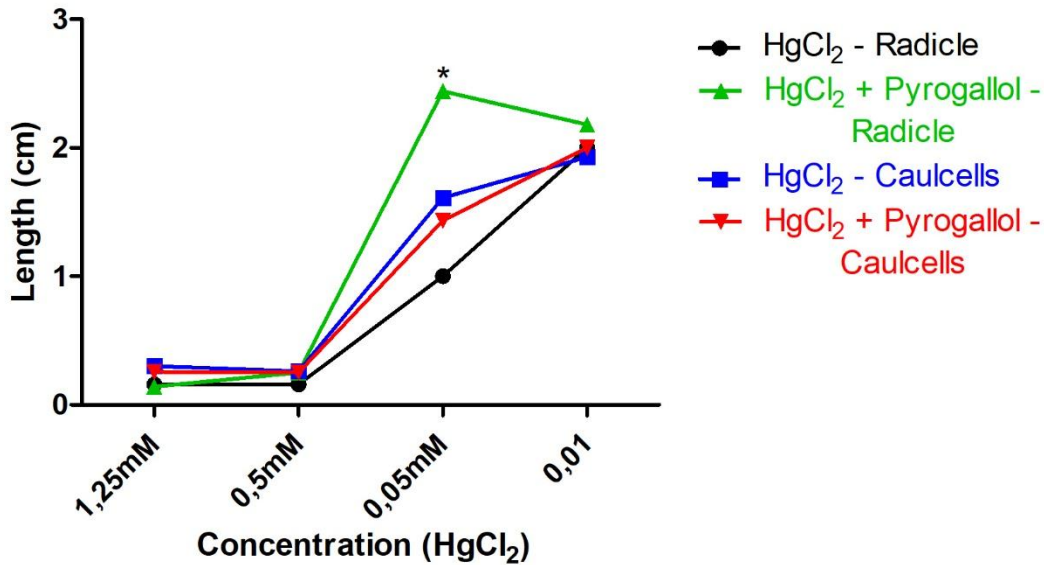


Neste teste podemos observar a velocidade com que as sementes de alfaces germinaram em um período de sete dias, submetidas a diferentes tratamentos. Tem aquelas que foram submetidas apenas ao tratamento com água destilada, apenas com o pirogalol, com diferentes concentrações do cloreto de mercúrio, como também da associação destas diferentes concentrações com o tanino na concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$.

Podemos observar que não houve diferenças entre os resultados. Porém na maior concentração (1,25mM), as sementes de alface tiveram uma velocidade de germinação maior quando foram associadas ao pirogalol (mesmo que não tenha sido estatisticamente significativa). E na concentração de (0,5 mM) mesmo as sementes germinando um pouco mais sem o produto, este ainda conferiu um crescimento quando associado maior que 50%. O fato das sementes germinarem mesmo na presença do metal pesado é explicado devido alguns vegetais usarem estes metais pesados em seu metabolismo, porém em pequenas concentrações, pois em altas eles podem causar mutações (RASCIO & NAVARI-IZZO, 2011).

3.6 Efeito citoprotetivo sobre sementes de alface contra HgCl₂

Fig.7- Medição de caulículo e radículo de *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com cloreto de mercúrio na maior e menor concentração testada, e a associação deste com o pyrogallol

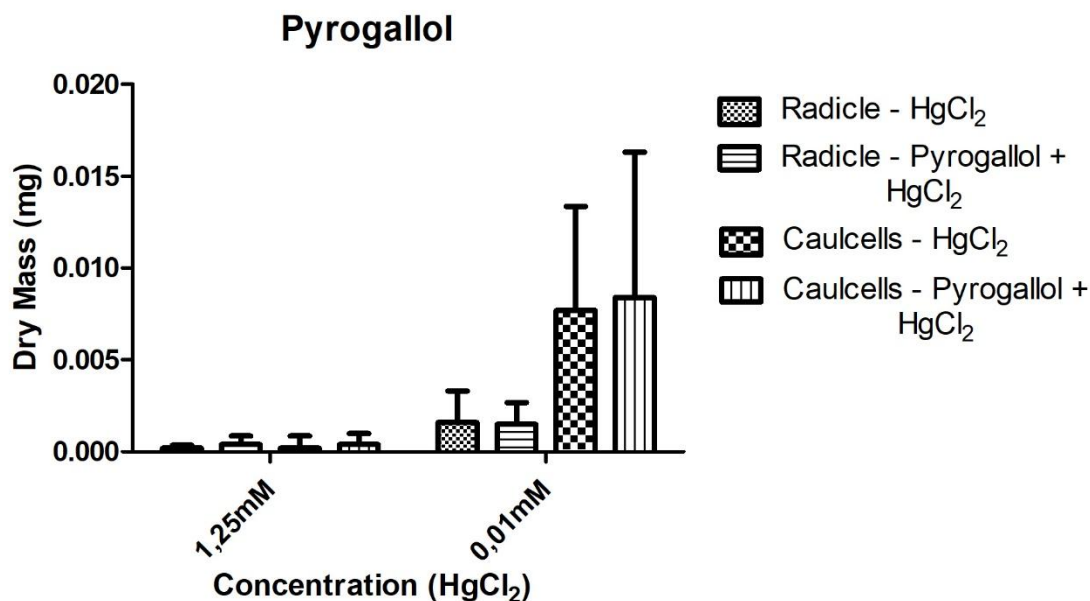


Nesta figura podemos observar que quando as sementes de alface receberam o tratamento com o pirogalol em associação as diferentes concentrações do cloreto de mercúrio, isto possibilitou um melhor crescimento das radículas. Demonstrando desta forma que o produto utilizado no estudo conferiu uma citoproteção, mesmo sendo as raízes a parte da planta envolvida com a absorção do metal, desta forma sendo o local que apresenta uma maior quantidade dele (GRANT et al.,1998).

Nos trabalhos de Sobral-Souza et al (2014a), Cunha et al. (2016) e Leite et al (2017), seus extratos também conferiram citoproteção as sementes de *Lactuca sativa*, desta forma permitindo um melhor desenvolvimento dos caulículos e radículas. No primeiro utilizando o extrato de *Eugenia jambolana*, o segundo de *Eugenia uniflora* e o terceiro de *Duguetia furfuracea*, ambos possuem em sua constituição compostos fenólicos.

3.7 Massa seca de caulículos e radiculos

Fig. 8. Massa seca das semente de *Lactuta sativa* submetidas ao tratamento com a maior e menor concentração de cloreto de mercúrio, e da associação destes com o pirogalol



Nesta figura podemos notar que nas concentrações de metais testadas, quando se analisa o teor de massa seca, pode-se perceber que mesmo não tendo um resultado estatisticamente significativo, há uma redução da massa seca nessas concentrações. Desta forma mostrando que a presença de metal pesado nas sementes, não somente prejudica seu crescimento como também seu desenvolvimento. Podemos observar que quando adicionado o pirogalol há um melhor desenvolvimento (mesmo que não seja estatisticamente relevante), desta forma protegendo os tecidos vegetais, essenciais para o melhor desenvolvimento da planta. O cloreto de mercúrio causa problemas a membrana celular, atrapalhando também o transporte através dela (SOUZA e BARBOSA, 2000).

4. CONCLUSÃO

O pirogalol não conferiu citoproteção para a bactéria e fungo utilizados como modelo neste estudo, contra ação tóxica do cloreto de mercúrio. Porém, causou uma citoproteção ao modelo vegetal, *Lactuca sativa*, desta forma permitindo que houvesse um melhor crescimento e desenvolvimento dos caulículos e radículas em determinadas concentrações. Também pode ser observado que a substância em questão apresenta atividade tanto oxidante como quelante de ferro, podendo ser devido a isso a citoproteção no modelo vegetal. Esses resultados além

de inovadores se tornam importantes na busca de alternativas para descontaminação de ambientes contaminados por tal metal pesado.

REFERÊNCIAS

ANZECC/ARMCANZ. 2016. **Australian Guidelines for Water Quality Monitoring and Reporting. October.**

Araújo, A.S.2008. **Síntese e caracterização de complexos com rutênio com ligantes fenólicos.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Química)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

Atoui, A. K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P.. 2005. *Food Chem.* 89, 27;

Bhargava, A., Carmona, F. F, Bhargava, M., & Srivastava, S. 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 105, 103-120.

Biesaga, M. 2011. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography**, v. 1218(18), p.2505-2512. *Biochem.* 266, 37

Biscarini, P.; Nivellini, G.D. 1969. Addition compounds of organic sulphides with mercuric chlorid Infrared Spectra in the Solid State. **Journal of the Chemical Society**, p. 2206-2210.

Boening, D. W. 2000. Ecological Effects, Transport and Fate of Mercury: a General Review. *Chemosphere*, v.40, p. 1335-1351.

BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, Departamento de produção vegetal, divisão de sementes e mudas. Regras para análise de sementes. LANARV/SNAD/MA, Brasília.

Brewer, M.S. 2011. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, p.221- 247.

Bukhari S. B.; Memon, S.; Mahroof-Tahir, M.; Bhangar, M. I. 2009. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper-querctin complex. *Spectr Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.7, p.1901–1906.

Carvalho, C. E. V., Cavalcante, M. P. O., Gomes, M. P., Faria, V. V., Rezende, C. E. 2001. Distribuição de Metais Pesados em Mexilhões (Perna) da Ilha de Santana, Macaé, SE, Brasil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 4, n. 1.

Costa, K.A.D., Ferez, M., Silveira, S.M., Moura, R., Mollezi, A.F. 2017. antifungal agentes: susceptibility test and bioassay. In: Lennette, E.H., Ballows, A., Hausler, W.J. Jr. and Shadomy, H.J., (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*. 4 ed. Washington, American Society of Microbiology.

Coutinho, H.D.M, Martins, G.M.A.B., Morais-Braga, M.F.B., Menezes, I.R.A., Machado, A.J.T., Freitas, M.A., Santos, A.T.L., Costa, M.S., Campina, F.F., Silva, A.R.P., Lima, L.F., Leite, N.F., Tintino, S.R. 2017. *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. As an Adjuvant for the Plant Germination and Development Under Toxic Concentrations of HgCl₂ and AlCl₃, *Water Air Soil Pollut*, 228, 424.

Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira Jr, J.P. 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* and chlorpromazine, *Chemotherapy*, 54, 328-330.

Cunha, F.A.B., Pinho, A.I., Santos, J.F.S., Sobral-Souza, C.E., Albuquerque, R.S., Matias, E.F.F., Leite, N.F., Tintino, S.R., Costa, J.G.M., Bolignon, A.A., Waczuk, E.P., Rocha, J.B.T., Posser, T., Coutinho, H.D.M., Quintans-Junior, L.J., Franco, J.L. 2016. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant Mercury chloride, *Arab. J. Chem.*

Decandio, C. C.; Silva, D. D. E.; Costa, M. R. L.; Gomes, C. F.; Ferreira, M. J. P.; Romoff, P.; Alexiou, A. D. P. 2010. **Síntese e caracterização de um complexo de crômio(III) com 3,7-diidroxiflavona**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 33. Águas de Lindóia. Anais Águas de Lindóia, 2010. Disponível em : < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T1644-1.pdf>>.

Deguchi, T.G.F.2006. **Estudo do equilíbrio químico de compostos modelo de taninos com íons metálicos para o tratamento de efluentes industriais.** 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos materiais)- PIPE, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Cymbopogon flexuosus* contra *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* Revista CSBEA – v. 3, n. 1

Falcão, L; Araújo, M.E. M. 2012. Tannins characterization in historic leathers by complementary analytical techniques ATR-FTIR, UV and chemical tests. **Journal of Cultural Heritage**, v. 14, p. 499-508.

Figueredo, F.G., Lima, L.F., Morais-Braga, M.F.B., Figueredo, J.G., Pinto, N.B., Matias, E.F.F., Menezes, I.R.A., Almeida, R.S., Cunha, F.A.B., Coutinho, H.D.M. 2016a. Potential assessment cytoprotective against toxic effect of chloride of mercury and antioxidant *Lygodium venustum* sw (lygodiaceae), Rev. Interfaces, 39, 44-49.

Figueredo, F.G., Lima, L.F., Morais-Braga, M.F.B., Tintino, S.R., Farias, P.A.M. , Matias, E.F.F., Costa, J.G.M., Menezes, I.R.A., Pereira, R.L.S., Coutinho, H.D.M. 2016b. Cytoprotective effect of *Lygodium venustum* Sw. (Lygodiaceae) against mercurium chloride toxicity, Scientifica, 1-5.

Grant, C.A., Buckley, W.T., Bailey, L.D., Selles, F., 1998. Cadmium accumulation in crops. Canadian Journal of Plant Science. 78, 1-17.

Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A. 2015. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Funct. Plant Biol. 32, 481-494

Haslam, E. 1996. **J. Nat. Prod.** 59, 205.

Lange, C.W.; Conklin, B.J.; Pierpont, C.G. 1994. Radical superexchange in semiquinone complexes containing diamagnetic metal íons, 3,6-Di-tert-butyl-1,2-semiquinoate Complexes

of Zinc (II), Cobalt (III), Gallium (III) and Aluminium (III). **Inorganic Chemical**, v.33, p. 1276-1283.

Leite, N.F., Sobral-Souza, C.E., Albuquerque, R.S., Pinho, A.I., Cunha, F.B.A, Coutinho, H.D.M. 2017. Reduction of the toxic effect of mercurium chloride by chelating effect of *Psidium brownianum* Mart. ex DC, *Int. Biodet. Biodeg*, 119, 538-541.

Leite, N.F., Sobral-Souza, C.E., Lavor, A.K.L.S., Brito, D.I.V., Figuerede, F.F., Ferreira, J.V.A., Menezes, I.R.A., Coutinho, H.D.M. 2014. Composição fenólica e avaliação da atividade citoprotetora dos extratos de *Psidium guajava* L. var. *pyrifera* e *Psidium guajava* L. var. *pomífera*. *Caderno de Cultura e Ciências*, Universidade regional do Cariri.

Leite, N.F., Sobral-Souza, C.E., Matias, E.F.F., Alencar, L.B.B., Albuquerque, R.S., Morais-Braga, M.F.B., Souza, E.O., Coutinho, H.D.M. 2016. Citoprotective effect of *Eugenia jambolana* and *Psidium myrsinites* DC. A. against the lipid peroxidation induced by iron II, *Acta. Toxicol. Argent*, 24, 187-192.

Lima, C. N. F., Valero, T. F., Leite, N. F., Alencar, L. B. B., Matias, E. F. F., Kerntopf, M. R., Coutinho, H. D. M. 2014. Ação protetora de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. contra a toxicidade do cloreto de mercúrio em *Escherichia coli*, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19, 179-188.

Macedo, J.M., Souza, L.G.P., Valenzuela, V.C.T., Oliveira, A., Castilho, R.O., Jácome, R.L.R.P. 2013. Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*;34(4):585-590

Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S., Leitão, C.G. 2001. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother, Res.* 15, 127-130.

Mohammed- Ziegler, I.; Billes, F. 2002. Vibrational Spectroscopic calculations on pyrogallol and gallic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 618, p. 259- 265.

Nascimento, E.M.M., Rodrigues, E.M.M., Costa, W.D., Boligon, A.A., Sousa, E.O., Rodrigues, F.F.G., Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M. 2017. *In Vitro* Evaluation of Antioxidant Properties of Fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at Different Stages of Maturation, Food Chem. Toxicol.

Ness, A.R.; Powles, J.W. 1997. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. **Int J Epidemiol**, v.26, n.1, p.1-13.

Paula, R.A.O., Santos, E.S., Pinto, L.F., Paula, F.B.A., Rodrigues, M.R., Salles, B.C.C., Duarte, S.M.S. 2015. Determinação da atividade antioxidante in vitro das bebidas de café e chás verde e preto. *Revista Ciênc Farm Básica Apl.* 36 (2), 167-171.

Puntel, R.L., Nogueira, C.W., Rocha, G.B.T. 2005. Krebs cycle intermediates modulate Rascio, N., e Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180, 169-181. Res. 30, 225-235.

Rodrigues, O. G., Angélico, E. C., Costa, J. G. M., Lucena, M. F. A., Neto, V. Q., Silva, W. W. 2017. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotropifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill: Resultados Preliminares, Agropecuária Científica no Semiárido Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

Settle, F.A. 1997. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.**

Shadomy, S., Espinel-Ingroff, A., Cartwright, R. 1985. Laboratory studies with

Sharma, P.; Singh, R.P. 2013. Evaluation of antioxidant activity in Foods with special reference to TEAC method. **American Journal of Food Technology**, v.8, p.83- 101.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. 2005. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 7th ed. New York.

Soares, G.L.G.; Vieira, T.R. 2000. Inibição da germinação e do crescimento radicular de alface (cv. "Grand Rapids") por extratos aquosos de cinco espécies de Gleicheniaceae. **Revista Floresta e Ambiente**, v.7, n.1, p.180-97.

Soares, S. E.. 2002. **Rev. Nutr.** 15, 71

Sobral-Souza, C.E., Leite, N.D., Cunha, F.A.B., Pinho, A.I., Albuquerque, R.S., Carneiro, J.N.P., Menezes, I.R.A., Costa, J.G.M., Franco, J.L., Coutinho, H.D.M. 2014a . Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam, *Arabian Journal of Chemistry*, 7, 165–170.

Sobral-Souza, C.E., Leite, N.F., Cunha, F.A.B., Pinho, A.I., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M. 2014b. Evaluation of Cytoprotective and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium Sobrleanum* Proença & Landrum Against Heavy Metals, *Rev Cienc Salud*, 12, 401-409.

Solomons, T.W., Graham, F, Craig, B. 2009. **Química orgânica**, 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 71-81.

Souza, J.R., Barbosa, A.C., 2000. Contaminação por mercúrio e o caso da Amazônia. *Química Nova na Escola*. 12.

Souza, R.F.V. Giovani, W.F. 2005. Syntesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.61, p.1985-1990.

Stoclet, J.C. et al. **2004**. Vascular protection by dietary polyphenols. **Eur J Pharm**, v.500, p.299-313.

thiobarbituric acid reactive species (tbars) production in rat braian in vitro, *Neurochem*.

Tsutiya, M.T. 1999. Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgotos. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. p.753-761.

Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J.; Telser, J. 2004. *Mol. Cell.*

Valle, L.A.R.2012. Avaliação de elementos-traço em fertilizantes e corretivos. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência do Solo - Área de concentração em Recursos Ambientais e Uso da Terra) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Verza, S.G., 2006. Avaliação das variáveis analíticas de métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias proteicas e derivados da polivinilpirrolidona. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Vieira, L.M., Castro, C.F.S., Dias, A.L.B., Silva, A.R. 2015. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae), *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, 17, 521-527.

CONCLUSAO

5 CONCLUSÃO

- O ácido gálico, ácido caféico e pirogálico, apresentaram atividade antioxidante, conseguindo reduzir o radical DPPH e também foram capazes de quelar os íons Ferro;
- O ácido gálico conferiu citoproteção ao modelo fungico usado no teste;
- O ácido gálico não conferiu citoproteção ao modelo bacteriano, assim como também os outros dois taninos não conferiu nem ao modelo fúngico nem ao modelo bacteriano;
- Todos os taninos utilizados no ensaio, conferiu citoproteção ao modelo vegetal de *Lactuca sativa*, permitindo um alongamento dos seus caulículos e radículas, como também permitindo um melhor desenvolvimento dessas estruturas;
- Esses dados são importantes, uma vez que servem, como alternativa, para crescimento de vegetais em solos contaminados por metais pesados;

REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G.O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **J Food Sci Technol.** v. 35, n.4, p, 283-398,1998.
- ALKAN, D. et al. Development of flexible antimicrobial packaging materials against *Campylobacter jejuni* by incorporation of gallic acid into zein-based films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59 n. 20, 2011.
- ALVES, L.A., et al. Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology. **Acta Odontol. Scand**, 2013.
- ANDRADE JR, R. G.et al. Tannic acid inhibits in vitro iron-dependent free radical formation. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 9, p. 1287-1296, 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007
- ATOUI, A. K. et al.. **Food Chem.** V. 89, n. 27, 2005.
- AZEVEDO, F.A. Exposição humana ao mercúrio: bases para a vigilância. **TECBAHIA R. Baiana Tecnol.** v. 9, n.1, p. 87-99, 1994.
- BAIRD, C. **Química Ambiental.** 622p./ Colin Baird; trad. Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera. 2ª. Ed. – Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BEZERRA, D. A. C.et al. Abordagem itoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth)Ducke. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n.1, p. 99-106, 2011.
- BHARGAVA, A., et al. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Journal of Environmental Management**, 105, p. 103-120, 2012.
- BORBA, C.E. et al.. Prediction of the copper (II) ions dynamic removal from a medium by using mathematical models with analytical solution. **J. Hazard. Mater.**, v. 152, p. 366-372, 2008.
- BRASIL. ANVISA -Agência Nacional deVigilânciaSanitária. **Resolução 383.** Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 7-Produtos de Panificação e Biscoitos, 1999.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº. 357: **Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento,**

bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e outras providências. Brasília, mar. 2005.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Res. Int.**, v. 40, p. 393-405, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Departamento de Produção Vegetal. Divisão de Sementes e Mudanças. **Regras para análise de sementes.** LANARV/SNAD/MA, Brasília, 188, 2009.

BREGER, J et al., Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathogens**, v.3, n.2, p. 168-178, 2007.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica e de farmacognosia.** Zaragoza: Acribia, 1991. 594 p.

CABRITA, M.J., et al. Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. **Talanta** 74, 1281–1286, 2008.

CARVALHO, M. Z.; **Abordagem multivariada do comportamento das propriedades físico-químicas e caracterização de adesivos naturais à base de Taninos.** Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós- Graduação em Agroquímica, Minas Gerais, 2016.

CASTEJON, F. V., **Taninos E Saponinas,** Universidade Federal de Goiás, 2011.

CESCHEL, G.C.et al. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. **Fitoterapia**, v.73, p.S44–S52, 2002.

CHAVES, R.C.P. **Avaliação do teor de metais pesados na água tratada do município de Lavras - MG.** 2008. 44p. Dissertação (Pós-Graduação em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.et al. Microbial and enzymatic hydrolysis of tannic acid: influence of substrate chemical quality. **Chemical Papers** v. 66. p. 171-177. 2012.

CHIAO, C. et al. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. **Cancer Res.**, v.55, p. 3576–3583, 1995.

CHUN, S.-S. et al. **Process Biochem.** v. 40, n. 809, 2005.

- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 1033–1043, 2000.
- COLLI, A. et al. Propriedades físico-mecânicas e preservação, com boro e tanino, do *Bambusa tuldooides* (Munro). **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 14, n. 1, p. 56 - 64, 2007.
- CONRAD, J. P.; LAPOUGE, C.; Theoretical and Spectroscopic Investigations of a Complex of Al (III) with Caffeic Acid. **The Journal of Physical Chemistry**, v.108, n. 20, p. 4470-4478, 2004.
- CUNHA, F.A.B., et al. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant Mercury chloride. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016
- CUNNINGHAM, S. D.; OW, D. W. Promises and prospects of Phytoremediation. **Plant Physiology**, 110, p. 715- 719, 1996.
- DE MEJIA, E.G. et al. Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 8, p.1191-1203, 2006.
- DEGASPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência Agrotécnica**. v. 29, p. 617-622, 2005.
- DEGASPARI, C.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 33-40, 2004.
- DUTRA, F.L.G. **Compostos Fenólicos e Metilxantinas em Erva-Mate Armazenada em Sistemas de Estacionamento Natural e Acelerado**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 2009.
- ESCARPA, A.; GONZALEZ, M.C. Na overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n.2, p.57-139, 2001.
- FIGUEREDO, F.G., et al. Avaliação do potencial citoprotetor contra o efeito tóxico do cloreto de mercúrio e antioxidante de *Lygodium venustum* Sw (Lygodiaceae). **Revista Interfaces**. v. 39, n. 9, p. 44-49, 2016a.
- FIGUEREDO, F.G., et al. Cytoprotective effect of *Lygodium venustum* Sw. (Lygodiaceae) against mercurium chloride toxicity. **Scientifica**, 2016b.

FU, J. et al., Synthesis, structure and structure-activity relationship analyses of caffeic acid amide as potencial antimicrobials. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2638-2643, 2010.

GALLUCCI, M.N., et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour Fragr.** . 24,348-354, 2009.

GIFTSON, J.S.; JAYANTHI, S.; NALINI, N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. **Investigational New Drugs**, 28, 251-259, 2010.

GREENWALD, P. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. **J. Nutr.**, v.134 (12 Suppl), p.3507S-3512S, 2004.

GUEDES, T.T.A.M. **Espectroscopia vibracional entre cloreto de mercúrio e taninos hidrolisáveis**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato, Ceará, 2016.

HASHIM, M. A., et al. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. **Journal of Environmental Management**, v, 92, p.2355-2388, 2011.

HSIEH, C. et al. Preventive effects of guava (*Psidium guajava* L) keaves and its active compounds against a-dicarbonyl compounds- induced blood coagulation. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 528-535, 2007.

HSU-KIM, H., et al. Mechanisms Regulating Mercury Bioavailability for Methylating. Microorganisms in the Aquatic Environment: A Critical Review. **Environ. Sci. Technol.** 47, p. 2441-2456, 2013.

HUANG, M. T.; FERRARO, T. Phenolic-compounds in food and cancer prevention. **ACS Symposium Series**, v.507, p.8–34, 1992.

HURREL, R.F.; REDDY, M.; COOK, J.D. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic- containing beverages. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 4, p. 289-295, 1999.

HYNES, M. J.; O'COINCEANAINN, W. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **J. Inorg. Biochem.**, v.98, p.1457–1464, 2004.

JORDÃO, Cláudio Pereira et al. Contaminação por crômio de águas de rios proveniente de curtumes em minas gerais. Viçosa: **Química Nova**, 1998.

JUMAN, S et al., Caffeic acid phenethyl ester suppresses the production of pro-inflammatory cytokines in hypertrophic adipocytes through lipopolysaccharide – stimulated macrophages. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n.11, p. 1941-1946, 2012.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. CRC Press L.L.C., 3^a ed.,2001.

KHAN, T.; PARK, J. K.; KWON, J. H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 24, n. 5, p. 816-826, 2007.

KIM, Y.J. Antimelanogenic and antioxidante properties of gallic acid . **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n 6, p. 1052-1055, 2007.

KING, A; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J Am Diet Assoc**. v. 50, n. 2, p. 213-8, 1999.

KLUMB, A. K.; FARIA, O. L. V. Produção de coagulante vegetal catiônico a partir de cascas de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*). **Vetor**, Rio Grande, v. 22, n. 1, p. 71-80, 2012.

KUBOLA, J; SIRIAMORNUN, S. Phenolic contentes and antioxidante activieis of bitter gourd (*Momordica charanta* L) leaf, stem and fruit fraction extraets in vitro. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p.881-890, 2008.

LACERDA, L. D., DE SOUZA, M., RIBEIRO, M. G. The effects of land use change on mercury distribution in sils of Alta Floresta, Southern Amazon. **Environmental Pollution**, v.129, p. 247-255, 2004.

LEITE, N.F., et al. Composição fenólica e avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Psidium guajava* L. var Pyrifera e *Psidium guajava* L. var Pomífera. **Caderno de Cultura e Ciência**, Universidade Regional do Cariri-URCA, 2014.

LEITE, N.F., et al. Efecto citoprotector de extractos de *Eugenia jambolona* y *Psidium myrsinites* DC.A. contra peroxidación lipídica por hierro II. **Acta. Toxicol. Argent.**, v. 24, n. 3, p. 187-192, 2016.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n.3, p.447-454, 2008.

MACOVEI, A., et al. Effect of heavy metal treatments on metallothionein expression. Profiles in white poplar (*Populus alba L.*) cell suspension cultures. **Analele Universitatii din Oradea-Fascicula Biologie, Tom. XVII, 2**, p. 274-279, 2010.

MALM, O. **Avaliação da contaminação ambiental por mercúrio através da análise de peixe**. In: Mercúrio em áreas de garimpo de ouro, Série Vigilância 12 Ed. Câmara, V. Centro Panamericano de Ecologia e Saúde Humana, 1993.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. Em **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3^a ed., 2001.

MICARONI, R.C.C.M; BUENO, M.I.M.S; JARDIM, W.F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n.4, p. 487-495, 2000.

MICHALUART, P. et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. **J. Cancer Res.**, v.59, p. 2347–2352, 1999.

MICHELIN, D. C. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of vegetal extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MOLGAARD, P.; RAVN, H. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. **Phytochemistry** , 27, 2411, 1988.

MONTEIRO, J. M. et al. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 3, p. 338-344. 2006.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Química nova**, v.28, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev Nutr**, v.17, n.4, p. 411-24,2004.

NACZK M; SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr A**. p. 95-111, 2004.

- NARDINI, M. et al. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, n.9, p.1098-1105, 1998.
- NASCIMENTO, E.M.M., et al. *In Vitro* Evaluation of Antioxidant Properties of Fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at Different Stages of Maturation, **Food Chem. Toxicol**, 2017.
- Niu, Z., et al. The linear accumulation of atmospheric mercury by vegetable and grass leaves: Potential biomonitors for atmospheric mercury pollution. **Environ Sci Pollut Res Int**. v. 20, n. 9, p. 6337-43, 2013.
- NOGUEIRA, R.C. et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.44-48, 2008.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- PAES, J. B. et al. Substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. var. *cebil* (Gris.) Alts.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 87, p. 441 - 447, 2010.
- PATEL, S. *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. **Biomed. Prev. Nutr.**, v. 4, p. 23-27, 2014.
- PAULA, M. Inimigo invisível: metais pesados e a saúde humana. **Tchê-Química**, v. 3, n. 6, p. 37-44, 2006.
- PELEGRINO, E.C.F. **Emprego de coagulante à base de tanino em sistema de pós-tratamento de efluente de reator UASB por flotação**. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2011.
- PEREIRA, A. V. et al. Determinação dos padrões de resistência de *S. aureus* aos extratos de plantas medicinais do nordeste brasileira. **Agropecuária Técnica**, Areia, v. 30, n. 1 p. 42-47, 2009.
- PEREIRA, N.L.F. et al. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitos, Rio de Janeiro**, X (X), no prelo, 2015.
- PIMENTEL, C.V.M.B; FRANCKI, V.M; GOLLÜCKE, A.P.B. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. **São Paulo: Varela**; 2005.

PIZZI, A.; MITTAL, K. L. **Handbook of adhesive technology**. 2nd ed. New York: M. Dekker, 2003. 720 p.

PRASAD, N.R. et al. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. **Molecular and Cellular Biochemical**, v. 349, p.11-19, 2010.

R.L. PUNTEL, C.W. NOGUEIRA, J.B.T ROCHA, Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (tbars) production in rat brain in vitro, **Neurochem Res**. v. 30, p. 225-235, 2005.

RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Science**, 180, p. 169-181, 2011.

REIS, C. N. et al. Antioxidant activity and the content of tannins and phenolic fruit of *Annona muricata* L. **Revista Vértices**, Campos dos Goytacazes, RJ, v. 15, n. 3, p. 95-112, 2013.

RIBEIRO, M.A.C. **Contaminação do solo por metais pesados**. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Faculdade de Engenharia. Engenharia do Ambiente. Portugal. Lisboa, 2013.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v.73, S21–S29, 2002.

SAIJA, A. et al. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. **J. Sci. Food Agric.**, v.79, n.3, p.476-480, 1999.

SANCHEZ-MORENO, C.; JIMENEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutr. Res.**, v.20, n.7, p.941–53, 2000.

SANTOS, F.L.O.; GATTI, R.M.; SOUZA, P.R.K. Presença de mercúrio em peixes e sua correlação com a intoxicação alimentar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde** 9, p. 37-41, 2006.

SEGURA-MUNOZ, S.I. **Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP: Avaliação dos níveis de metais pesados**. 131p. Tese (Pós-Graduação de Enfermagem em Saúde Pública - Linha de Pesquisa: Saúde Ambiental) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

- SEYLER, P.T.; BOAVENTURA, G.R. Distribution and partition of trace metals in the Amazon Basin. **Hydrological Processes**, p. 1345–1361, 2003.
- SHADOMY, S., ESPINEL-INGROFF, A., CARTWRIGHT, R. **Laboratory studies with antifungal agentes: susceptibility test and bioassay** In: Lennette, E.H., Ballows, A., Hauslers JR.V., Shadomy, H.J. (Eds). 4ed. J. Virol. 991-999, 1985.
- SILVA, T. S. S. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e de esgoto**. 1999. 87 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1999.
- SOARES, S. E.; **Rev. Nutr.** v. 15, n. 71, 2002.
- SOBRAL-SOUZA, C.E., et al. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian Journal of Chemistry**. 7, 165–170, 2014.
- TANAC S. A. **Construindo o futuro todos os dias**. 2013.
- TOYODA, T. et al., Antiinflammatory effects of caffeic acid and phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor kappaB inhibitor, on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbil. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 8, p.1786-1795, 2009.
- TSUTIYA MT. **Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgotos**. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. p.753-761, 1999.
- UNEP – United Nations Environment Program. Chemicals: Global Mercury. **Assessment. Geneva**, 2002.
- UOZAKI, M. et al. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, v. 73, n. 2, p. 85-91, 2007
- VALKO, M. et al. **Mol. Cell. Biochem.** 2004
- VALLE, L.A.R. **Avaliação de elementos-traço em fertilizantes e corretivos**. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência do Solo - Área de concentração em Recursos Ambientais e Uso da Terra) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- VITAL, B. R. et al. Avaliação dos taninos da casca de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden como preservativo de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 2, p. 245 - 256, 2001.

VOLP, A. C. P. et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WEYANT, M. J. et al. Colon cancer chemo preventive drugs modulate integrin- mediated signaling pathways. **Clin. Cancer Res.**, v.6, p.949–956, 2000.

WHO, World Health Organization. Elemental Mercury And Inorganic Mercury Compounds: **Human Health Aspects**. p. 68, 2003.

YABE, M.J.S.; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. **Química Nova**. v. 21, n.5, p. 551-556, 1998.

YANG, H. et al., Antioxidant compounds from própolis collected in Anhui, China. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 3444-3455, 2011.