

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO PIROGALOL COMO ALTERNATIVA NA REDUÇÃO DA TOXICIDADE DO CLORETO DE MERCÚRIO

Fabia Ferreira Campina¹, Janaina Esmeraldo Rocha¹, Maria do Socorro Costa¹, Henrique Douglas Melo Coutinho²

Resumo: As atividades realizadas, 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, 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 (CBM) Fungicida Mínima (CFM). 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. Podemos observar que o tanino conferiu uma citoproteção ao modelo vegetal, obtendo um melhor crescimento e desenvolvimento dos caulículos e radículas da planta. 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-chave: Quelante. Citoproteção. Caulículos

1. Introdução

A expressão metal pesado, é empregado atualmente para designar metais que apresentam uma alta potencialidade tóxica adjunta à poluição (ANZECC; ARMCANZ, 2000) 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 C₆H₆O₃ de origem sintética (MAZZEI, 2009).

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 quelar os metais de transição (ATOUI, A.K et al., 2005; SOARES, S.E., 2002).

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

2. Objetivo

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.

3. Metodologia

A substância utilizada foi o pirogalol, os microrganismos utilizados foram a bactéria *Escherichia coli* 06

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.

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.

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).

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 μ g / mL) e do Cloreto de Mercurio ($HgCl_2$), variando de 1.25mM a 0.01mM, de acordo com Coutinho et al. (2017).

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 μ L da amostra de pirogalol (250 a 5 μ g / mL) em 1500 μ L de DPPH (0,3 mM) e 1200 μ L de etanol P.A.

Análise estatística

A análise estatística do teste utilizou uma ANOVA de dois sentidos seguida de teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,0001$ e média aritmética \pm SEM de três repetições com ANOVA de dois sentidos, seguido de teste pós-hoc de Tukey com $p < 0,0001$.

4. Resultados

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

De acordo com a Tabela 1 podemos observar que o pirogalol apresentou 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 Fe^{2+} .

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

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

	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
Pyrogallol	2,92 ± 1,04	2,0700	17, 06 ±1,20

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).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

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. Desta forma observa-se um sinergismo ao uso concomitante dos dois produtos juntos.

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

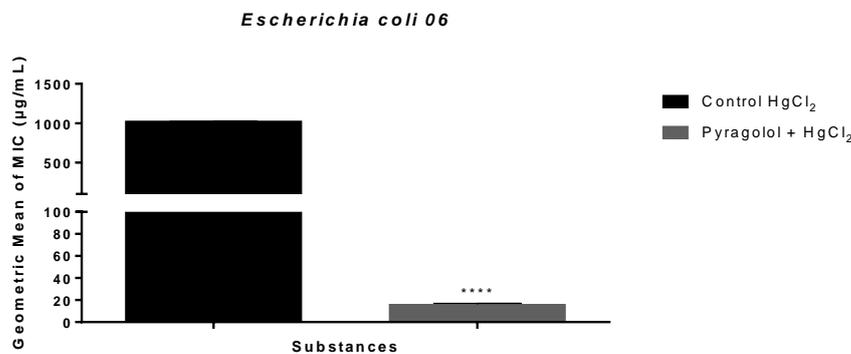
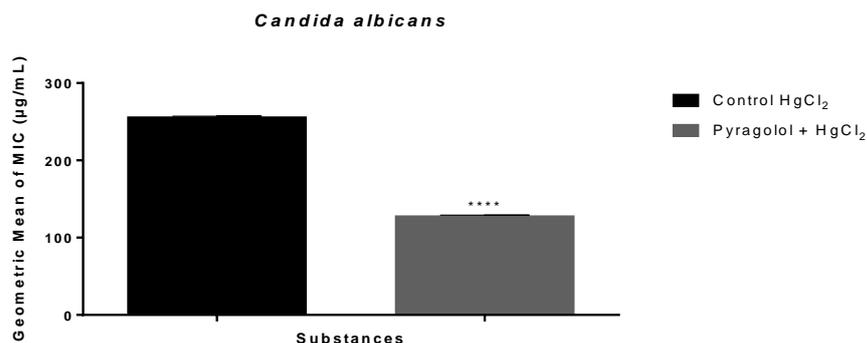


Fig. 4. Concentrações fungicidas do cloreto de Mercúrio sozinho e associadas ao pirogalol



Para o modelo procarioto 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 bacteria 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.

Efeito alelopático em sementes de alface

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). Podemos observar que a concentração alelopática do pirogalol é superior a 512 µg/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 µg/mL, sendo por isto a escolhida para os demais testes.

Velocidade de Germinação

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 significante). 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).

Efeito citoprotetivo sobre sementes de alface contra HgCl₂

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.

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

6. Referências

Anzecc/Armcanz. 2016. Australian Guidelines for Water Quality Monitoring and Reporting. October.

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

- Atoui, A. K.; Mansouri, A.; Boskou, et., al., 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.
- Boening, D. W. 2000. Ecological Effects, Transport and Fate of Mercury: a General Review. Chemosphere, v.40, p. 1335-1351.
- 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.
- 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., et al.,. 2016. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant Mercury chloride, Arab. J. Chem.
- Grant, C.A., Buckley, W.T., Bailey, L.D., Selles, F., 1998. Cadmium accumulation in crops. Canadian Journal of Plant Science. 78, 1-17.
- 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. pyriferum e *Psidium guajava* L. var. pomiferum. Caderno de Cultura e Ciências, Universidade regional do Cariri.
- Leite, N.F., Sobral-Souza, C.E., Matias, E.F.F., et. Al.,. 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.
- 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.
- Nascimento, E.M.M., Rodrigues, E.M.M., Costa, W.D., Boligon, et al.,. 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
- 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.
- 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., et al.,. 2014a Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam, Arabian Journal of Chemistry, 7, 165–170.

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

Sobral-Souza, C.E., Leite, N.F., Cunha, F.A.B., et al.,. 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, 401-409.

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.

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.

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.