



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ETNOBIOLOGIA E
CONSERVAÇÃO DA NATUREZA – PPGETNO

YEDDA MARIA LOBO SOARES DE MATOS

AVALIAÇÃO DA CITOPROTEÇÃO DE FLAVONOIDES CONTRA A
TOXICIDADE DO CLORETO DE MERCÚRIO

RECIFE – PE

2021

YEDDA MARIA LOBO SOARES DE MATOS

**AVALIAÇÃO DA CITOPROTEÇÃO DE FLAVONOIDES CONTRA A
TOXICIDADE DO CLORETO DE MERCÚRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza (UFRPE, UEPB, URCA e UFPE) como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor.

Orientador:

Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri - URCA

Coorientador:

Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro
Universidade Federal do Cariri - UFCA

RECIFE – PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M433a MATOS, YEDDA MARIA LOBO SOARES DE
AVALIAÇÃO DA CITOPROTEÇÃO DE FLAVONOIDES CONTRA A
TOXICIDADE DO CLORETO DE MERCÚRIO / YEDDA MARIA LOBO
SOARES DE MATOS. - 2021.
92 f. : il.

Orientador: Henrique Douglas
Melo Coutinho. Coorientador:
Juan Carlos Alvarez Alvarez-
Pizarro. Inclui referências e
anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de
Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza, Recife, 2021.

1. Antioxidante. 2. Citoproteção. 3. Espectroscopia de Infravermelho. 4.
Metais Tóxicos. 5. Rutina. I. Coutinho, Henrique Douglas Melo, orient. II.
Alvarez-Pizarro, Juan Carlos Alvarez, coorient. III. Título

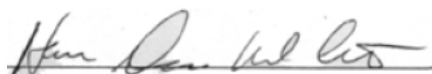
CDD 304.2

Tese apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Etnobiologia e Conservação da Natureza (Área de Concentração: Biodiversidade / Linha de Pesquisa: Sistemas cognitivos e usos de recursos naturais), outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

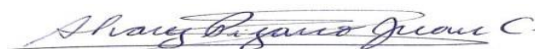
A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Apresentada em 17 de maio de 2021.

ORIENTADOR



Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Orientador - URCA)



Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizarro (Coorientador - UFCA)

EXAMINADORES



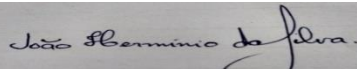
Prof.^a Dr.^a Marta Regina Kerntopf (Membro Interno - URCA)



Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira (Membro Externo - URCA)




Prof.^a Dr.^a Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro (Membro Externo – UFCA)



Prof. Dr. João Hermínio da Silva (Membro Externo – UFCA)



Prof.^a Dr.^a Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga (Suplente – URCA)



Prof.^a Dr.^a Celestina Elba Sobral de Souza (Suplente – UNIVS)

RECIFE – PE

2021

A Deus e à Nossa Senhora da Penha por me concederem milagres e bençãos todos os dias.

Aos meus pais, Hermano Soares e Maria da Penha Lobo, meus primeiros educadores; ao meu amado esposo Osvaldo e aos meus filhos Liz e Rafael, que me enchem de amor e felicidade.

“Até aqui nos ajudou o Senhor”. 1 **Samuel 7:12.**

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita graça e por todas as bênçãos recebidas, obrigada Nosso Senhor!

Aos meus pais, Hermano Soares e Penha Lobo, pelo cuidado e amor a mim dispensados. Amo vocês infinitamente!

Ao meu querido esposo, Osvaldo José de Matos, por todo carinho, compreensão e amor. Você me inspira e me faz muito feliz. Te amo!

Aos meus filhos, Liz Maria e Rafael José, que me fortalecem pelo simples fato de existirem. Por vocês, nutro um amor imensurável!

Aos meus irmãos, Rosa Lobo, Leila Lobo, Hermaria Lobo, Edson Lobo e meus sobrinhos por me cercarem sempre de muito amor, obrigada pela torcida, ajuda, amizade e presença constante na minha vida, amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, sinto-me orgulhosa de ser sua orientanda! Este pesquisador de reconhecimento nacional e internacional, mas que sabe ser humilde e compartilhar conhecimentos. A orientação recebida foi exemplar, gratidão!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizzaro, agradeço pela disponibilidade, por todos os ensinamentos e troca de saberes.

Ao Prof. Dr. João Hermínio da Silva pela consideração, por seus ensinamentos, conselhos, exigências e confiança. Gratidão!

Ao Prof. Dr. Raimundo Nonato Teixeira pelo incentivo e pelas valiosas sugestões, gratidão.

À Universidade Regional do Cariri e ao Departamento de Ciências Biológicas pelo incentivo à qualificação profissional.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e às Universidades parceiras por todo suporte e apoio; especialmente aos Coordenadores, Professores e Funcionários do Programa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Pós-Graduação (Nível Doutorado).

Aos membros da banca de qualificação, Dr.^a Marta Regina Kerntopf, Dr.^a Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro, Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira e Dr.^a Maria Flaviana Morais Braga, pela disponibilidade, sugestões e ensinamentos.

Agradeço, em especial, à Dr.^a Jacqueline Cosmo, Janaina Esmeraldo, Dr.^a Celestina Elba Sobral, José Bezerra Neto, Fábila Campina, Janaine Camilo, Thiago Sampaio, Tássia Guedes e Milene Costa pela ajuda nos testes e em todos os momentos desta pesquisa, desde o Projeto de

tese, a vocês, minha gratidão!

Aos amigos Professores Dr. Francisco de Assis Bezerra da Cunha, Dr.^a Maria Flaviana Moraes Braga, Dr.^a Antonia Eliene Duarte, Dr. Luiz Marivando Barros, Dr. Saulo Relisson Tintino, Dr. João Calixto, Dr.^a Marta Regina Kerntopf, Dr.^a Roseli Barbosa, Dr. Alysson Pinheiro e Dr.^a Marta Almeida, que me ajudaram, incentivaram, apoiaram e me fizeram acreditar que esse sonho era possível.

Ao Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes e Dr. José Galberto Martins Costa, pelo espaço cedido nos laboratórios para realização dos ensaios.

Às amigas Joycy Franciely Sampaio, Débora Sena Coutinho, Audilene Freitas, Irismã Libório, Firmiana Fonseca, Margarida Angélica, Arlindo Siebra, Roberta Piancó e Datiane Tintino pela torcida, apoio e incentivo. A vocês minha gratidão e afeto.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Regional do Cariri, pelas experiências vivenciadas e trocadas. Todos vocês contribuíram muito para a realização desta pesquisa.

À todos os colegas do Mestrado e Doutorado em Etnobiologia e Conservação da Natureza. Especialmente às colegas, Norma Fernandes, Flávia Regina, Julimeire, Samara Feitosa, Thassya Lucas, Natalia Leite, Catarina, Maysa e Juliana pela companhia nas viagens a Recife e Campina Grande, pelas conversas de apoio e pela troca de saberes.

A todos que, de alguma forma, colaboraram e me incentivaram para a conclusão desta Tese, minha gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
1.1 CONTAMINAÇÃO POR METAIS TÓXICOS	19
1.2 MERCÚRIO: ASPECTOS QUÍMICOS E TOXICIDADE	20
1.3 FITORREMEDIAÇÃO E BIOSSORÇÃO DE METAIS TÓXICOS	23
1.4 CITOPROTEÇÃO FRENTE METAIS TÓXICOS	25
1.5 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E QUELANTE DOS PRODUTOS NATURAIS.....	27
1.6 COMPOSTOS FENÓLICOS	29
1.6.1 Flavonoides.....	30
1.6.1.1 Rutina.....	31
REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO 2: REDUCTION OF THE PHYTOTOXIC EFFECT OF MERCURY CHLORIDE BY RUTIN AND EVALUATION OF INTERACTIONS BY VIBRATIONAL SPECTROSCOPY (RAMAN AND FTIR).....	50
CAPÍTULO 3: FTIR ANALYSIS AND REDUCTION OF THE PHYTOTOXIC EFFECT OF MERCURY DICHLORIDE BY RUTIN	65
CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
4.1 PRINCIPAIS CONCLUSÕES	88
4.2 PERSPECTIVAS FUTURAS	88
4.3 ORÇAMENTO	88
ANEXOS	91

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EC ₅₀	Concentração efetiva em 50%
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% das células
ITG	Índice de taxa de germinação
UFC	Unidade formadora de colônias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas de avaliação do efeito citoprotetor de flavonoide, frente a ação do cloreto de mercúrio (HgCl ₂).	26
Figura 2. Mecanismos da atividade antioxidante, representados pela transferência de um átomo de hidrogênio, abstração de elétrons do HOMO e quelação de metais de transição.	30
Figura 3. Algumas subclasses de flavonoides.	31
Figura 4. Estrutura química da rutina.	33

MATOS, Yedda Maria Lobo Soares de. Dr.^a Universidade Federal Rural de Pernambuco. Maio/2021. AVALIAÇÃO DA CITOPROTEÇÃO DE FLAVONOIDES CONTRA A TOXICIDADE DO CLORETO DE MERCÚRIO. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho; Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizzaro.

RESUMO

Os solos e as águas contaminadas por mercúrio, vêm assumindo proporções que comprometem a qualidade de vida no planeta. Uma vez no ambiente, o mercúrio pode entrar na cadeia alimentar e causar efeitos letais em muitas formas de vida. Pesquisas estão sendo realizadas para demonstrar que algumas espécies vegetais possuem propriedades bioativas que protegem as plantas da ação tóxica do cloreto de mercúrio e tem sugerido que a fitorremediação é uma técnica menos onerosa que as tecnologias de remediação convencional para remediar ambientes contaminados por metais. Esta pesquisa teve como objetivo verificar as atividades antioxidante, quelante e citoprotetora do flavonoide rutina em modelo procarioto e eucarioto unicelular e vegetal. Para alcance dos objetivos foram realizados ensaios antioxidantes por sequestro de radicais livres (DPPH) e por redução dos íons férricos; os resultados destes ensaios foram evidenciados através da EC_{50} , onde a rutina apresentou uma elevada atividade antioxidante e quelante. Para os ensaios microbiológicos, realizou-se a microdiluição seriada para obtenção do valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e a partir da concentração subinibitória, estabeleceu-se as concentrações fungicida e bactericida mínima (CFM e CBM). O potencial citoprotetor da planta foi avaliado com a espécie *Lactuca sativa* (alface) utilizando os produtos em concentração subalelopática e diferentes concentrações de $HgCl_2$. Os resultados apontaram que o flavonoide rutina não reduziu a toxicidade do $HgCl_2$ em modelos microbiológicos, mas favoreceu o desenvolvimento de raízes e caule em plântulas de alface, conferindo citoproteção, aumentando o crescimento e desenvolvimento das raízes dessas plântulas e essa atividade pode estar relacionada ao efeito quelante e antioxidante da substância, reduzindo a toxicidade do metal. A interação da rutina com o cloreto de mercúrio foi evidenciada por espectroscopia vibracional (Raman e FTIR). Embora o cloreto de mercúrio cause citotoxicidade em várias espécies de plantas, seu complexo com a rutina pode mitigar esses efeitos. Este é o primeiro relato sobre a atividade citoprotetora do flavonoide rutina em modelo procarioto e eucarioto frente a ação tóxica do cloreto de mercúrio. Estudos desta natureza podem contribuir para o avanço das pesquisas em mecanismos citoprotetores contra danos a elementos potencialmente tóxicos ao ambiente, apresentando-se como uma alternativa interessante para o tratamento de áreas contaminadas por metais.

Palavras-chave: Antioxidante; Citoproteção; Espectroscopia de Infravermelho; Metais Tóxicos; Rutina.

MATOS, Yedda Maria Lobo Soares de. Dr.^a Rural Federal University of Pernambuco. May/2021. EVALUATION OF CYTOPROTECTION OF FLAVONOIDS AGAINST MERCURY CHLORIDE TOXICITY. Henrique Douglas Melo Coutinho; Dr. Juan Carlos Alvarez-Pizzaro.

ABSTRACT

Soils and waters contaminated by mercury, reaching proportions that compromise the quality of life on the planet. Once in the environment, mercury can enter the food chain and cause lethal effects on many forms of life. Research is being carried out to demonstrate that some plant species have bioactive properties that protect plants from the toxic action of mercury chloride and has suggested that phytoremediation is a less costly technique than conventional remediation technologies to remediate environments contaminated by these metals. This research aimed to verify the antioxidant, chelating and cytoprotective activities of the flavonoid rutin in a prokaryotic and unicellular and plant eukaryotic model. To achieve the objectives, antioxidant assays by free radical scavenging (DPPH) and by reduction of ferric ions were performed; the results of these tests were evidenced through the EC₅₀, where rutin presented a high antioxidant and chelating activity. For microbiological tests, serial microdilution was performed to obtain the value of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and from the subinhibitory concentration, the fungicidal and bactericidal concentrations (CFM and CBM) were established. The plant's cytoprotective potential was evaluated with the species *Lactuca sativa* (lettuce) using the products in subleleopathic concentration and different concentrations of HgCl₂. The results showed that the flavonoid rutin did not reduce the toxicity of HgCl₂ in microbiological models, but favored the development of roots and stem in lettuce seedlings, providing cytoprotection, increasing the growth and development of roots of these seedlings and this activity may be related to the effect chelating and antioxidant of the substance, reducing the toxicity of the metal. The interaction of rutin with mercury chloride was evidenced by vibrational spectroscopy (Raman and FTIR). Although mercury chloride causes cytotoxicity in several plant species, its complex with rutin can mitigate these effects. This is the first report on the cytoprotective activity of rutin flavonoid in a prokaryotic and eukaryotic model against the toxic action of mercury chloride. Studies of this nature can contribute to the advancement of research on cytoprotective mechanisms against damage to potentially toxic elements to the environment, presenting itself as an interesting alternative for the treatment of areas contaminated by metals.

Keywords: Antioxidant; Cytoprotection; Infrared spectroscopy; Toxic Metals; Rutin.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional, da agricultura e o potencial aumento das atividades industriais, nas últimas décadas, têm contribuído para agravar os problemas ambientais, principalmente, no que diz respeito à poluição da água e do solo. A contaminação de metais tóxicos (pesados) em solos desencadeia uma perturbação no entorno natural, acarretando riscos para a saúde humana, bem como para os ecossistemas (ABDOLALI *et al.*, 2017).

Com o crescente desenvolvimento tecnológico mundial, as fontes antrópicas de metais para deposição no solo provocam impactos negativos no meio ambiente (FOMINA e GADD, 2014); tais impactos são oriundos, sobretudo, de atividades industriais, agrícolas e do descarte de resíduos. A combustão do carvão mineral, por exemplo, é uma atividade que contribui com maior número de metais poluentes para o solo (CHABUKDHARA e NEMA, 2012; VÄNSKA *et al.*, 2019).

A disponibilidade de metais tóxicos nas áreas agricultáveis tem aumentado expressivamente no solo, principalmente devido a mineração, a aplicação de fertilizantes e lodo de esgoto contendo mercúrio (Hg), por exemplo. Dos metais mais perigosos para o meio ambiente, o mercúrio é um elemento químico que gera preocupação junto às populações e à comunidade científica, devido à sua elevada toxicidade e bioacumulação na cadeia alimentar podendo contaminar diversos ambientes (MAHBUB *et al.*, 2017).

O mercúrio é uma toxina ambiental ubíqua que causa uma variedade de efeitos adversos nos seres vivos (YNALVEZ; GUTIERREZ; GONZALEZ-CANTU, 2016). Nas plantas, o mercúrio pode reduzir o crescimento (YANG *et al.*, 2018), induzir a planta ao estresse oxidativo, resultando na peroxidação de lipídios, no vazamento de K^+ e na alteração de atividades antioxidante (TRAN *et al.*, 2018), nas raízes bloqueia a captação e o transporte de nutrientes (MARRUGO-NEGRETE *et al.*, 2016).

Em vista à crescente contaminação dos solos por mercúrio e da expansão da contaminação para outros ecossistemas, é importante estabelecer novas alternativas para a reabilitação dessas áreas contaminadas. A ideia de utilizar plantas para remover mercúrio e outros metais do solo representa uma alternativa interessante para conservação de áreas degradadas por metais tóxicos. Um exemplo é a fitorremediação, uma técnica que utiliza plantas para remover poluentes metálicos de solos, e tem sido foco de pesquisas visando a remediação de solo contaminado (MACIEL *et al.*, 2013).

Nessa perspectiva, encontram-se na literatura, vários estudos acerca da utilização de

adsorventes naturais para remoção dos íons de metais. Estudos têm utilizado resíduos da casca de Litchi (JIANG *et al.*, 2015) como adsorvente magnético para remoção de íons de chumbo em solução aquosa; casca de laranja (LASHEEN; AMMAR; IBRAHIM, 2012) foram utilizadas em condições ótimas para remoção de Cádmio (Cd II), Cobre (Cu II) e Chumbo (Pb II) em soluções aquosas; o bagaço de cana-de-açúcar in natura e modificada também é eficiente na remoção de Pb e Cu (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

Outros estudos têm se dedicado a demonstrar a variedade de fontes vegetais que possuem propriedades bioativas. Grande parte destas propriedades é representada pela presença de compostos fenólicos na composição vegetal, que podem ou não, atuar como antioxidante (SOUZA *et al.*, 2015). A utilização de produtos naturais com atividades antioxidantes e quelantes está entre as principais alternativas para reverter ou prevenir os efeitos tóxicos de metais nos seres vivos (LEITE *et al.*, 2017), por estes compostos possuírem, principalmente flavonoides e apresentarem elevada atividade antioxidante, inibindo a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), evitando, assim, a peroxidação lipídica que danifica a estrutura celular dos organismos (LEITE *et al.*, 2016).

Os flavonoides estão entre os compostos fenólicos mais abundantes em vegetais, estando concentrados na parte aérea das plantas, como flores e frutos (PEREZ-VIZCAINO e FRAGA, 2018). Além da quelação de metais e de protegerem o organismo contra agentes oxidantes, estes polifenóis são reconhecidos por suas bioatividades, como ação anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, cardioprotetora e inibição enzimática (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Dentro do grupo de flavonóis estão a rutina, catequina, isoquercetina e quercetina, que são alguns dos polifenóis mais reconhecidos e estudados por suas propriedades anticancerígenas, antioxidantes, antivirais e antimicrobianos (KARAK, 2019).

O flavonoide rutina (Quercetin-3-rhamnoglucoside ou 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside) pertencente à classe dos flavonóis e possui como estrutura básica, uma molécula de quercetina, ligada a duas moléculas de glicose, sendo elas respectivamente, uma glicose e uma rhamnose, substituintes na posição 3 do anel pirano. A combinação dessas duas moléculas é denominada rutinose, o que confere o nome ao composto (BUDZYNSKA *et al.*, 2019). Este possui várias propriedades como potencial antidiabético (HAO *et al.*, 2012), neuroproteção (GULPINAR *et al.*, 2012), anticarcinogênico (CAPARICA *et al.*, 2020), antioxidante (MAHMOUD, 2012) e anti-inflamatório (LEE; KU; BAE, 2012), cardioprotetor, vasoprotetor, antiproliferativo, antitrombótico e citoprotetor (ARAÚJO, 2012).

A rutina além de apresentar as atividades biológicas supracitadas, possui efeito

antialérgico e imunomodulador (YE e AUGUSTIN, 2019; GADKARI e BALARAMAN; 2015; DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016). Além disso, denota potencial de aplicabilidade na remediação de áreas contaminadas por metais tóxicos, pela significativa atividade antioxidante, de sequestro de radicais livres e de mecanismos quelantes (WU *et al.*, 2018; LESJAK *et al.*, 2018).

São crescentes, também os estudos que avaliam a interação de compostos fenólicos com o mercúrio, tendo em vista a remoção destes de ambientes contaminados (ROCHA *et al.*, 2019a e 2019b; ROCHA *et al.*, 2021). Assim, o presente estudo objetivou verificar as atividades antioxidante, quelante e citoprotetora do flavonoide rutina em modelo procaríoto e eucarioto unicelular e vegetal.

Assim, a hipótese era que o mecanismo de ação da rutina podia proteger microorganismos e vegetais contra o efeito tóxico do cloreto de mercúrio e ser um importante quelante e agente antioxidante na remoção dos íons de cloreto de mercúrio em ambientes contaminados.

Para testar essa hipótese, foram realizados ensaios microbiológicos para avaliar a redução da toxicidade do cloreto de mercúrio frente cepas de *Escherichia coli* e *Candida albicans*, em presença do flavonoide rutina. O potencial citoprotetor da planta foi avaliado com a espécie *Lactuca sativa* (alface) utilizando o produto em concentração subalelopática e diferentes concentrações de HgCl₂. A interação entre rutina e HgCl₂ também foi avaliada por espectroscopia vibracional (FTIR e Raman).

Os resultados da pesquisa estão apresentados em três capítulos: o primeiro capítulo que trata da revisão de literatura sobre os principais temas abordados na tese. O segundo capítulo que traz o artigo, intitulado *Reduction of the Phytotoxic Effect of Mercury Chloride by Rutin and Evaluation of Interactions by Vibrational Spectroscopy (Raman and FTIR)*, publicado no *Journal Vibrational Spectroscopy* (fator de impacto 1.9) é apresentada a análise da atividade citoprotetora da rutina frente ao HgCl₂, onde foram determinadas a massa seca e possíveis danos às membranas de plântulas de *Lactuca sativa* submetidas a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio em associação com rutina. A interação entre estes últimos foi observada por espectroscopia vibracional (Raman e FTIR). O terceiro capítulo, intitulado *FTIR analysis and reduction of the phytotoxic effect of mercury dichloride by rutin* publicado no *Journal Rhizosphere* (fator de impacto 2.079), traz os resultados da capacidade do flavonoide rutina em reduzir a toxicidade do dicloreto de mercúrio (HgCl₂) em modelos microbiológicos e vegetais, avaliando a interação molecular através da espectroscopia vibracional.

Por fim, tem-se as considerações finais, onde são destacadas as principais conclusões

do estudo, enfatizando as contribuições da pesquisa para relevância e impacto no desenvolvimento científico e tecnológico. Foram abordadas também as propostas de investigações futuras e o orçamento necessário à realização desta pesquisa.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 CONTAMINAÇÃO POR METAIS TÓXICOS

Os metais são um grupo de elementos químicos, sólidos no seu estado puro (com exceção do mercúrio, que é líquido), caracterizados pelo seu brilho, dureza, boa condutividade elétrica e térmica, maleabilidade, ductilidade, e por elevados pontos de fusão e ebulição. No grupo destes elementos existem alguns que apresentam uma densidade ainda mais elevada, em relação aos demais, estes são denominados metais tóxicos. Além da elevada densidade ($>4,0 \text{ g/cm}^3$), também se caracterizam por apresentarem valores elevados de número atômico, massa específica e atômica (HASHIM *et al.*, 2011).

Os metais tóxicos estão presentes na água, no solo, nos sedimentos, no ar e na vida dos organismos e têm origem natural e antropogênica (CARVALHO *et al.*, 2019). Fontes antropogênicas geram um constante e permanente aumento da poluição, enquanto a fonte natural geralmente é um fenômeno sazonal, influenciado pelo clima, e não causa tantos danos ao meio ambiente (ARMAH; QUANSAH; LUGINAAH, 2014). Como exemplo de fontes antropogênicas tem-se as atividades industriais, agrícolas e descarte de resíduos. Dessas atividades, as mais importantes são curtumes, têxteis, metalúrgicos, destilarias, fábricas de galvanização e que produzem pesticidas, fertilizantes, tintas, vernizes e produtos farmacêuticos (CHABUKDHARA e NEMA, 2012; YAN *et al.*, 2018).

A concentração de metais tóxicos no meio ambiente, com sua disseminação no solo, na água e na atmosfera, tem sido motivo de crescente preocupação no mundo. A contaminação por esses metais é um dos maiores problemas ambientais, significando risco à saúde humana, pois são prejudiciais a várias espécies do ecossistema (PIMENTEL, 2011). Esta contaminação ocorre através da inalação ou ingestão indireta ou causada pela capacidade das plantas e outros organismos de bioacumular os metais (ZAHRA e KALIM, 2017).

Dentre esses metais destaca-se o mercúrio que é um dos graves poluentes ambientais, sua contaminação e toxicidade é um sério problema para a saúde humana (YANG *et al.*, 2020). Esse elemento é o octogésimo da tabela periódica. Na sua forma elementar, o mercúrio é um elemento denso (densidade de $13,5 \text{ g/cm}^3$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), prateado e brilhante. O mercúrio é líquido à temperatura ambiente e sua temperatura de fusão e ebulição são respectivamente $38,87 \text{ }^\circ\text{C}$ e $357 \text{ }^\circ\text{C}$, condutor de eletricidade e encontrado na atmosfera principalmente na sua forma elementar (Hg^0) gasosa (HARIKA *et al.*, 2021).

Pode ser naturalmente encontrado em regiões vulcânicas, em rochas ígneas, sedimentares e em fontes de águas termais localizadas em dobramentos modernos (RIAZ *et al.*, 2016). As emissões naturais desse metal correspondem a até 10% de liberação para o ambiente (UNEP, 2013). Já as fontes oriundas das atividades antropogênicas incluem mineração, fundição de metais, produção de carvão, indústria eletrônica, lâmpadas de vapor de mercúrio, refinarias, fábricas de adubos, pilhas e incineração de resíduos hospitalares e urbanos (GWOREK *et al.*, 2017; PÉREZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018).

Portanto, o mercúrio é emitido para o ambiente por fontes naturais, mas também por fontes antropogênicas, por meio de combinações complexas, envolvendo reações químicas, físicas e biológicas.

O conhecimento do ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente é de extrema importância para se entender seu grau de toxicidade. Dentre estas rotas, destaca-se seu transporte do solo e da água para a atmosfera, seguido pela deposição atmosférica das espécies de mercúrio de volta para a água e solo. Quando em contato com o solo ou sedimento, pode ocorrer sorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/demetilação. O ciclo é completado pelas rotas de precipitação, bioconversão em formas voláteis ou solúveis, sua reiteração na atmosfera ou bioacumulação na cadeia alimentar aquática e terrestre. Mais de que 85% do seu estoque total na biota de águas doces está na forma de metilmercúrio, indicando que a formação deste é o processo chave que regula a quantidade de mercúrio, nesses ambientes. No entanto, nas águas este valor raramente ultrapassa 10% e, em sedimentos, este valor varia de 0,1 a 1,5% do estoque de Hg (BISINOTI *et al.*, 2004).

1.2 MERCÚRIO: ASPECTOS QUÍMICOS E TOXICIDADE

O mercúrio pode se apresentar na forma elementar (Hg^0) e também nas formas oxidadas: mercurioso inorgânico (Hg^+) e sais de mercúrico (Hg^{2+}), cada um diferindo quanto aos níveis de toxicidade e propriedades físico-químicas. O mercúrio elementar é volátil e menos tóxico que o orgânico (BROMBACH e PICHLER, 2019).

As diferentes formas do mercúrio podem, no entanto, combinar-se com elementos como cloro, enxofre ou oxigênio e originar compostos inorgânicos, também designados como sais de mercúrio. Também pode ligar-se covalentemente a um átomo de carbono e originar compostos de mercúrio orgânico como metilmercúrio, etilmercúrio e fenilmercúrio (YANG *et al.*, 2020). O mercúrio inorgânico também pode ser encontrado sob dois diferentes estados de oxidação: o íon mercurioso (Hg_2^{2+}), forma pouco estável em sistemas naturais, e o íon mercúrico

(Hg^{2+}). Esses metais combinam com outros elementos químicos formando compostos de sais, sendo que os mais importantes são: cloreto de mercúrio (HgCl_2); cloreto mercurioso ou calomelano (Hg_2Cl_2); fulminato de mercúrio, $[\text{Hg}(\text{CNO})_2]$, detonador usado em explosivos; e sulfeto de mercúrio (HgS) de cor vermelha, usado em tintas (DIAS *et al.*, 2016; BRADBERRY, 2016).

Ainda que a maior parte da contaminação por mercúrio seja em sua forma metálica e inorgânica, vários microrganismos como bactérias e fungos são capazes de converter essas formas em metilmercúrio. Esse composto, uma vez liberado no solo ou na água, pode se prender a outras partículas e permanecer por longos períodos, podendo ser absorvidos por organismos de diversos níveis tróficos. Desse modo, também é um elemento que apresenta características que tendem a bioacumulação e biomagnificação (GUTIÉRREZ-MOSQUERA *et al.*, 2017).

O mercúrio mesmo em baixas concentrações representa um risco para microrganismos (MA; DU; WANG, 2019). O Mercúrio inorgânico tem sido relatado por produzir efeitos nocivos a 5 mg/L em meio de cultura (SHAHID *et al.*, 2019). Compostos organomercuriais podem exercer o mesmo efeito de concentrações dez vezes menores do que isso. As formas orgânicas do mercúrio são geralmente mais tóxicas para os organismos aquáticos e aves do que as formas inorgânicas. As plantas aquáticas são afetadas pelo mercúrio a uma concentração de 1 mg/L na forma inorgânica e a concentrações muito mais baixas do mercúrio na forma orgânica. Invertebrados aquáticos variam amplamente em sua suscetibilidade ao mercúrio. Em geral, os organismos no estágio larval são mais sensíveis (DE ALMEIDA RODRIGUES *et al.*, 2019).

Nos seres humanos, cada forma química do metal apresenta fonte de contaminação e via de exposição diferente. A contaminação por mercúrio inorgânico ou cloreto de mercúrio (HgCl_2), ocorre, principalmente, através de lâmpadas fluorescentes, consumo de alimentos plantados em terrenos contaminados e cosméticos, sendo as vias de entrada a ingestão e dérmica, respectivamente. Entre as formas orgânicas (metilmercúrio), a exposição humana ocorre, principalmente, pelo consumo de peixes, visto que todas as formas de organomercuriais têm potencial de bioacumulação elevado (MANAVI e MAZUMDER, 2018).

O cloreto de mercúrio (HgCl_2) é bastante solúvel em solventes orgânicos, possuindo grande lipossolubilidade quando comparado com a forma inorgânica divalente (Hg^{+2}), o que facilita a sua permeabilidade pelas membranas biológicas (ZHU *et al.*, 2019). Após sua oxidação no organismo, o metal possui grande afinidade por grupos sulfidrilas de proteínas e, em menor grau, por grupos fosforilas, carboxílicos, aminas e amidas, induzindo alterações

biomoleculares. Nas células, o mercúrio é um potente desnaturador de proteínas e inibidor de aminoácidos, interferindo nas funções metabólicas celulares. Ele causa também sérios danos à membrana celular ao interferir em suas funções e no transporte de moléculas através desta (CAPPELLETTI *et al.*, 2019).

Nas plantas, o mercúrio pode reduzir o crescimento (YANG *et al.*, 2018), induzir a planta ao estresse oxidativo, resultando na peroxidação de lipídios, no vazamento de K⁺ e na alteração de atividades antioxidante (TRAN *et al.*, 2018), nas raízes bloqueia a captação e o transporte de nutriente (MARRUGO-NEGRETE *et al.*, 2016) e pode também, afetar negativamente a estrutura e funcionamento das proteínas dentro das plantas (NATASHA *et al.*, 2019). Os danos oxidativos por mercúrio nas células vegetais têm sido vinculados às características pró-oxidantes deste metal e a sua capacidade de contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio, como o radical ânion superóxido (O₂⁻), radical hidroxil (OH⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (GOUDARZ; KALANTAR; KALANTAR, 2017; TRAN *et al.*, 2018).

Safari *et al.* (2019) estudaram a espécie *Melissa officinalis* e observaram que a toxicidade do Hg nas plantas é através de sua ligação a grupos SH de proteínas, deslocamento de elementos essenciais e perturbação da estrutura da proteína. Indiretamente, o Hg pode induzir toxicidade para proteínas e outros biomoléculas via aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio - ROS e alteração na expressão de genes o que leva ao dano oxidativo às proteínas.

O acúmulo de metais nos solos pode prejudicar as plantas, conseqüentemente, afeta todo o ecossistema (SOOKSAWAT *et al.*, 2013). As plantas precisam de um conjunto de nutrientes inorgânicos essenciais que são exigidos para seu crescimento, desenvolvimento e reprodução. Outros elementos inorgânicos não essenciais, também podem ser absorvidos pelas raízes da planta, substituindo um nutriente essencial, o que pode causar um menor desenvolvimento destas (SHAHID *et al.*, 2019). O mercúrio, por exemplo, em altos níveis pode afetar a germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas de diversas espécies (SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado efetivo potencial das plantas em acumular Hg em sua biomassa (QIAN *et al.*, 2018) com tendência para acúmulo em maior proporção nas raízes do que na parte aérea (CABRITA *et al.*, 2019).

É importante destacar que cada metal pode impactar de uma forma diferente o desenvolvimento vegetal, sendo algumas plantas mais tolerantes a alguns elementos que a outros. Assim, o impacto da presença de metais nas plantas dependerá do tipo de metal, da sua biodisponibilidade e da espécie vegetal (KABATA-PENDIAS, 2011).

Considerando que a associação de plantas e micro-organismos pode ser importante para aumentar a remoção de compostos inorgânicos e orgânicos do solo e da água, pesquisas estão sendo realizadas para demonstrar a variedade de fontes vegetais que possuem propriedades bioativas para aprimorar métodos que protegam as plantas da ação tóxica dos metais. Relevante destacar que estes métodos, como por exemplo, a fitorremediação pode ser menos onerosos do que as tecnologias de remediação convencional para remediar ambientes contaminados por estes metais (SOUZA *et al.*, 2015 ; GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

1.3 FITORREMIDAÇÃO E BIOSSORÇÃO DE METAIS TÓXICOS

Na busca de alternativas para despoluir áreas contaminadas por diversos compostos orgânicos, tem-se optado por soluções que englobam: eficiência na descontaminação, simplicidade na execução, tempo demandado pelo processo e menor custo. Nesse contexto, cresce o interesse pela utilização da fitorremediação e biossorção, caracterizada como uma técnica que objetiva descontaminar solo e água através de organismos vivos, como plantas e micro-organismos (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

Fitorremediação do solo é um termo geral usado para designar um conjunto de tecnologias e práticas agronômicas que empregam plantas e micro-organismos associados para remediar solos contaminados. É uma técnica economicamente viável, aplicada *in situ* e apresenta elevado potencial de utilização. A utilização da fitorremediação é baseada na seletividade, natural ou desenvolvida, que algumas espécies exibem a determinados tipos de compostos ou mecanismos de ação (MUTHUSARAVANAN *et al.*, 2018).

Por exemplo, fitoextração, que se ocorre pela absorção do contaminante pelas raízes e sua acumulação na biomassa; fitoestimulação e fitovolatilização, que absorve o poluente do solo e o converte em uma forma volátil, podendo ser liberado para a atmosfera; fitoestabilização, que consiste na utilização de plantas para estabilizar contaminantes no solo; fitodegradação, em que há a degradação de poluentes orgânicos com o auxílio de enzimas; rizodegradação, que ocorre na rizosfera através de micro-organismos e enzimas que são liberadas pelas espécies vegetais e são capazes de degradar o contaminante (YADAV *et al.*, 2017).

Baixo custo de investimento e de operação, sua aplicabilidade *in situ*, e geração mínima de degradação e desestabilização da área a ser descontaminada são algumas das vantagens da fitorremediação (YADAV *et al.*, 2018) como destacado anteriormente. Sua efetividade está limitada pela capacidade da planta em sorver os metais das superfícies das partículas do solo e

da solubilidade desses metais. Todavia, estes podem ser solubilizados pela adição de agentes complexantes, fazendo com que as plantas aumentem a sua captação (MAHAR *et al.*, 2016). Espécies dos gêneros *Thlaspi*, *Urtica*, *Chenopodium*, *Polygonum* e *Alyssum* têm apresentado habilidade de extrair, acumular e tolerar altos níveis de metais tóxicos (DINDAROĞLU; BABUR; BÜLENT, 2019).

A biossorção, no que lhe concerne, pode ser definida como a remoção passiva de contaminantes de uma solução aquosa, por materiais de origem biológica, como biomassa não viva, ou por uso de micro-organismos, ocorrendo a adsorção física ou através da formação de complexos entre os contaminantes e os ligandos, ou grupos funcionais da biomassa, possibilitando a remediação da solução (BANO *et al.*, 2018).

Uma gama de biomateriais disponíveis na natureza tem sido empregada como biossorvente, incluindo biomassa de plantas, de animais, ou microbianas. Dentre as biomassas microbianas investigadas nos estudos de biossorção, estão as bactérias, cianobactérias, algas, microalgas, macroalgas e fungos (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

Como mecanismos de defesa para sobreviver em meio contaminado com metais potencialmente tóxicos e reduzir o efeito tóxico destes, os micro-organismos desenvolveram estratégias para biossorver, bioacumular, biomineralizar e biotransformar os contaminantes. Desse modo, têm sido constantemente utilizados para a recuperação e redução da toxicidade de áreas contaminadas (AYANGBENRO e BABALOLA, 2017).

Nessa perspectiva, encontram-se na literatura, vários estudos acerca da utilização de adsorventes naturais para remoção dos íons de metais. Pesquisas demonstram a eficácia de resíduos da casca de *Litchi* como adsorvente magnético para remoção de íons de chumbo em solução aquosa (JIANG *et al.*, 2015); cascas de laranja foram utilizadas em condições ótimas para a retirada de Cd (cádmio II), Cu (cobre II) e Pb (chumbo II) em soluções aquosas (LASHEEN; AMMAR; IBRAHIM, 2012); Akpomie *et al.* (2018), analisaram a remoção de metais tóxicos em efluente, utilizando a casca de arroz como adsorvente; o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e modificada também é eficiente na retirada de Pb e Cu (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

Muitas plantas tem desenvolvido mecanismos para lidar com a presença desse contaminante no meio (WAGNER-DÖBLER, 2013). O kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), assim como o milho (*Zea mays* L.), são plantas que vêm sendo estudadas por apresentarem potencial para remediação de metais potencialmente tóxicos (LI *et al.*, 2019); sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), cascas de mandioca e de castanha do Brasil vêm sendo também testadas como biossorventes e estudos demonstram que os resíduos utilizados como adsorventes

alternativos sejam uma opção sustentável e eficiente para a remediação de águas contaminadas com metais e agrotóxicos (GONÇALVES-JÚNIOR, 2013).

Algumas espécies já foram descritas como citoprotetoras aos efeitos tóxicos dos metais; o extrato etanólico de *Eugenia uniflora* e *Eugenia jambolana* quando associado ao cloreto de mercúrio desenvolveu um potencial citoprotetor em sementes de alface (CUNHA *et al.*, 2016 e SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2014); estudos de citoproteção com a utilização de células vegetais e bacterianas já foram realizados, avaliando o extrato de plantas de diferentes polaridades: *Duguetia furfuracea* (A. St. -Hil.) Saff (LIMA *et al.*, 2014); *Lygodium venustum* Sw (FIGUEREDO *et al.*, 2016) e *Psidium brownianum* Mart; (LEITE *et al.*, 2017).

1.4 CITOPROTEÇÃO FRENTE METAIS TÓXICOS

Um das consequências da biossorção é a citoproteção, que é definida como um conjunto de processos que podem ser acionados por uma droga ou composto que contribui para manter a integridade das estruturas celulares, preservando, assim, as células de adentrarem pelas vias da apoptose (SHORE e RUVKUN, 2013).

No estudo de Cunha *et al.* (2016), *Eugenia uniflora* apresentou fitocompostos em seu extrato etanólico, possivelmente, fenóis e flavonoides poderiam ser agentes interessantes para proteger diferentes organismos contra os danos do metal por um mecanismo quelante ou antioxidante. Assim como Figueredo *et al.* (2016), que obtiveram resultados significativos com o extrato e frações etanólicas de *Lygodium venustum*, indicando que esta espécie é uma alternativa de produto natural com atividade citoprotetora em bactérias, devido à presença de ácidos fenólicos e flavonoides com ação antioxidante e quelante. Nos resultados de Lima, *et al.* (2014), foi mostrado que o extrato da espécie *Duguetia furfuracea* foi promissor no controle da toxicidade de metais tóxicos, apresentando ação protetora em bactérias, demonstrado pelo aumento da concentração inibitória mínima destes metais.

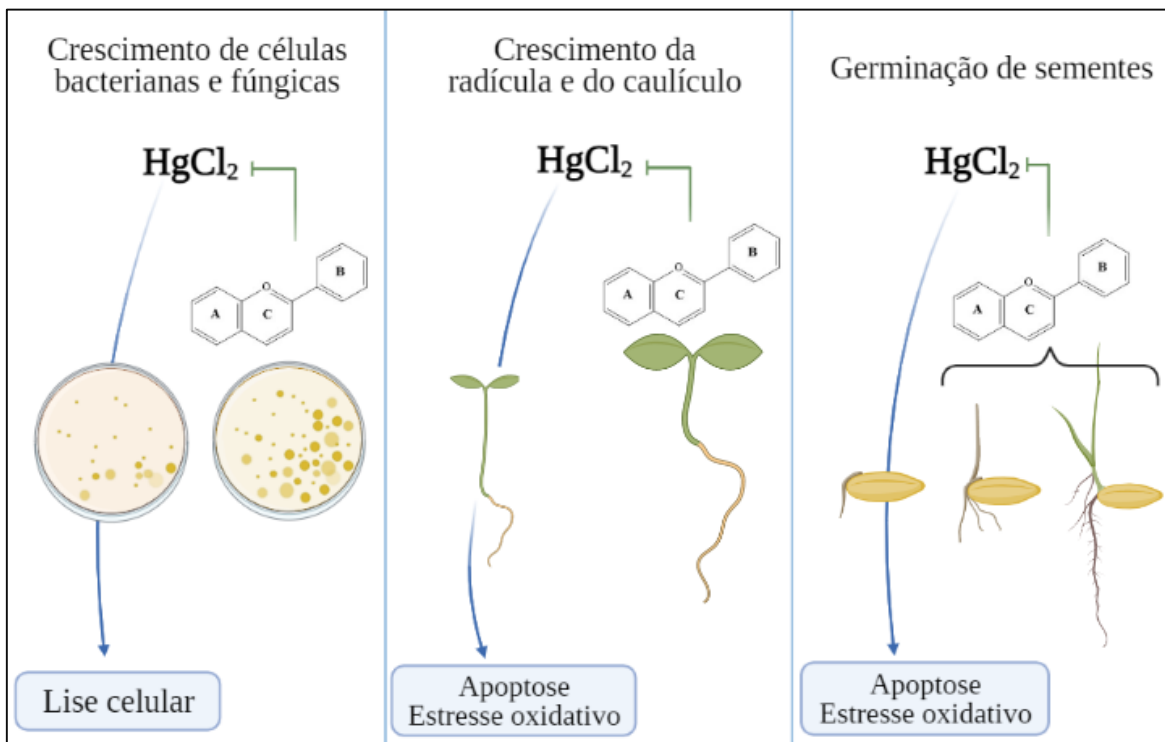
Com relação à proteção de vegetais, os resultados de Sobral-Souza e colaboradores (2014), demonstraram que o extrato etanólico da espécie de *Eugenia jambolana* Lam., apresentou crescimento na radícula e caulículo da *Lactuca sativa*, mostrando a efetiva proteção contra a toxicidade do cloreto de mercúrio, provavelmente por quelação deste metal.

Sobral-Souza *et al.* (2018) observam que o extrato etanólico de *Psidium brownianum* e suas frações possuíam propriedade citoprotetora contra a toxicidade do cloreto de mercúrio protegendo células microbianas e vegetais (*L. Sativa.*). Essa citoproteção está relacionada, possivelmente, aos efeitos antioxidantes de metabólitos secundários, principalmente os

flavonoides. Os mesmos autores observaram que as frações flavonóidicas do extrato de *Psidium guajava* reduziam o efeito fitotóxico do cloreto de mercúrio frente bactéria e plântulas de *L. Sativa*, sugerindo que esta atividade citoprotetora poderia estar relacionada ao efeito antioxidante de metabólitos secundários, especialmente flavonoides (SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2019).

Esses estudos foram importantes para compreender o mecanismo de citoproteção celular, promovido por metabólitos secundários de vegetais e mostrar o potencial que os produtos naturais, tem como agentes citoprotetores. Os resultados mostram que a atividade citoprotetora destes produtos podem ser devido à presença de ácidos fenólicos e flavonoides; sua ação antioxidante e quelante, pode estar envolvido na citoproteção observada (Figura 1); SOBRAL-SOUZA *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2016; FIGUEREDO *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2017).

Figura 1. Formas de avaliação do efeito citoprotetor dos flavonoides, frente à ação do cloreto de mercúrio (HgCl₂).



Fonte: o autor, 2021.

Também foi demonstrado no estudo de Leite *et al.* (2017), a citoproteção de radículas e caulículos da *Lactuca sativa*, quando associado ao extrato hidroalcoólico de *Psidium*

brownianum, e avaliado seu efeito quelante. Portanto, extratos vegetais e seus metabólitos, quando utilizados para diminuição da toxicidade de metais tóxicos como o mercúrio, têm potencial de se tornarem uma alternativa promissora na redução da contaminação ambiental e toxicidade associada, se usado e expandido em larga escala.

Todos os autores, anteriormente mencionados, em suas conclusões, sugerem que são ainda necessários mais estudos para verificar os efeitos de citoproteção, apontando que essas descobertas podem abrir uma nova perspectiva para a recuperação de ambientes contaminados por metais tóxicos. Então, a busca de novas alternativas para tratar solos contaminados pode estar nos produtos naturais e sintéticos, derivados de plantas (SINGH; BEHERA; KUMAR, 2019).

Os avanços da biotecnologia, nas últimas décadas, transformaram a diversidade biológica em uma importante fonte de matéria-prima e de recurso informacional, indispensável para os avanços de conhecimento científico e tecnológico, que visam minimizar os problemas de degradação ambiental. Portanto, uma das alternativas de uso sustentável da biodiversidade é a sua utilização na geração de processos, métodos ou produtos que visam à preservação de ambientes afetados pelo homem, principalmente (PATHAK *et. al.*, 2014).

Como foi visto anteriormente, há estudos na literatura que visam à fabricação de produtos, métodos ou processos elaborados a partir de espécies de plantas nativas da biodiversidade brasileira, ricas em metabólitos secundários, visando a fitorremediação e bioadsorção em ambientes. Portanto, ampliar a lista de produtos naturais com potencial biotecnológico de proteção ambiental e entender melhor os mecanismos de fitorremediação, bioadsorção e proteção celular são alguns dos fatores essenciais e desafiadores, que corroboram para conservação da natureza.

1.5 POTENCIAL ANTIOXIDANTE E QUELANTE DOS PRODUTOS NATURAIS

Antioxidantes são compostos que reagem com os radicais livres controlando o estresse oxidativo. Os compostos antioxidantes são fundamentais para a manutenção do equilíbrio do organismo, pois atuam no sequestro de radicais livres produzidos em excesso durante o processo metabólico (SZERLAUTH *et al.*, 2019). A maioria das plantas constitui fonte importante de antioxidantes naturais (LI *et al.*, 2014). Essas substâncias captam os íons metálicos do complexo molecular aos quais se encontram unidos, fixando-os por uma união coordenada chamada quelação (MARY; VIJAYAKUMAR; SHANKAR, 2018).

De acordo com Akbar *et al.* (2020), quando os níveis de espécies oxidativas reativas

ultrapassam o limite ideal, pode se considerar que a célula está em estresse oxidativo, o que eleva a quantidade de ROS na célula, sinalizando que ela está sofrendo danos como oxidação de proteínas, inibição enzimática, peroxidação de lipídeos até que leva a programação de morte celular, esse estresse não é bom para os seres vivos.

A atuação dos antioxidantes, portanto, é diversa, podendo agir sobre diferentes níveis na proteção dos organismos. Podem atuar como captadores de radicais e supressores de estados excitados, como sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam as espécies reativas de oxigênio, ou realizam ligações com íons metálicos às proteínas, tornando-os indisponíveis para a produção de espécies oxidantes (SZERLAUTH *et al.*, 2019).

De acordo com seu modo de ação, estes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com eles, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa inicial de autoxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (NEHA *et al.*, 2019; HIDALGO e ZAMORA, 2017).

Portanto, os antioxidantes classificados como secundários possuem como característica comum não atuarem diretamente na conversão de radicais livres em produtos de maior estabilidade. Neste grupo, estão presentes compostos que quelam metais de transição, que são importantes agentes envolvidos na etapa de propagação da oxidação lipídica (ANTUNES *et al.*, 2018). Os antioxidantes podem ser de origem sintética ou natural. Os de ocorrência natural estão amplamente distribuídos na natureza, presentes em frutas e vegetais, como carotenoides, compostos fenólicos, peptídeos e vitaminas (CARROCHO e FERREIRA, 2013).

Agentes quelantes também podem ser naturais ou sintéticos. Dentre os naturais, pode-se listar algumas algas e ácidos (ácido acético e ácido cítrico); e dentre os sintéticos estão o DMSA (ácido dimercaptosuccínico) e o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (AL-QAHTANI *et al.*, 2017; EDMUNDS *et al.*, 2017); são moléculas orgânicas que se ligam ao íon formando um complexo estável chamado quelato. Esta ligação diminui a possibilidade de formação de compostos insolúveis que podem se precipitar na solução do solo (água, íons e cátions). Ao mesmo tempo, o íon pode ser removido do quelato e absorvido pelas plantas (PAULILO; VIANA; RANDI, 2015).

A palavra quelato é oriunda do grego “*chele*”, cuja tradução é pinça ou garra. Isso se

deve às estruturas dos quelatos, resultado do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante. O átomo doador de elétrons é chamado de ligante e a molécula contendo este átomo, é a molécula ligante (MIESSLER; FISCHER; TARR, 2014).

O ligante é usualmente um ânion ou uma molécula que tem um átomo com um par de elétrons em valências disponíveis. Os quelatos de metal são compostos de coordenação, enquanto, nos sais de metais, o cátion se liga por interação eletrostática. Em um quelato, o ligante doa elétrons ao cátion. Uma vez quelado, as características físico-químicas do metal se alteram. Os componentes do quelato compartilham propriedades entre si, apesar de conservarem características exclusivas (KIM; KIM; KUMAR, 2019).

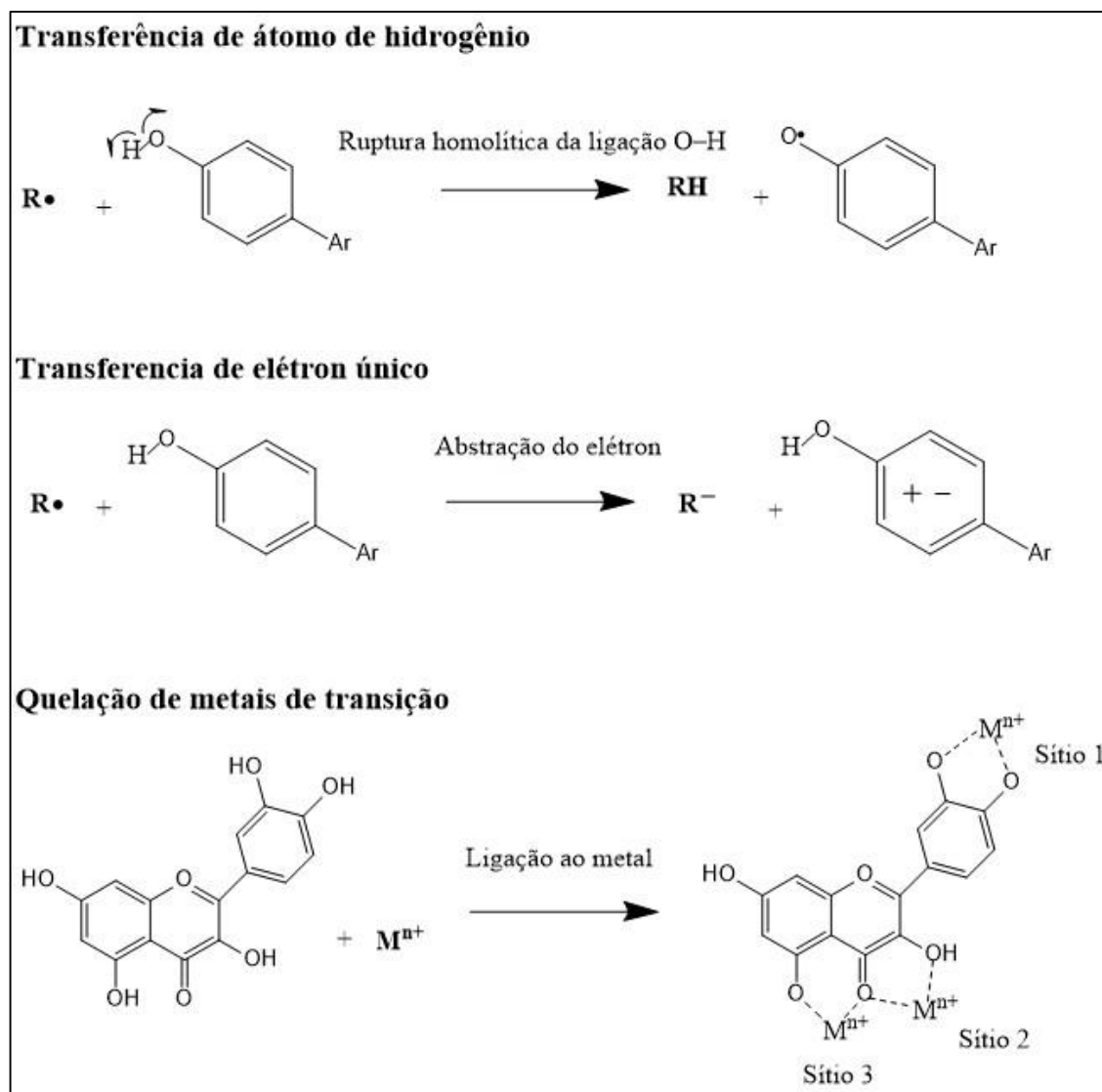
1.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, e normalmente encontram-se conjugados com mono e polissacarídeos (CARDONA *et al.*, 2013). A classificação dos compostos fenólicos permite distinguir estruturas comuns como os flavonoides, ácidos fenólicos, (hidrobenzoico e hidroxicinâmico), galotaninas, proantocianidina, estilbenos, ligninas, cumarinas, naftoquinonas, xantonas e floroglucinol (VOLF *et al.*, 2014), são considerados uma das principais classes de metabólitos secundários essenciais à fisiologia e metabolismo celular dos vegetais, atuando em seu crescimento e reprodução. Também possuem funções de defesa contra herbívoros, infecções microbianas, contra as radiações ultra-violeta do sol, além de atuarem como atrativos para insetos polinizadores e como agentes alelopáticos (TUNG MUNNITHUM *et al.*, 2018; OKSANA *et al.*, 2012).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é um tópico de interesse nas últimas décadas, visto que eles podem agir como agentes redutores, doadores de prótons, sequestradores de radicais livres e supressores do anion superóxido (BAUTISTA *et al.*, 2016). Desempenham importante papel na proteção celular, sequestrando ou inibindo as diversas espécies de oxigênio reativo, transferindo elétrons para radicais livres, ativando enzimas antioxidantes e inibindo enzimas oxidases, desempenhando forte ação na prevenção do estresse oxidativo (DUMITRIU *et al.*, 2015).

Seu potencial da ação antioxidante está relacionado ao número de hidroxilas substituintes ligadas ao anel aromático. Através da doação de hidrogênio, estes compostos agem como redutores e inibidores do oxigênio singlete, eliminando peróxidos e cessando a ação de radicais livres (Figura 2) (EMBUSCADO, 2015; LEOPOLDINI *et al.*, 2011).

Figura 2. Mecanismos da atividade antioxidante, representados pela transferência de um átomo de hidrogênio, abstração de elétrons do HOMO e quelação de metais de transição.



Fonte: o autor (2021), adaptado de LEOPOLDINI *et al.*, 2011.

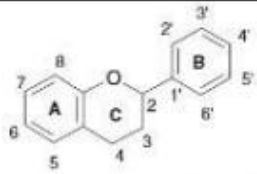
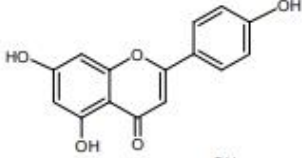
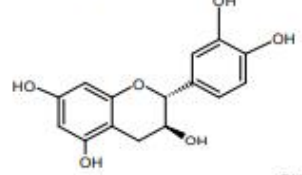
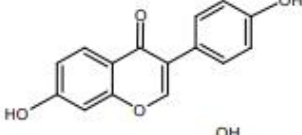
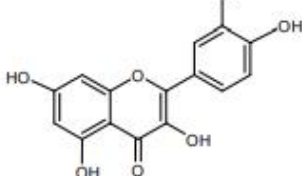
Os compostos fenólicos, como dito anteriormente, são metabólitos secundários, sintetizados pelas plantas, através das vias pentose-fosfato, chiquimato e fenilpropanoide, agrupando-se em 4 grupos principais: ácidos fenólicos, cumarinas, taninos e flavonoides (LAURA *et al.*, 2019).

1.6.1 Flavonoides

Flavonoides são compostos fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química e

se encontram sob diversas formas estruturais. A maioria dessa classe possui 15 átomos de carbono, em seu núcleo fundamental, na forma C6 – C3 – C6, baseada no núcleo de dois anéis benzênicos, A e B, ligados a um anel pirano, C (KOIRALA, 2016), representando o maior percentual dos compostos fenólicos disponíveis. O estado de oxidação, hidroxilação e substituinte do C3 determina a subclasse nas quais os flavonoides são classificados (Figura 3). (STALIKAS, 2007; PEREIRA e CARDOSO, 2012; ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017).

Figura 3: Algumas subclasses de flavonoides

Número de Carbonos	Classes	Estrutura Básica
C6-C3-C6	Flavonoides – Estrutura Básica	
C6-C3-C6	Flavonas – Apigenina	
C6-C3-C6	Flavanol – Catequina	
C6-C3-C6	Isoflavonas - Daidzeína	
C6-C3-C6	Flavonóis - Quercetina	

Fonte: Stalikas (2007).

Os flavonoides estão relacionados com uma grande variedade de atividades biológicas, destacando-se a ação antioxidante, anti-inflamatório, antiplaquetário, antitrombótico, cardioprotetor e inativação de radicais livres dentre outras funções relacionadas a patologias como a obesidade, diabetes, osteoporose, degeneração hepática e renal, cardiopatias, doenças geriátricas, entre outras (COLIZZI, 2019; KARAK *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2019).

Nas plantas diversas funções são atribuídas aos flavonoides, como por exemplo,

proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos; inibidores de enzimas e antioxidante (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017).

Os flavonoides são um dos compostos fenólicos mais estudados. São antioxidantes efetivos devido às suas propriedades sequestrantes e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica (VICENTE e BOSCAIU, 2018). Essas funções são importantes, pois moléculas que eliminam o peróxido de lipídeos, podem minimizar os danos oxidativos causados ao DNA, proteínas e carboidratos (LIMA e BEZERRA, 2012).

O papel fisiológico desses compostos, é prevenir danos a componentes celulares que surgem como consequência de reações químicas, envolvendo radicais livres (CHO *et al.*, 2013). Os flavonoides podem prevenir danos causados por radicais livres através dos seguintes mecanismos: neutralização direta de espécies reativas de oxigênio; ativação de enzimas antioxidantes; quelação de metais; redução de radicais α -tocoferil; inibição de oxidases; mitigação do estresse oxidativo causado pelo óxido nítrico; aumento nos níveis de ácido úrico e aumento da atividade de antioxidantes de baixo peso molecular. A capacidade antioxidante de alguns flavonoides, como a epigallocatequina galato, muitas vezes, é superior à das vitaminas C e E, e comparável a do α -tocoferol (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2011; ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017).

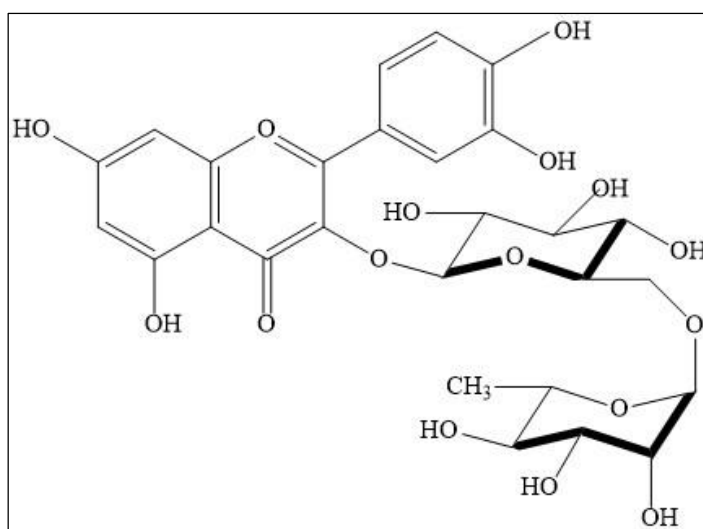
A capacidade antioxidante dos flavonoides aplica-se, sobretudo, na neutralização das espécies reativas de oxigênio (ROS), como os ânions peróxido, os radicais hidroxila, os peróxidos lipídicos e os hidroperóxidos, anulando, portanto, os efeitos nocivos dessas espécies sobre as células (KAURINOVIC e VASTAG, 2019).

A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil (OH) e o ânion superóxido (O^{2-}), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Além destes efeitos importantes, os flavonoides têm propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (ANOSIKE; IGBOEGWU; NWODO, 2019). Dentre estes estudos, destacam-se as pesquisas com a rutina, um flavonoide natural, que possui uma significativa atividade antioxidante com importante capacidade de proteção tecidual (AL-REJAIE *et al.*, 2013).

1.6.1.1 Rutina

O flavonoide rutina (Quercetin-3-rhamnoglucoside ou 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-ramnoglucosídeo) pertencente à classe dos flavonóis, possui como estrutura básica, uma molécula de quercetina, ligada a duas moléculas de glicose, sendo elas, respectivamente, uma glicose e uma rhamnose, substituintes na posição 3 do anel pirano. A combinação dessas duas moléculas é denominada rutinose, o que confere o nome ao composto (Figura 4) (BUDZYNSKA *et al.*, 2019). Por ser um flavonoide, a biossíntese da rutina inicia-se a partir da combinação das duas principais vias dos compostos fenólicos a via do chiquimato e a via do acetato.

Figura 4. Estrutura química da rutina.



Fonte: o autor (2021).

A rutina é derivada de uma flavona natural encontrada em abundância em trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) e também está presente em outras plantas, como aspargos e frutas cítricas (NGUYEN *et al.*, 2013). As espécies de *Bauhinia* possuem várias substâncias, como flavonoides livres e glicosilados, assim como a *B. purpúrea* da qual também foram isolados diversos flavonoides, entre eles a rutina (SANTOS *et al.*, 2014).

A rutina é encontrada, também, em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo sarraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto. É encontrada como relevante metabólito secundário nas folhas de várias plantas de florestas

tropicais e temperadas. Sendo que, muitas destas plantas são significativamente exploradas, principalmente para fins medicinais (THOMPSON *et al.*, 1999).

Dentre os flavonoides estudados, a rutina tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas (PEDRIALI, 2005), tais como: propriedades como potencial antidiabético (HAO *et al.*, 2012), neuroprotetivo (GULPINAR *et al.*, 2012), anticarcinogênico (CAPARICA *et al.*, 2020), antioxidante (MAHMOUD, 2012) e anti-inflamatório (LEE; KU; BAE, 2012), cardioprotetora, vasoprotetora, antiproliferativa, antitrombótica e citoprotetora (ARAÚJO, 2012).

Segundo os estudos de Afanas`ev e colaboradores (1989) que pesquisaram a atividade antioxidante da rutina e da quercetina, estes flavonoides têm uma ação terapêutica em patologias que envolvam radicais livres, e não são tóxicos, em especial a rutina. A diversidade de estudos e metodologias aplicadas confirmam a significativa atividade antioxidante da rutina, bem como seu efeito inibidor contra a peroxidação de lipídios, proteínas, membranas celulares e doenças mediadas por estresse oxidativo e ressaltam seu importante papel na proteção tecidual (AL-REJAIE *et al.*, 2013).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDOLALI, A. *et al.* Application of a breakthrough biosorbent for removing heavy metals from synthetic and real wastewaters in a lab-scale continuous fixed-bed column. **Bioresource Technology**, v. 229, p.78-87, 2017.

AKBAR, M. *et al.* Antibacterial and activities of Slender Amaranth Wee. **Sociedade Brasileira da ciência das plantas Daninhas: Planta Daninha**; v. 38, p. e020192974, 2020.

AFANAS'EV, J. B. *et al.* Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology, Amsterdam**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.

AKPOMIE, K. G. *et al.* Heavy metal remediation from automobile effluent by thermally treated montmorillonite-rice husk composite. **Transactions of the Royal Society of South Africa**, v. 73, n. 3, p. 254-263, 2018.

AL-QAHTANI, K. M. A. *et al.* Extraction heavy metals from contaminated water using chelating agents. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 1698-1704, 2017.

AL-REJAIE, S. S. *et al.* Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Westar rat. **BMC complementary and alternative medicine**, Londres, v.13, n.1, p.1, 2013.

AYANGBENRO, A. S.; BABALOLA, O. O. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, p. 94-109, 2017.

ANOSIKE, C. A.; IGBOEGWU, O. N.; NWODO, O. F. C. Antioxidant properties and membrane stabilization effects of methanol extract of *Mucuna pruriens* leaves on normal and sickle erythrocytes. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 9, n. 4, p. 278-284, 2019.

ANTUNES, M. C. *et al.* Correlating different techniques in the thermooxidative degradation monitoring of high-density polyethylene containing pro-degradant and antioxidants. **Polymer Testing**, v. 69, p. 182-187, 2018.

ARAÚJO, M. E. M. B. **Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática**, 2012, 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, São Paulo, 2012.

ARMAH, F. A., QUANSAH, R.; LUGINAAH, I. A. Systematic review of heavy metals of anthropogenic origin in environmental media and biota in the context of gold mining in Ghana. **International Scholarly Research Notices**, 2014.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1-18, 2016.

BANO, A. *et al.* Biosorption of heavy metals by obligate halophilic fungi. **Chemosphere**, v. 199, p. 218-222, 2018.

BAUTISTA, I. *et al.* Environmentally induced changes in antioxidant phenolic compounds levels in wild plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 1, p. 9, 2016.

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.

BRADBERRY, S. M. Metals (cobalt, copper, lead, mercury). **Medicine**, v. 44, n. 3, p. 182-184, 2016.

BROMBACH, C.; PICHLER, T. Determination of ultra-low volatile mercury concentrations in sulfur-rich gases and liquids. **Talanta**, v. 199, p. 277-284, 2019.

BUDZYNSKA, B. *et al.* Rutin as neuroprotective agent: from bench to bedside. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 27, p. 5152-5164, 2019.

CABRITA, M. T. *et al.* Mercury mobility and effects in the salt-marsh plant *Halimione portulacoides*: Uptake, transport, and toxicity and tolerance mechanisms. **Science of The Total Environment**, v. 650, p.111-120, 2019.

CAPARICA, R. *et al.* Anticancer activity of rutin and its combination with ionic liquids on renal cells. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 233, 2020.

CAPPELLETTI, S. *et al.* Mercuric chloride poisoning: symptoms, analysis, therapies, and autoptic findings. A review of the literature. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 329-341, 2019.

CARDONA, F. *et al.* Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1415–1422, 2013.

CARROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-33, 2013.

CARVALHO, G. S, *et al.* Selenium and mercury in Brazilian Cerrado soils and their relationships with physical and chemical soil characteristics. **Chemosphere**, v. 218, p. 412 -415, 2019.

CHABUKDHARA, M.; NEMA, A. K. Assessment of heavy metal contamination in Hindon River sediments: a chemometric and geochemical approach. **Chemosphere**, v. 87, n. 8, p.945-53, 2012.

CHO, J. G. *et al.* Flavonoids from the Grains of C1/R-S Transgenic Rice, the Transgenic *Oryza sativa* spp. japonica, and Their Radical Scavenging Activities. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 61, n.43, p. 10354–10359, 2013.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard ninth. Ed. CLSI Document M07-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institution**, Wayne, PA, 2013.

COLIZZI, C. The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: a systematic review. **Translational Research & Clinical Interventions**, v. 5, p. 184-196, 2019.

CUNHA, F. A. B. *et al.* Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant Mercury chloride. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

DAS, N.; BASAK, L. V. G.; SALAM, J. S.; ABIGAIL, M. E. A. Application of biofilms on remediation of pollutants – An overview. **Journal Microbiology Biotechnology Research**, v.2 n. 5, p 783-790, 2012.

DAVID, A. V. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 20, p. 84, 2016.

DE ALMEIDA RODRIGUES, P. *et al.* Mercury in aquatic fauna contamination: a systematic review on its dynamics and potential health risks. **Journal of Environmental Sciences**, v. 84, p. 205-218, 2019.

DIAS, D. *et al.* Inorganic mercury intoxication: A case report. **Forensic science international**, v. 259, p. e20-e24, 2016.

DINDAROĞLU, T.; BABUR, E.; BÜLENT, L. A. Z. Ultramafik topraklardaki *Alyssum pateri* subsp. *Pateri bitkisinin ekolojisi* ve ağır metal tolerans sınırının belirlenmesi. **Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi**, v. 7, n. 2, p. 110-120, 2019.

DOS SANTOS, V. C. G. *et al.* Copper ions adsorption from aqueous medium using the biosorbent sugarcane bagasse in natura and chemically modified. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 216, n. 1-4, p. 351-359, 2011.

DUMITRIU, D. *et al.* Grape pomace extract improves the *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties of wines from sun light dried Pedro Ximénez grapes. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 380-387, 2015.

EDMUNDS, C. W. *et al.* Using a chelating agent to generate low ash bioenergy feedstock. **Biomass and Bioenergy**, v. 96, p. 12-18, 2017.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811–819, 2015.

FIGUEREDO, F. G. *et al.* Cytoprotective effect of *Lygodium venustum* Sw. (Lygodiaceae) against mercurium chloride toxicity. **Scientifica**, p. 1-5, 2016.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 3-14, 2014.

GADKARI, P. V.; BALARAMAN, M. Catechins: Sources, extraction and encapsulation: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 122-138, 2015.

GIL-CHÁVEZ, G. J. *et al.* Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in food Safety**, v.12, p 5-23, 2013.

GONÇALVES JUNIOR, A. C. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais adsorventes alternativos, visando à remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. **Inclusão Social**, v. 6, n. 2, p.105-113, 2013.

GOUDARZI, M.; KALANTAR, M.; KALANTAR, H. The hepatoprotective effect of gallic acid on mercuric chloride-induced liver damage in rats. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 12, n. 4, p. 16537 2017.

GULPINAR, A. R. *et al.* Estimation of in vitro neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 536-543, 2012.

GUTIÉRREZ-MOSQUERA, H. *et al.* Mercury levels in human population from a mining 2 district in Western Colombia. **Journal of Environmental Sciences**, v. 68, p. 83-90, 2017.

GWOREK, B. *et al.* Air contamination by mercury, emissions and transformations - a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 4, p. 1-31, 2017.

HAO, H. H. *et al.* Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 19, p. 959-967, 2012.

HARIKA, V. K. *et al.* Sustainable existence of solid mercury (Hg) nanoparticles at room temperature and their applications. **Chemical Science**, v. 12, n. 9, p. 3226-3238, 2021.

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

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Food processing antioxidants. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 81, p. 31-64, 2017.

JIANG, R. *et al.* A novel magnetic adsorbent based on waste litchi peels for removing Pb (II) from aqueous solution. **Journal of Environmental Management**, v.155, p. 24-30, 2015.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2011.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. J. R. Free radical scavenging an antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicines and Biology**, v. 366, p. 351-376, 1994.

KARAK, P. Biological activities of flavonoids: an overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 4, p. 1567-1574, 2019.

KAURINOVIC, B.; VASTAG, D. Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. In: SHALABY, E. (Ed.). **Antioxidants**. London: IntechOpen, 2019. p. 1-20.

KIM, J.; KIM, Y.; KUMAR, V. Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 226-231, 2019.

KOIRALA, N. *et al.* Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 86, p. 103-116, 2016.

LASHEEN, N. R.; AMMAR, N. S.; IBRAHIM, H. S. Adsorption desorption of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) using chemically modified orange peel: equilibrium and kinetic studies. **Solid State Sciences**, v. 14, n.2, p. 202 -210, 2012.

LAURA, A. *et al.* Phenolic compounds. In: YAHIA, E. M. (Ed.). **Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2019. p. 253-271.

LEE, W.; KU, S. K.; BAE, J. S. Barrier protective effects of rutin in LPS - induced inflammation in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3048-3055, 2012.

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

LEITE, N. F. *et al.* Reduction of the toxic effect of mercurium chloride by chelating effect of *Psidium brownianum* Mart. Ex D.C **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 119, p. 538-541, 2017.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011.

LESJAK, M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 68-75, 2018.

LI, S. *et al.* Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 4, p. 110-116, 2014.

LI, Y. *et al.* Influence of sulfur on the accumulation of mercury in rice plant (*Oryza sativa* L.) growing in mercury contaminated soils. **Chemosphere**, v. 182, p. 293-300, 2017.

LI, X, *et al.* Occurrence, fate, and transport of potentially toxic metals (PTMs) in an alkaline rhizosphere soil-plant (*Zea mays* L.) system: the role of *Bacillus subtilis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p.5564–5576, 2019.

LIMA, C. N. *et al.* Protective action of *Duguetia furfuracea* (A. St. – Hil) saff against toxicity due to Mercury chloride in *Escherichia coli*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v, 19, n.1, p. 179-188, 2014.

LIMA, F. R. D. *et al.* Critical mercury concentration in tropical soils: impact on plants and soil biological attributes. **Science of the Total Environment**, v. 666, p. 472-479, 2019.

LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoids and free radicals. **Disciplinarum Scientia**, v.13, n.1, p. 111-124, 2021.

MA, M.; DU, H.; WANG, D. Mercury methylation by anaerobic microorganisms: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 20, p. 1893-1936, 2019.

MACIEL, G. M. *et al.* Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Trametes sp.* **Chemical Engineering Journal**, v. 215, p. 331-338, 2013.

MAHAR, Amanullah *et al.* Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 111-121, 2016.

MAHBUB, K. R. *et al.* Mercury toxicity to terrestrial biota. **Ecological Indicators**, v. 74, p. 451-462, 2017.

MAHMOUD, A. M. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 7, p. 783-789, 2012.

MANAVI, P. N.; MAZUMDER, A. Potential risk of mercury to human health in three species

of fish from the southern Caspian Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, p. 1-5, 2018.

MARRUGO-NEGRETE, J. *et al.* Mercury uptake and effects on growth in *Jatropha curcas*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 48, p. 120-125, 2016.

MARTINS, N. *et al.* Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. **Food Chemistry**, v. 170, p. 378-385, 2015.

MARY, C. P. V.; VIJAYAKUMAR, S.; SHANKAR, R. Metal chelating ability and antioxidant properties of Curcumin-metal complexes—A DFT approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 79, p. 1-14, 2018.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of art for the biosorption process – A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1389-1416, 2013.

MIESSLER, G. L.; FISCHER, P. J.; TARR, D. A. **Química inorgânica**. 5. ed. São Paulo: Pearson Education do Brazil, 2014.

MUTHUSARAVANAN, S. *et al.* Phytoremediation of heavy metals: mechanisms, methods and enhancements. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 4, p. 1339-1359, 2018.

NATASHA, M. S. *et al.* A critical review of mercury speciation, bioavailability, toxicity and detoxification in soil-plant environment: Ecotoxicology and health risk assessment. **Science of the Total Environment**, S0048-9697(19)34740-0, 2019.

NEHA, K. *et al.* Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687-704, 2019.

NGUYEN, T. A. *et al.* An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. **Food chemistry**, v. 136, n. 1, p. 186-192, 2013.

OKSANA, S. *et al.* Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 13, p. 2526-2539, 2012.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, p. 01-15, 2016.

PAULINO, M. T. S.; VIANA, A. M.; RANDI, A. M. **Fisiologia vegetal**. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

PATHAK, M. R.; ABIDO, M. S. The role of biotechnology in the conservation of biodiversity. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 2, n. 4, p. 352-363, 2014.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina**: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, M. *et al.* Industrial-era lead and mercury contamination in southern Greenland implicates North American sources. **Science of the Total Environment**, v. 613, p. 919-930, 2018.

PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C. G. Research trends in flavonoids and health. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 646, p. 107-112, 2018.

PIMENTEL, A. M. R. **Remoção de Co (II) e Mn (II) de soluções aquosas utilizando a biomassa *R. opacus***. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos do Departamento de Engenharia de Materiais, PUC – Rio. Rio de Janeiro, 2011.

PROCHÁZKOVÁ, D., BOUSOVÁ, I., WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, p. 513-523, 2011.

QIAN, X. *et al.* Total mercury and methylmercury accumulation in wild plants grown at wastelands composed of mine tailings: Insights into potential candidates for phytoremediation. **Environmental Pollution**, v. 239, p. 757-767, 2018.

RIAZ, A. *et al.* Mercury contamination in the blood, urine, hair and nails of the gold washers and its human health risk during extraction of placer gold along Gilgit, Hunza and Indus rivers in Gilgit-Baltistan, Pakistan. **Environmental Technology & Innovation**, v. 5, p. 22-29, 2016.

RIBEIRO, V. R. *et al.* Bringing together *Saccharomyces cerevisiae* and bioactive compounds from plants: A new function for well-know biosorbent. **Journal of Functional Foods**, v. 60, n. 103433, p. 9, 2019.

ROCHA, J.E. *et al.* Identification of the gallic acid mechanism of action on mercury chloride toxicity reduction using infrared spectroscopy and antioxidant assays. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2019a.

ROCHA, J. E. *et al.* Mercury chloride phytotoxicity reduction using antioxidative mechanisms evidenced by caffeic acid FTIR. **Applied Geochemistry**, v. 104, p. 109–115, 2019b.

ROCHA, J. E. *et al.* FTIR analysis of pyrogallol and phytotoxicity-reductive effect against mercury chloride. **Environ Geochem Health**, v. 43, p. 2433-2442, 2021.

ROSSA, U. B. **Produtividade e compostos foliares de erva-mate sob efeitos de luminosidade e fertilização**. 2013, 208f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SAFARI, F. *et al.* Physiological and molecular mechanisms underlying salicylic acid-mitigated mercury toxicity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 18, p. 109542, 2019.

SANTOS, P. M. *et al.* Perfil de flavonoides e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico de *Bauhinia purpúrea* (Fabaceae) da região amazônica. **Revista Química Nova**, v.37, n. 1, p. 89-94, 2014.

SHAHID, N. et al. A critical review of mercury speciation, bioavailability, toxicity and detoxification in soil-plant environment: Ecotoxicology and health risk assessment. **Science of the total environment**, p. 1-86, 2019.

SHORE, D. E.; RUVKUN, G. A cytoprotective perspective on longevity regulation. **Trends in cell biology**, v. 23, n. 9, p. 409-420, 2013.

SINGH, R.; BEHERA, M.; KUMAR, S. Nano-bioremediation: An innovative remediation technology for treatment and management of contaminated sites. **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety**, v. 7, p.165–182, 2019.

SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, p. 165-170, 2014.

SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. LC-MS Analysis and Cytoprotective effect against the Mercurium and Aluminium Toxicity by Bioactive products of *Psidium brownianum* Mart. ex DC. **Journal of Hazardous Materials**, 2018.

SOBRAL-SOUZA, C. E. et al. *Psidium guajava* bioactive product chemical analysis and heavy metal toxicity reduction, **Chemosphere**, 2019.

SOOKSAWAT, N. et al. Phytoremediation potential of charophytes: Bioaccumulation and toxicity studies of cadmium, lead and zinc. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 3, p. 596–604, 2013.

SOUZA, A. H. P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v. 78, p. 286–294, 2015.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

SZERLAUTH, A. et al. Radical scavenging activity of plant extracts from improved

processing. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02763, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 820p.

TRAN, T. A. T. *et al.* Detoxification of mercury in soil by selenite and related mechanisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 159, p. 77-84, 2018.

TUNGMUNNITHUM, D. *et al.* Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.

THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C. M., Position of the American Dietetic Association, Orlando, v. 99, n. 10, p. 1280- 1281, 1999.

UNEP (United Nations Environment Programme). **Chemicals and water, global mercury assessment, Sources, emissions, releases and environmental Transport Chemicals Branch, Geneva, Switzerland**. Disponível em: <<https://wedocs.unep.org>. Acesso em : 14. Out. 2020.

VÄNSKA, M. *et. al.* Toxic Environment of war: Maternal prenatal heavy metal load predicts infant emotional development. **Infant Behavior and Development**, v. 55, p. 1-9, 2019.

VICENTE, O.; BOSCAIU, M. Flavonoids: Antioxidant compounds for plant defence... and for a healthy human diet. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 46, n. 1, p. 14-21, 2018.

VOLF, I. *et al.* Thermal stability, antioxidant activity and photo-oxidation of natural polyphenóis. **Chemical Papers**, v. 68, n. 1, p. 121-129, 2014.

WAGNER-DÖBLER, I. Bioremediation of mercury. Current research and industrial applications. Norfolk: **Caister Scientific Press**, p. 143, 2013.

WU, J. *et al.* Antioxidant and antimicrobial effects of catechin liposomes on chinese dried pork. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 5, p. 827-834, 2018.

YADAV, H. *et al.* Improving the applicability of rock phosphate to alkaline soils by organic compost. **Applies Soil Ecology**, v.113, p. 80-85, 2017.

YADAV, K. K. *et al.* Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: a review on application and future prospects. **Ecological Engineering**, v. 120, p. 274-298, 2018.

YAN, X. *et al.* How human activities affect heavy metal contamination of soil and sediment in a long-term reclaimed area of the Liaohe River Delta, North China. **Sustainability**, v. 10, n. 2, p. 338, 2018.

YANG, J. *et al.* A comparison of growth on mercuric chloride for three Lemnaceae species reveals differences in growth dynamics that effect their suitability for use in either monitoring or remediating ecosystems contaminated with mercury. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, p. 112, 2018.

YANG, L. *et al.* Toxicity of mercury: Molecular evidence. **Chemosphere**, v. 245, p. 125586, 2020.

YE, J.; AUGUSTIN, M. A. Nano-and micro-particles for delivery of catechins: Physical and biological performance. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1563-1579, 2019.

YNALVEZ, R.; GUTIERREZ, J.; GONZALEZ-CANTU, H. Mini-review: toxicity of mercury as a consequence of enzyme alteration. **Biometals**, v. 29, n. 5, p. 781-788, 2016.

ZAHRA, N.; KALIM, I. Perilous effects of heavy metals contamination on human health. **Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2017.

ZHU, J. *et al.* Comparative effects of mercury chloride and methylmercury exposure on early neurodevelopment in *Zebra fish* larvae. **RSC Advances**, v. 9, n. 19, p. 10766-10775, 2019.

ZUANAZZI, J. A. S; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

CAPÍTULO 2: REDUCTION OF THE PHYTOTOXIC EFFECT OF MERCURY CHLORIDE BY RUTIN AND EVALUATION OF INTERACTIONS BY VIBRATIONAL SPECTROSCOPY (RAMAN AND FTIR)

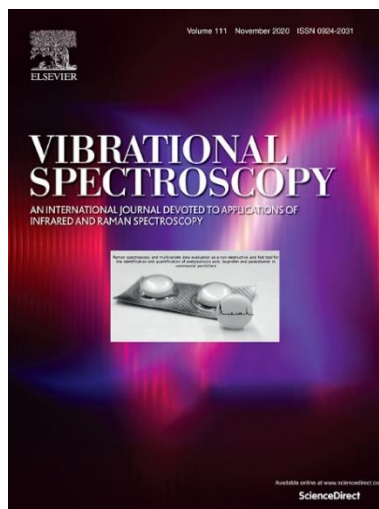
(ARTIGO 1)

Yedda M. L. S. de Matos, Daniel L. M. Vasconcelos, Antonio C. H. Barreto, Janaina E. Rocha, José B. Neto, Fabia F. Campina, Tássia T. de A. M. Guedes, Amanda K. Sousa, Raimundo N. P. Teixeira, Juan C. Alvarez-Pizarro, Henrique D. M. Coutinho, João H. da Silva.

Artigo publicado no periódico: *Journal Vibrational Spectroscopy* (Anexo A)

Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103084>

Fator de Impacto: 1.9



Reduction of the phytotoxic effect of mercury chloride by rutin and evaluation of interactions by vibrational spectroscopy (Raman and FTIR).

Yedda M. L. S. de Matos, Daniel L. M. Vasconcelos, Antonio C. H. Barreto, Janaina E. Rocha, José B. Neto, Fabia F. Campina, Tássia T. de A. M. Guedes, Amanda K. Sousa, Raimundo N. P. Teixeira, Juan C. Alvarez-Pizarro, Henrique D. M. Coutinho, João H. da Silva.

ABSTRACT

Toxic metals can cause toxicity problems in the organisms exposed to them. Many substances are able to reverse this toxicity. Among the secondary metabolites of plant origin investigated are flavonoids. To evaluate the cytoprotective activity, dry mass and possible damage to the membranes of *Lactuca sativa* (lettuce) seedlings subjected to different concentrations of mercury chloride in association with rutin in suballelopathic concentration were determined. It was observed that rutin gives cytoprotection to lettuce seedlings, allowing greater growth and development of the roots of these seedlings, probably through the coordination of mercury with the rutin molecule. The interaction of rutin with mercury chloride was evidenced through vibrational spectroscopy (Raman and FTIR). Although mercury chloride causes cytotoxicity in several plant species, its complex with rutin can mitigate these effects.

Key words: Antioxidant; Cytoprotection; Infrared spectroscopy; Toxic Metals; Rutin

1. Introduction

Pollution of the biosphere in toxic metals has quite accelerated since the beginning of the industrial revolution, being that it is one of the biggest environmental problems nowadays and represents a risk to human health and ecosystems [1]. Mercury, derived from industrial activity [2], is considered one of the most toxic metals.

To remedy polluted effluents from toxic metals, a wide range of physical-chemical /biological treatment technologies, such as chemical precipitation, extraction, ion exchange, filtration, reverse osmosis, membrane bioreactor and electrochemical techniques [3] are currently employed in industries.

The prospecting of natural products is a promising field of study that has helped to confirm active principles of plants or their respective bioactivities.

The cytoprotectant flavonoid effect is related to its antioxidant and chelating capacity, acting on the scavenging of free radicals [4], properties that would help decontaminate environments with heavy metals [5].

Rutin is a flavonoid belonging to the flavonoid class. It has been the object of study in several studies that aimed to elucidate its possible actions, functionalities and mechanisms of action. Some already described are: antioxidant action [6] anti-inflammatory [7] and able to scavenge oxygen free radicals [8].

In this context, the main objective of this work was to determine the cytoprotective effect of rutin against the toxic action of mercury chloride, through the evaluation of membrane damage and the initial growth of *L. sativa*. In addition, to evaluate the coordination capacity of rutin with mercury chloride through vibrational spectroscopy (FTIR and Raman).

2. Materials and methods

2.1. Evaluation

2.1.1. Evaluation of the cytoprotective effect of rutin in *Lactuca sativa* against mercury chloride

To perform the test, Petri dishes were prepared. For the concentrations used, a sublethal concentration of the extract and fractions (8 µg/mL) and mercury chloride (HgCl₂) were used, ranging from 1.25 mM to 0.05 mM, according to Coutinho [9]. The parameters analyzed at the end of seven days were: germinated seed count, germination rate index (GRI), biometrics,

occurrence of root necrosis and seedling abnormalities, following the Seed Analysis Rules Manual described by [10]. The tests were done in triplicate and expressed as mean.

2.1.2. Electrolyte Leak Test

The percentage of damage to stem membranes and rootlets of germinated lettuce seeds was estimated using the electrolyte leak method described by Blum e Ebercon [11]. These plant tissues were separated and incubated in 25 mL of deionized water for a period of 2 hours at a temperature of 25 ° C. After that time, the electrical conductivity of the incubation solution was measured using an Oakton COM 700 conductivity meter. This first electrical conductivity reading was called L1. Then, each tissue in its respective solution will be incubated in a water bath at 75 ° C for 30 minutes to release the cell electrolytes, cooled to room temperature and determine the electrical conductivity of the solution as previously indicated. This second reading was called L2. The following formula was used to calculate the percentage of membrane damage: $VE (\%) = (L2 / L1) \times 100$, where % VE = percentage of membrane damage; L1 = Initial reading and L2 = Final reading.

2.1.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

For the analysis of the samples, an infrared absorption spectrometer by Fourier FT-IR VERTEX 70V, of the Bruker brand, was used. A Globar source is used for the medium infrared (MIR) region equipped with DL to TGS pyroelectric detectors to capture signals emitted from the sample. This equipment has a HeNe laser source with 633 nm of wavelength that allows the calibration of the optical path of the infrared beam next to the spectrometer mirrors. This Spectrometer operates with a resolution of 2 cm^{-1} and a wide-range beam divider (beamsplitter) composed of silicon that allows its use for measurements in the middle region. The use of vacuum in these experiments is important to improve the sensitivity of the detector.

2.1.4. Fourier Transform Raman Spectroscopy

The FT-Raman spectrum was recorded in the wavenumber range from 40 to 4000 cm^{-1} using a compacted powder of the sample in the sample holder of a Bruker RAM II FT-Raman module coupled to the VERTEX 70 spectrometer as well as a liquid nitrogen cooled high-sensitivity Ge detector. The samples were excited with the 1064nm line of a Nd: YAG laser

and we obtained a typical resolution of $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$ with accumulation of 60 scans per spectra and a nominal laser power of 150 mW.

2.2. Statistical analysis

All determinations were performed in triplicate and the results of chemical and vegetable tests were analyzed by calculating the arithmetic means with Bonferroni and ANOVA.

3. Results and discussion

3.1. Growth of stems and roots

In this result it is presented the evaluation of the dry mass of the lettuce seeds submitted to the highest and the lowest concentration of mercury chloride and the association of these with the rutin. The results show that the highest concentration of mercury chloride in the presence of rutin inhibited seedling growth; however, at the lowest concentration (0.05 mM) there was a better development and growth of seedlings, especially of the stem, the same not happening with the roots (Fig.1). This result can be explained by the fact that the roots absorb metal more quickly. The increase in dry mass indicates that the flavonoid rutin provides cytoprotection of lettuce seedlings preserving their plant tissues.

Similar results were obtained by [12] and [13], who performed similar tests using gallic and caffeic acids in association with mercury chloride. These authors observed a better root growth of lettuce seedlings than when the metal was used in the same concentration isolately.

Studies by Cunha [14] and Sobral-Souza [5] show the ethanolic extract of *Eugenia uniflora* associated with mercury chloride, promoting significant cytoprotection, since the growth of lettuce seedlings is better. In these studies, we propose that a cytoprotection would be due to the presence of flavonoids.

3.2. Electrolyte Leaks

In this test, membrane damage in *L. sativa* caused by 0.05 mM mercury chloride was observed in the absence and presence of rutin. Membrane damage was measured to observe the stability of *L. sativa* cell membranes as a function of mercury chloride concentrations when

associated with rutin or alone. In this initial growth phase, observation of membrane damage is fundamental and represents a good indicator for understand the toxic effect of the metal and the cytoprotective role of rutin.

In Fig. 2, the results show that in the presence of rutin, the damage to membranes caused by mercury chloride has a level similar to that observed in control plants (treated only with mercury only). This preliminary result initially suggests this possible cytoprotective action of rutin, mainly on the roots; however, other approaches must be taken to support these observations further.

The presence of mercury in soils alters the normal development of vegetables, causing a reduction in metabolism, transpiration, absorption of inorganic compounds and growth, especially of roots, which have direct contact with the toxic metal [15] and [16] corroborating the results observed in the roots of *L. sativa*. Photosynthesis is also impaired, mainly by inhibition of the enzyme delta-aminolevulinatase (δ -ALA-D), sensitive to mercury [17].

Zhou *et al.* [18] in the study on HgCl_2 phytotoxicity in *Triticum aestivum* L., demonstrated that membrane damage is caused by lipid peroxidation that causes greater electrolyte leakage. This oxidative stress is due to the formation of free radicals and reactive oxygen species (ROS), induced by the excess of toxic metals [19].

In this sense, it is suggested that the cytoprotection afforded by rutin in lettuce stems is due to an antioxidant mechanism, capturing free radicals and reducing damage to the plasma membrane. This fact is also made possible by the lower accumulation of HgCl_2 in the stem, since its absorption occurs in the roots, impaired to a greater degree [20] and [21].

3.3. FT Raman and FTIR spectroscopy

Figure 3 shows the Raman spectrum of pure rutin and associated with 0.05 mM mercury chloride solutions for a spectral region between 50 and 1800 cm^{-1} . Between these regions we can observe a change in the intensity of the bands 166, 282 and 314 cm^{-1} , evidencing, thus, the coordination of the mercury present in the rutin molecule associated to the 0.05 mM mercury chloride corroborating with the leakage tests of electrolytes.

The classification of the vibrational modes is shown in Table 1. With the exception of the modes at 314, 282 and 166 cm^{-1} , the others are associated with the vibrations of molecular groups in the rutin, giving evidence that the modes at 314, 282 and 168 cm^{-1} are related to movements of mercury associated with rutin. The 166 cm^{-1} mode can refer to the movement of

the rutin network associated with mercury. The relative intensities of the modes obey the same relationship as can be well observed in the modes between 1200 and 1800 cm^{-1} , thus indicating that mercury is strongly associated with the material network. Such an association occurs through coordination links between the mercury atom and oxygen ions. While the modes at 282 and 314 cm^{-1} may be related to the $\text{Hg}^{2+} \text{O}^-$ group.

The band 314 cm^{-1} can be attributed to deformation of the hydroxyl (OH), present in the phenolic groups. The peak of 282 cm^{-1} observed in the rutin conjugated to HgCl_2 at 0.05 mM is attributed when stretching the Hg-Cl, ν (Hg-Cl) [22].

Fig. 4 shows the spectrum in the infrared region of pure rutin and conjugated to mercury chloride (HgCl_2) 0.05 mM for a spectral region between 4000 and 500 cm^{-1} . The wide and intense band at 3424 cm^{-1} can be attributed to the stretching of the O-H group. It appears due to its great change in the dipole moment. The band in the 1660 cm^{-1} region can be attributed to the stretching of the carbonyl. It is possible to notice a reduction in the intensity of this band in the conjugated metal-rutin concentration at 0.05 mM. [24]. This attribution is similar to the work of Santos and Sussuchi [25] who, when studying the complexation between Cobalt (II) and Quercetin (part of another class of phenolic compounds) noticed the displacement of the characteristic band of the carbonyl group, which in this compound occurs in 1660 cm^{-1} for the region with the lowest energy 1617 cm^{-1} , an indication that the coordination of the compound to the metal ion can occur through carbonyl oxygen. While leaving 1617 cm^{-1} it is related to contributions from the C = C connections.

The presence of a band in the region located between 3100-3650 cm^{-1} is characteristic of the symmetrical O-H stretch caused by the intra and intermolecular hydrogen bonds present in the compound. In addition, absorption in this region is associated with axial strain vibrations in hydrogen atoms linked to carbon, oxygen and nitrogen (C-H, O-H and N-H) [26]. It is noted that the association of the metal with the compound may be linked to this chemical bond since the intensity of the bands in this region decreases as the concentration of the metal increases.

The complexing capacity of flavonoid rutin when associated with the metals copper and iron, showed greater activity in the sequestration of superoxide radicals. This was noted by [27].

It is possible to highlight the very intense decrease of the peak in 1203 cm^{-1} referring to axial deformations of the phenolic groups and the disappearance of the band in 1001 cm^{-1} referring to the cyclic alcohol groups, thus evidencing the coordination of mercury from these groups. functional substances present in the rutin molecule. No changes were observed in the peaks related to ketone oxygen and those related to ethers present in the molecule. This shows that the possibility of coordination of the Hg^{2+} ion probably does not occur from these groups.

From an analysis of the infrared spectrum of pure Rutin and the Rutin associated with the 0.05 mM HgCl₂ solution, it was observed a decrease in several bands referring mainly to the OH groups present in cyclic alcohols and phenolic groups. It was also observed that with the increase in the concentration of HgCl₂ there is a more marked decrease in the intensity of the bands, thus showing that more coordination is made to the metal ion.

4. Conclusion

This study suggests that although mercury chloride causes cytotoxicity in several plant species, its complex with rutin can mitigate these effects. Toxicity tests using vegetables are a practical resource of good sensitivity in the qualitative indication of the presence of cytoprotective substances that can be used to combat the environmental damage produced by the accumulation of heavy metals. These results can bring new perspectives for the development of products and techniques that can help in the recovery of environments contaminated by toxic metals.

Author statement

The authors Yedda M. L. S. de Matos and José B. Neto contributed to the methodology of the work, while the authors Daniel L. M. Vasconcelos, Antonio C. H. Barreto and Fabia F. Campina worked on validating the results by carrying out some experiments and the analysands. A more detailed analysis and conceptualization was carried out by the authors Amanda K. Sousa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Juan C. Alvarez-Pizarro and João H. da Silva. The author Janaina E. Rocha had undamental importance in the writing of the work, organizing several results from different areas in a single paper. The resources, materials and access to the analysis software were obtained thanks to the authors Henrique Douglas Melo Coutinho, Raimundo N. P. Teixeira and Tássia T. de A. M. Guedes.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] Y. Chen, Z. Shen, X. Li, *Applied Geochemistry* 19 (2004) 1553-1565. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2004.02.003>.
- [2] A. Alvarez, J. M. Saez, J.S. Davila Costa, V.L. Colin, M.S. Fuentes, S.A. Cuozzo, C.S. Benimeli, M.A. Polti, M.J. Amoroso, *Chemosphere* 166 (2017) 41 – 62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.070>.
- [3] A. Abdolali, H.H. Ngo, W. Guo, J.L. Zhou, J. Zhang, S. Liang, S.W. Chang, D.D. Nguyen, Y. Liu. *Bioresource Technology* 229 (2017) 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.016>.
- [4] R.L. Prior, G. Cao, *Hort Science* 35 (2000) 588-592. <https://doi.org/10.4236/health.2018.104039>.
- [5] 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, *Arabian Journal of Chemistry* 7 (2014) 165–170. <https://doi.org/10.1039/c4tx00162a>.
- [6] A.M. Mahmoud, *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, (2012) 7 783-789. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.01.016>.
- [7] W. Lee, S.K. Ku, J.S. Bae, *Food and chemical toxicology* 50 (2012) 3048-3055. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.013>.
- [8] N.L. Kerry, M. Abbey, *Atherosclerosis* 135(1) (1997) 93-102. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(97\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(97)00156-1).
- [9] 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, et al., *Water Air Soil Pollut* (2017) 228-424. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3614-z>.
- [10] C.E. Sobral-Souza, A. R. P. Silva, N. F. Leite, J. G. M. Costa, I.R.A. Menezes, et al., *J*

Hazard Mater 15 (370) (2018) 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.03.039>

[11] A. Blum, A. Ebercon, *Crop Science*, Madison, 21 (1) (1981) 43-47. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183x002100010>.

[12] J.E. Rocha, et al., *International Biodeterioration & Biodegradation* 141 (2019) 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.07.002>.

[13] J.E. Rocha, et al., *Applied Geochemistry* 104 (2019) 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.03.015>.

[14] F.A.B. Cunha, et al., *Arabian Journal of Chemistry* 12(8) (2019) 4197–4203. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.04.018>.

[15] M. Israr, S. Sahi, R. Datta, D. Sarkar, *Chemosphere* 65 (2006) 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.016>.

[16] D. Cargnelutti, et al., *Chemosphere* 65(6) (2006) 99-1006. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.037>Get rights and content.

[17] V. Branco, S. Caito, M. Farina, et al., *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 20(3) (2017) 119-154. <https://doi.org/10.1080/10937404.20171289834>.

[18] G. K Sahu, S. Upadhyay, B. B. Sahoo, B. B., *Physiol Mol Biol Plants* 18(1) (2012) 21–31.

[19] Z. S. Zhou, S. Q. Huang, K. Guo, S. K. Mehta, P. C. Zhang, Z. M. Yang. *Inorg Biochem*, 101 (2007) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.05.011>.

[20] M. Medvidovic-Kosanovic, M. Šeruga, L. Jakobek, I. Novak, *Croatica Chem Acta*, 83 (2010) 197-207.

[21] T. Nguyen, et al., *Food Chem*, 136 (2013) 186-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.104>.

- [22] M. Paczkowska, K. Lewandowska, W. Bednarski, M. Mizera, A. Podborska, A. Krause, J. Cielecka Piontek, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 140 (2015) 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.12.050>.
- [23] M. Paczkowska, M. Mizera, H. Piotrowska, D. Szymanowska-Powałowska, K. Lewandowska, J. Goscińska, R. Pietrzak, W. Bednarski, Z. Majka, J. Cielecka-Piontek, *PLoS One* 10 (2015) 1–16. <https://doi:10.1371/journal.pone.0120858>.
- [24] R.M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.
- [25] D.O. Santos, F.M. Sussuchi, Síntese e Caracterização do complexo de Cobalto (II) - Quercetina. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (2009).
- [26] T.G.F. Deguchi, Estudo do equilíbrio químico de compostos modelo de taninos com íons metálicos para o tratamento de efluentes industriais. Dissertação de mestrado. UFRS, 2006.
- [27] M.Y. Moridani, J. Pourahmad, H. Bui, A. Siraki, P.J. O'Brien, *Free Radical Biology & Medicine* 34(2) (2003) 243 – 253. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01241-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01241-8).

FIGURES

Fig.1. Growth of *L. sativa* seedlings submitted to 0.05 mM mercury chloride in the absence and presence of rutin.

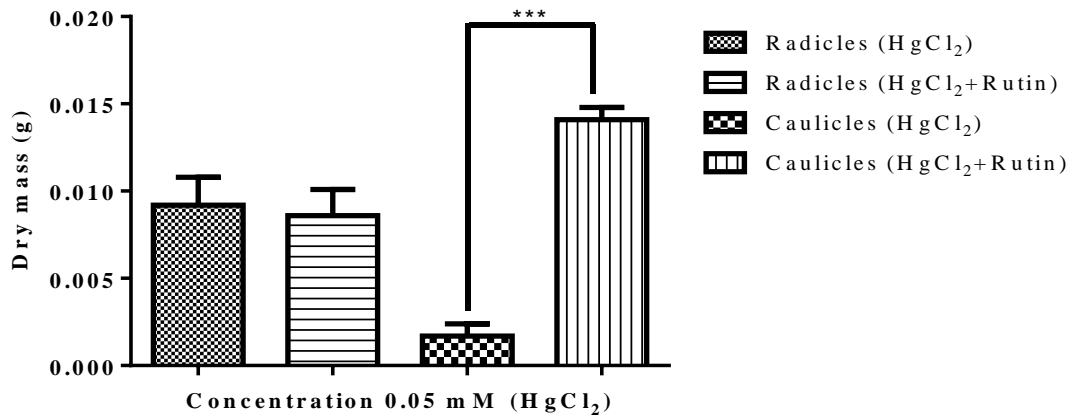


Fig. 2. Membrane damage in *L. sativa* caused by 0.05 mM HgCl₂ in the absence and presence of rutin.

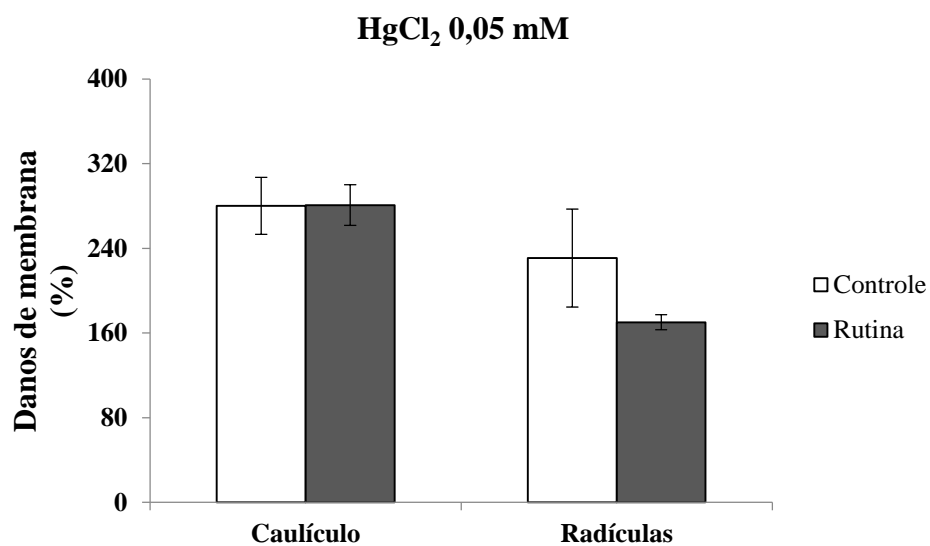


Fig. 3. Raman spectra of pure rutin and associated with 0.05 mM HgCl_2 .

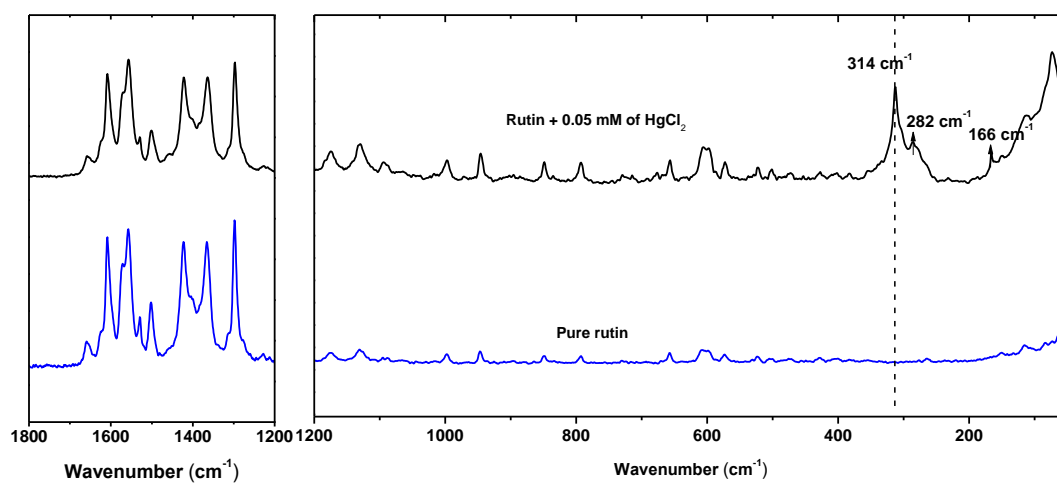
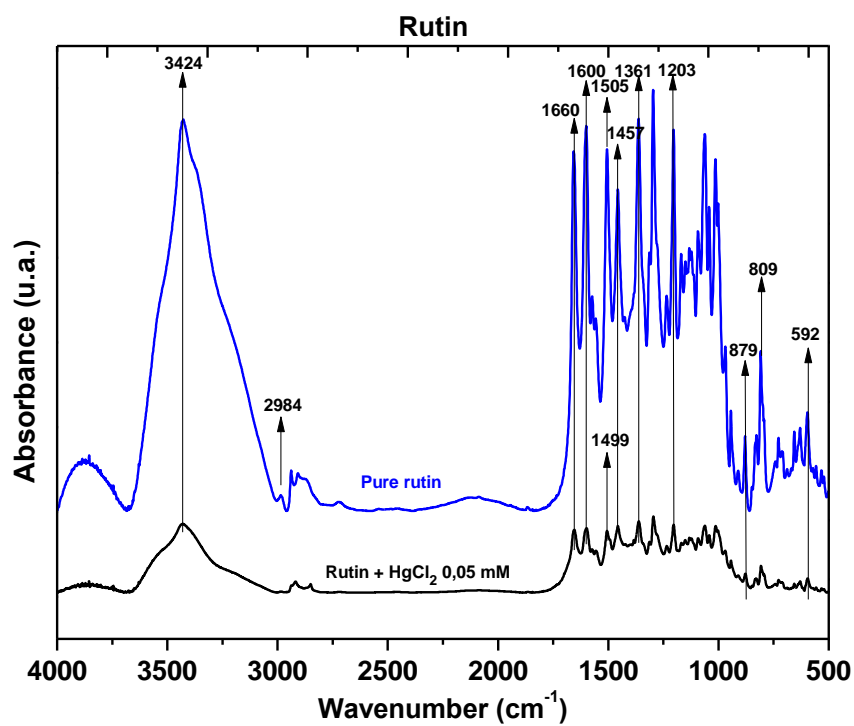


Fig. 4. Infrared spectra of pure rutin and associated with 0.05 mM HgCl_2 .



TABLES

Table 1. Tentative classification of modes referring to pure rutin and rutin associated with a 0.05 mM HgCl₂ solution.

Pure	0,0 5 Hg Cl 2	Assignment
62	66	
73	74	
84	86	
114	114	
152	150	
	168	
	282	ν (Hg-Cl) [22]
	314	δ (OH) [22]
402	398	
429	430	
474	472	
503	501	
524	526	
573	570	rings deformations [22]
599	596	
609	610	
658	659	rings deformations [22]
794	791	ω (C-H) + breathing at dihydroxyphenyl ring [22,23]
849	850	ν (C-C) in glucopyranosyl ring [22,23]
947	944	ν (C-C)in glucopyranosyl ring [22,23]
998	999	δ (C-C-C) + ν (C-C)in dihydroxyphenyl[22,23]
1130	112	
	7	ν (C-O)mannopyranosyl ring [22,23]
1175	117	
	4	
1229	122	δ (C-O-H) benzene ring + ν (C-O)+
	9	ν (C-C)in heterocyclic ring[22,23]
1298	129	δ (C-C-H) + r (C-H) at all rings [22,23]
	7	
1365	136	r (C-H) at mannopyranosyl ring
	3	[22,23]
1401	140	
	0	
1423	142	
	3	
1502	149	ν (C=C) in benzene ring [22]
	9	
1529	153	
	0	
1557	155	ν (C=C) in benzene and
	6	dihydroxyphenyl rings [22]

1572	157 3	$\nu(\text{C}=\text{C})$ in benzene, heterocyclic and dihydroxyphenyl rings [22]
1608	160 8	$\nu(\text{C}=\text{C})$ in benzene, heterocyclic and dihydroxyphenyl rings [22]
1658	165 9	$\nu(\text{C}=\text{O})$ at heterocyclic ring [22]

ν =stretching, δ = bending, r = rocking and ω = wagging.

CAPÍTULO 3: FTIR ANALYSIS AND REDUCTION OF THE PHYTOTOXIC EFFECT OF MERCURY DICHLORIDE BY RUTIN

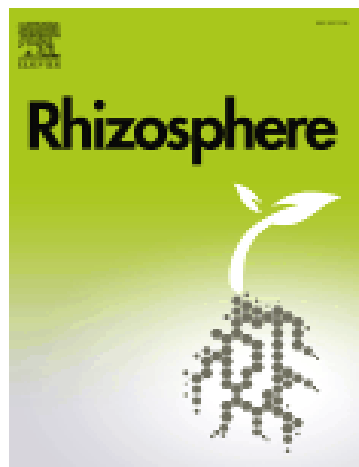
(ARTIGO 2)

Yedda Maria Lobo Soares de Matos^a, Janaina Esmeraldo Rocha^a, Celestina Elba Sobral Souza^b, Tássia Thaís de Alencar Martins Guedes^b, José Bezerra de Araújo Neto^a, Fabia Ferreira Campina^a, Jacqueline Cosmo Andrade^a, Thiago Sampaio de Freitas^a, Amanda Karine Sousa^b, Saulo Relison Tintino^a, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga^a, Daniel Linhares Militão Vasconcelos^d, Antonio César Honorato Barreto^d, João Hermínio da Silva^c, Irwin Rose Alencar Menezes^a, Raimundo Nonato Pereira Teixeira^c, Juan Carlos Alvarez-Pizarro^c, Henrique Douglas Melo Coutinho^c

Artigo publicado no periódico: *Rhizosphere* (Anexo B)

Link para acesso: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100393> R

Fator de Impacto: 2.079



FTIR analysis and reduction of the phytotoxic effect of mercury dichloride by rutin

Yedda Maria Lobo Soares de Matos^a, Janaina Esmeraldo Rocha^a, Celestina Elba Sobral Souza^b, Tássia Thaís de Alencar Martins Guedes^b, José Bezerra de Araújo Neto^a, Fabia Ferreira Campina^a, Jacqueline Cosmo Andrade^a, Thiago Sampaio de Freitas^a, Amanda Karine Sousa^b, Saulo Relison Tintino^a, Maria Flaviana Bezerra Morais Braga^a, Daniel Linhares Militão Vasconcelos^d, Antonio César Honorato Barreto^d, João Hermínio da Silva^c, Irwin Rose Alencar Menezes^a, Raimundo Nonato Pereira Teixeira^e, Juan Carlos Alvarez-Pizarro^c, Henrique Douglas Melo Coutinho^c

ABSTRACT

Concerns regarding environmental contamination by heavy metals extends worldwide with some studies showing promising alternatives for soil recovery using plants. This research aimed to evaluate the ability of rutin flavonoid to reduce the toxicity of mercury dichloride (HgCl₂) in microbiological and vegetable models, by antioxidant tests (DPPH) and chelating assays with iron (Fe II) and iron (Fe III). The reduction in toxicity was then assessed using microbial models. The cytoprotective potential was evaluated in *Lactuca sativa* (lettuce) using the products in suballelopathic concentrations of HgCl₂. Rutin flavonoid did not reduce the toxicity of HgCl₂ in microbiological models, but it improved the development of roots and stems in lettuce seedlings, probably due to the coordination of mercury with the rutin molecule, reducing the toxicity of the metal. The interaction of rutin with mercury chloride was evidenced by vibrational spectroscopy. Although HgCl₂ causes cytotoxicity in several plant species, its complex with rutin can mitigate these effects. This is the first report on the cytoprotective activity of rutin flavonoid in a prokaryotic and eukaryotic model against the toxic action of HgCl₂.

Key words: Metals, Flavonoids, Cytoprotection, Allelopathy, Phytoremediation.

1. Introduction

High concentration of toxic metals in different ecosystems has been the reason for growing concern in the world (Yang et al., 2020). The accumulation of heavy metals in soil affects the plant growth and development (Sooksawat et al., 2013). For instances, mercury can reduce growth (Yang et al., 2018), induce severe oxidative damages, as lipid peroxidation, K⁺ leakage and alteration of antioxidant activities (Tran et al., 2018). In the roots, it impairs the uptake and transport of nutrients (Marrugo-Negrete et al., 2016). At the cellular level, mercury-induced changes in membrane permeability, macromolecular structure because of its affinity for thiol and sulfhydryl groups and DNA damage were observed (Flora et al., 2008; Rehman et al., 2018).

Nowadays, the main focus of industries and regulatory authorities is to nullify the risk of Hg toxicity by remediating Hg polluted water and soil. Given heavy metals cannot be degraded or mineralized like in the case of organic pollutants, the transformation of toxic form into less toxic and volatile forms of Hg is one of main challenge to remediation of water and soils (Kumari et al., 2020).

Considering that the association of plants and micro-organisms is crucial to increase the removal toxic compounds from soil and water, several researches demonstrate the variety of plant metabolites with bioactive properties to improve the plant protection against the toxic action of metals. For example, the ethanolic extract of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolana* developed a cytoprotective potential in mercury-treated lettuce seeds (Cunha et al., 2016 and Sobral-Souza et al., 2014); cytoprotection studies using plant and bacterial cells have already been carried out, evaluating the extract of plants of *Duguetia furfurace* (Lima et al., 2014); *Lygodium venustum* (Figueredo et al., 2016) e *Psidium brownianum* (Leite et al., 2017). All these authors in their conclusions describe that the cytoprotective activity of these products may be due to the presence of phenolic acids, especially flavonoids, which have antioxidant and chelating action. However further studies are needed to verify the cytoprotective effects, pointing out that these discoveries may open a new perspective for the recovery of environments contaminated by toxic metals. So, the search for new alternatives to treat contaminated soils may lie in natural and synthetic products derived from plants (Singh; Behera; Kumar, 2019).

We aimed to verify the antioxidant, chelating and cytoprotective activities of the flavonoid rutin from against the toxicity of mercury dichloride in prokaryotic and eukaryotic models.

2. Materials and Methods

2.1. Substances

The flavonoid rutin was purchased from Sigma® (St. Louis, USA) and HgCl₂ was purchased from Vetec Química Fina LTDA.

2.2. Micro-organisms

The assays were made out with *Escherichia coli* (strain EC 06) and *Candida albicans* 40006 (strain CA INCQS 40006), provided by Laboratory of Micology of Federal University of Paraiba – UFPB and FIOCRUZ, respectively, with inocula at concentrations of 1.5x10⁸ CFU.

2.3. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Initially, the rutin solution was prepared by weighing 10 mg and diluting it in 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) to give a concentration of 10 µg/mL. From this solution, a volume of 512 µL was diluted in 4488 µL DMSO, to obtain a final concentration of 1024 µg/mL. A 10 mM solution of HgCl₂ was also prepared by weighing 2.35 mg of HgCl₂ and diluting it in 1 mL DMSO. To obtain a final concentration of 0.05 mM mercury dichloride, a 25 µL aliquot of the 10 mM HgCl₂ solution was withdrawn and diluted in a test tube containing 1.25 mL of the rutin solution (1024 µg/mL) and 3.275 mL of DMSO, resulting in a final solution of 5 mL. Meanwhile, to obtain a final concentration of 1.25 mM mercury dichloride, a 625 µL aliquot of the 10 mM HgCl₂ solution was withdrawn and diluted into a test tube containing 1.25 mL of the rutin solution (1024 µg/mL) 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.

2.4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed by the broth microdilution method (Javadpour et al., 1996). For assays with the bacteria, a solution of

sodium resazurin and distilled water was added to each well (20 μ L) and the plates were incubated for 1 h at room temperature. To reveal the MIC, it was considered as growth inhibition the wells that remained blue in color and non-inhibition those that obtained a red color, when evaluated for bacteria, or the absence of turbidity in the medium, when evaluated for fungi. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest concentration capable of inhibiting bacterial growth in microdilution plate wells as detected macroscopically (NCCLS, 2002).

2.5. Evaluation of cytoprotective potential in bacteria and fungi against HgCl₂

For the evaluation of the protective effect of the substance rutin on mercury dichloride, eppendorfs containing subinhibitory concentrations of the samples and suspensions at 10⁵ CFU/mL of *Escherichia coli* 06 (EC 06) and *Candida albicans* (CA 40006) were prepared in Brain Heart Infusion (BHI) medium 10%. The assays were performed by microdilution according Leite et al. (2017). The mercury concentration ranged from 5 mM to 0.00244 mM. The microdilution plates were incubated for 48 h at 37 °C.

Then, the minimum bactericidal concentrations (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 at 35 \pm 2 °C during 24 hours. The MBC and MFC readings were performed based on the growth of the microbial controls, considering the MBC and MFC the lowest concentration of the product that inhibited the visible growth of the subculture (Shadomy et al., 1985).

2.6. Allelopathy test of the rutin on *Lactuca sativa* L. seeds

Assays were carried out to determine the allelopathic effect of the samples under study. To conduct the test, clean, dry and sterile Petri dishes were used. They were lined with two discs of filter paper, where 20 (twenty) seeds of *Lactuca sativa* were arranged. 3 mL of the sample solutions were added to each plate at concentrations of 8, 16, 32, 64 and 128 μ g/mL, and the plates were properly identified and prepared in triplicate. After addition of the solution, the plates remained wrapped in plastic film (Sobral-Souza et al., 2014). The experiments were conducted in a germination chamber at 25 °C \pm 2 °C and natural photoperiod for seven days.

The treatments were arranged in a completely randomized experimental design (CRD), with three replicates of 20 seeds per plate. Seven days after the onset of experiment, the number of germinated seeds was recorded. Seeds whose rootlets reached 1 mm in length or more were considered germinated. The tests were done in triplicate and expressed as mean.

*2.7. Evaluation of the cytoprotective effect of the rutin in a plant model (*L. sativa*) against $HgCl_2$*

To conduct the test, Petri dishes prepared as previously reported were used. Concerning the concentrations used a suballelopathic concentration of the rutin ($8 \mu\text{g/mL}$) and of Mercury Dichloride ($HgCl_2$), ranging from 1.25 mM to 0.05 mM. The control treatment was distilled water (Coutinho et al., 2017). The experiments were conducted in a germination chamber at $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ and natural photoperiod for seven days. The treatments were arranged in a completely randomized experimental design (CRD), with three replicates of 20 seeds per plate. Seven days after the onset of experiment, germinated seed number, germination rate index (GRI), radicular biometry, occurrence of root necrosis and seedling abnormalities (BRASIL, 2009). Seeds whose rootlets reached 1 mm in length or more were considered germinated. The tests were done in triplicate and expressed as mean.

2.8. Antioxidant assay

The antioxidant potential of the substance rutin was evaluated using the photolorimetric method in vitro of the DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) free radical described by Mensor et al. (2001) and Nascimento et al. (2017). In this assay, 300 μL of rutin and each sample (250–5 $\mu\text{g/mL}$) are added to 1500 μL of DPPH (0.3 mM) and 1200 μL of ethanol P.A. All readings were performed in triplicate and a mean was obtained. The absorbance difference between the samples and the negative control was calculated and the percentage antioxidante activity (AA) was obtained by linear regression for each phase, thereby obtaining the sample concentration which promotes a 50% reduction of the initial DPPH concentration, defined as the 50% Effective Concentration (EC50).

2.9. Iron chelating effect

The iron chelating activity of rutin was carried out according to Puntel et al. (2005). For

the reaction, iron sulphate and ferrous sulphate solutions prepared at the time of use. A volume of 225 μL of the prepared solution of 500 μM of FeCl_3 or FeSO_4 was added at different concentrations of the compound (1000 - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated for 15 min, before adding 20 μL of a 0.25% solution 1,10-phenanthroline (w/v). Ascorbic acid was used as a positive control.

Absorbance was measured in a spectrophotometer at 510 nm and values were presented as the means of the triplicate analyses.

2.10. Statistical Analyses

Data from micro-organisms experiments are presented as the geometric mean \pm S.E.M (Standard Mean Error) of the three repetitions. Effective concentrations were calculated from non-linear regression for both substance and control. After calculating the EC_{50} , Student's t test was performed. All other determinations were carried out in triplicate and the results of chemical and plant test were calculated as arithmetic means with Bonferroni and ANOVA. Only results with $p < 0.05$ and $p < 0.0001$ were considered significant. The software used was *Graphpad Prism 6.01*.

3. Results and Discussion

3.1. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

From an analysis of the infrared spectrum of pure rutin and rutin associated with 0.05 mM and 1.25 mM HgCl_2 solutions, we observed a decrease in several bands mainly related to OH groups present in cyclic alcohols and in phenolic groups (Fig. 1). It is observed that with the increase in the concentration of HgCl_2 there is a more accentuated decrease in the intensity of the bands, thus showing that more coordination is made to the metallic ion.

A very intense decrease of the 1203 cm^{-1} peak associated with axial deformations of phenolic groups and the disappearance of the 1001 cm^{-1} band referring to cyclic alcohol groups stand out, thus showing the coordination of mercury with the aforementioned functional groups present in the rutin. No change observed in peaks associated with ketone or ether oxygens present in the molecule, suggesting Hg^{2+} ion coordination is unlikely to occur through these groups.

The presence of a peak in the 3100-3650 cm^{-1} region is characteristic of a symmetrical

O-H stretch caused by hydrogen bonds present in the compound. In addition, absorption in this region is associated with hydrogen atoms bound to carbon, oxygen and nitrogen (C-H, O-H and N-H) (Deguchi, 2014). It is noteworthy that the association between metal and rutin may be related to this chemical bond since the intensity of the peaks in this region decrease as the metal concentration increases (Fig. 2).

The band present in the 3720-3770 cm^{-1} region is characteristic of asymmetric OH stretching which, when compared to the band corresponding to the symmetrical OH stretching, suffers a marked increase in its intensity when in the presence of the highest metal concentration (Barbosa, 2013).

These results are corroborated by the study of Moridani et al. (2003) who demonstrated the complexation capacity of several flavonoids, among which rutin, showed the highest superoxide radical sequestration activity when complexed with copper and iron metals.

3.2. Chelating effect of Fe(II) and Fe(III) and antioxidant assay by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH)

According to Table 1 which presents the DPPH free radical assay results, rutin exhibited a significant antioxidant potential with an EC_{50} of 4.55 $\mu\text{g/mL}$, being effective even when compared to the ascorbic acid, which presented a higher EC_{50} of 27.61 $\mu\text{g/mL}$.

Flavonoids and other phenolic compounds have an antioxidant activity, mainly due the ability to capture and neutralize oxidizing species such as hydroxyl or peroxide radicals and superoxide anions responsible for lipid peroxidation, macromolecule damages (El-Hadary and Ramadan, 2019).

As for rutin's antioxidant action, Malik et al. (2019) performed assays with hybridized rutin derivatives and observed antioxidant values with a low EC_{50} in the micromolar range demonstrating the antioxidant and inhibitory potential of xanthine oxidase. Santos et al. (2014) used the *Bauhinia purpurea* species, which is rich in rutin, and found a high antioxidant potential for rutin when tested with the DPPH and ABTS radical (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) compared to the superoxide radical.

Oliveira (2015) addressed the cellular antioxidant capacity of rutin using *Saccharomyces cerevisiae* strains that were proficient and deficient at antioxidant defenses, observing that rutin significantly decreased the oxidative damage in this fungus thus demonstrating that this flavonoid possesses a high cellular antioxidant capacity, being

important in the protection against induced oxidative stress.

Henneberg et al. (2013) carried out an evaluation of the antioxidant activity of the flavonoids quercetin, hesperidin, myricetin and rutin. Among the results observed, there was a greater antioxidant potential with rutin and quercetin in relation to the other flavonoids tested. It was determined that a dose of 30 $\mu\text{mol} / \text{L}$ of rutin was responsible for halving the production of oxidizing species in patients with sickle cell anemia, compared with healthy patients.

Phenolic antioxidants act at both the initiation and propagation stages of oxidative stress given they function as radical scavengers (Soares et al., 2002). Moreover, studies report that quercetin, rutin, and polyphenol-rich plant extracts reduce oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cell death (Carrasco-Pozo et al., 2010).

Ferric ion reduction in the sample is represented by the IC_{50} , where the lowest and most effective chelating concentration was evidenced for Fe(II). The more efficient the inhibitor and the greater its reducing activity, the lower the IC_{50} value will be since a lower sample quantity is required to reduce the metal by 50% (Silva et al., 2016). Fe (II) and Fe (III) values were evaluated, in the case of Fe (II), with values well below the controls, as shown in Table 1.

Lue et al. (2010) showed that rutin possesses antioxidant activity, reducing power, hydroxyl radical scavenging activity, superoxide radical anion and chelation activity.

3.3. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

In the fig.3, the results obtained with *Escherichia coli* show that rutin does not exert a cytoprotective activity against the toxic action of mercury. According to Silver and Hobmam (2007), microorganisms are resistant to most metals, a resistance which usually occurs by efflux pumps or due intra and/or extracellular chelation of the xenobiotic.

Our results are according with the other ones obtained by Rocha et al. (2019a) for the tannin gallic acid where its cytoprotection against HgCl_2 in *E. coli* was tested with extracts *Eugenia jambolana* Lam., as well as with those by Leite et al. (2016) who used *Psidium myrsinites* DC. A. and Fe(II) sulfate.

However, results by Cunha et al. (2016) demonstrated a cytoprotective effect for the *Eugenia uniflora* L. extract against HgCl_2 toxicity in *E. coli*, where the presence of rutin was identified by HPLC. Figueredo et al. (2016) also demonstrated that *Lygodium venustum* extracts and fractions presented cytoprotection against HgCl_2 in *E. coli* 25922. These results differ from those obtained in the present study since these authors used extracts in their studies which may yield different results, since extracts are complex substances, which in addition to the having

the flavonoid rutin in their composition also possess a diversity of other phenolic compounds.

According to Fig. 4 the flavonoid rutin has not cytoprotective effect against eukaryotic fungal model. In this test, the substance in association with HgCl₂ potentiated the toxicity of the metal, causing a synergism of the toxic action, where a lower concentration of the metal (HgCl₂) is needed to cause organism mortality compared to the HgCl₂ control only.

Similar results were found by Sobral-Souza et al. (2018) and (2019), when evaluating the *Psidium brownianum* Mart ex DC and *Psidium guajava* extracts. On the other hand, Rocha et al. (2019a) found different results to those in the present study with the tannin gallic acid against the same fungal strains, where the tannin promoted cytoprotection in the fungal model.

3.4. Allelopathic effect on lettuce seeds

An allelopathy test was performed to determine lettuce seed germination rate in the presence of different rutin concentrations, where an allelopathic effect over lettuce seeds was observed at concentrations above 128 µg/mL of the substance. The suballelopathic concentrations were therefore 8, 16, 32 and 64 µg/mL where any of these could be used in the cytoprotection test against HgCl₂ toxicity. The suballelopathic concentration chosen for the test was 8 µg/mL since it presented better radicle and caulicle growth and development from the first day of germination.

Rocha et al. (2019a) performed the same allelopathy test with the tannic acid gallic acid and found that suballelopathic concentrations ranged from 512 to 32 µg/mL. Likewise, Sobral-Souza et al. (2019) observed that *Psidium guajava* ethanol extract (EEPG) and fractions (TFPG and FFPG) from the 128 µg/mL concentration interfered with *L. sativa* seed germination. Leite et al. (2017) noted an allelopathic effect on lettuce seeds from concentrations above 256 µg/mL using the *Psidium brownianum* extract.

3.5. Germination velocity

According to Fig. 5, significant differences between the two lowest concentrations of HgCl₂, 0.05 mM and 0.1 mM, and the control were not observed. The growth of radicle and caulicle growth and early development were similar. However, at the two highest concentrations, germination rate was reduced as compared to the control. This responses may be due to a variety of strategies to prevent the excessive accumulation of nonessential metals in cells (Cobbett, 2000) thereby minimizing plant oxidative stress caused by HgCl₂, which by

having mercury in its composition can induce this stress (Zhou et al., 2008).

Cargnelutti et al. (2006) studied the effects of HgCl₂ exposed in *Cucumis sativus* L. seedlings, and found that Hg present in the compound was absorbed in the growth of the seedlings, and its content was greater in seedlings that did not develop, suggesting that Hg induces stress oxidative in cucumber, resulting in plant damage.

Safari et al. (2019) observed that Hg can induce toxicity to proteins and other biomolecules through increased production of reactive oxygen species (ROS) and alteration in gene expression and that Hg toxicity in plants may be due to excess generation of ROS which leads to oxidative damage to proteins.

3.6. Cytoprotective effect on lettuce seeds against HgCl₂

Radicles and caulicles from lettuce seeds treated with different concentrations of the HgCl₂, as well as their association with rutin, were measured in this test over a period of seven days. From the fig.6, caulicle growth was observed when the flavonoid rutin was associated with the metal, even at the highest metal concentrations (1.25 mM and 0.5 mM), albeit without statistical significance.

When Hg at a concentration of 0.05 mM was associated with rutin, a greater radicle and caulicle growth was observed, indicating the cytoprotective potential of rutin in the plant model. These results are in line with the research by Sobral-Souza et al. (2018) who observed that the ethanol extract of *Psidium brownianum* and its fractions had a cytoprotective property against the toxicity of mercury chloride, protecting plant cells (*L. Sativa*). The same authors saw that the flavonoid fractions of *Psidium guajava* extract reduced the phytotoxic effect of mercury chloride against *L. Sativa* seedlings, suggesting that this cytoprotective activity could be related to the antioxidant effect of secondary metabolites, especially flavonoids (Sobral-Souza et al., 2019).

Cunha et al. (2016) demonstrated that phytochemicals present in the *Eugenia uniflora* ethanolic extract, especially phenols and flavonoids, where rutin is among the main constituents, may protect different organisms against potentially toxic elements damage due to a chelation or antioxidant potential.

Rocha et al. (2019a; 2019b) in their studies with the hydrolysable tannins, gallic acid and caffeic acid, respectively, observed that these substances when associated with HgCl₂ promote cytoprotection of lettuce seeds against the toxicity of Hg, especially at a concentration of 0.05 mM. Although these studies were performed with tannins and not flavonoids, both are

phenolic compounds with demonstrated antioxidant and chelating capacity, suggesting this cytoprotection in the plant model.

4. Conclusion

The results obtained in this study indicate the flavonoid rutin may be a natural product alternative with cellular protective effects, probably due to the antioxidant and chelating activity of this substance as evidenced by FTIR. Cytoprotection was verified in the plant eukaryotic model when rutin was associated with mercury dichloride at low concentrations to promote the growth of radicles and caulicles. However, rutin was unable to reverse the toxicity caused by mercury dichloride against bacterial and fungal strains. Given these results, plant-derived substances may be an alternative to natural products that reduce the cellular aggression caused by potentially toxic elements, showing alternative ways to recover areas contaminated by metals.

References

- Barbosa, L.C.A., 2013. *Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos*. 1 ed. São Paulo: UFV.
- Brasil, 2009. Ministério da Agricultura. Departamento de Produção Vegetal, Divisão de Sementes e Mudas. *Regras para análise de sementes*. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 2188.
- Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Speisky, H., 2010. Protection by apple peel polyphenols against indometacin-induced oxidative stress, mitochondrial damage and cytotoxicity in Caco-2 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62, 943-950.
- Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Spanevello, R.M., de Oliveira Jucoski, G., Battisti, V., Redin, M, Linares, C.E. et al., 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere*. 65(6), 999-1006.
- 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., et al., 2017. *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. as na Adjuvant for the plant germination and development under toxic concentrations of HgCl₂ and AlCl₃. *Water Air Soil Pollut*. 228, 424.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*. 123, 825-832.
- Cunha, F.A.B., Pinho, A.I., Santos, J.F.S., Sobral-Souza, C.E., Albuquerque, R.S., Matias, E.F.F., et al., 2016. Cytoprotective effect of *Eugenia uniflora* L. against the waste contaminant Mercury chloride. *Arab. J. Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.04.018>.
- Deguchi, T.G.F., 2006. Estudo do equilíbrio químico de compostos modelo de taninos com íons metálicos para o tratamento de efluentes industriais. *Dissertação de mestrado*. UFRS.
- El-Hadary A.E., Ramadan, M.F., 2019. Phenolic profiles, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract.

J Food Biochem. 43(4). <http://doi: 10.1111/jfbc.12803>.

Figueredo, F.G., Lima, L.F., Morais-Braga, M.F.B., Tintino, S.R., Farias, P.A.M., Matias, E.F.F., et al., 2016. Cytoprotective effect of *Lygodium venustum* Sw. (Lygodiaceae) against mercury chloride toxicity. *Scientifica.* 2016, 1–5.

Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A., 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.*, 128 (4), 501.

Henneberg, R; Otuki, M.F.; Furman, A.E.F.; Hermann, P.; Nascimento, A.J.; Leonart, M.S.S., 2013. Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia.* 35(1), 52-55.

Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.C., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., McLaughlin, M.L., 1996. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem.* 39, 107–3113.

Kumari, S., Jamwal, R., Mishra, N., Singh, D. K., 2020. Recent developments in environmental mercury bioremediation and its toxicity: a review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management.* 13, 100283.

Leite, N.F., Sobral-Souza, C.E., Matias, E.F.F., Alencar, L.B.B., Albuquerque, R.S., Morais-Braga, M.F.B., 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.

Leite, N.F., Sobral-Souza, C.E., Albuquerque, R.S., Pinho, A.I., Cunha, F.A.B., 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.

Lima, C. N. et al., 2014. Protective action of *Duguetia furfuracea* (A. St. – Hil) saff against toxicity due to Mercury chloride in *Escherichia coli*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 19(1), 179-188.

Lue, B.M., Nielsen, N.S., Jacobsen, C., Hellgren, L., Guo, Z., Xu, X., 2010. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. *Food Chem.* 123(2), 221- 30.

Malik, N., Dhiman, P., Khatkar, A., 2019. In silico design and synthesis of targeted rutin derivatives as xanthine oxidase inhibitors. *BMC Chemistry.* 13(1). doi:10.1186/s13065-019-0585-8.

Marrugo-Negrete, J., Durango-Hernández, J., Pinedo-Hernández, J., Enamorado-Montes, G., Díez, S., 2016. Mercury uptake and effects on growth in *Jatropha curcas*. *Journal of Environmental Sciences.* 48, 120-125.

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

Moridani, M.Y., Pourahmad, J., Bui, H., Siraki, A., O'Brien, P.J., 2003. Dietary Flavonoid Iron Complexes as Cytoprotective Superoxide Radical Scavengers. *Free Radical Biology & Medicine.* 34(2), 243 – 253.

Nascimento, E.M.M., Rodrigues, F.F.G., Costa, W.D., Boligon, A.A., Sousa, E.O., et al., 2017. *In vitro* evaluation of antioxidante properties of fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at diferente stages of maturation. *Food Chem. Toxicol.* 119, 457-463.

NCCLS Norma M27-A2, 2002. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.

Oliveira, G.L.S., 2015. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Cienc Farm Básica Apli.* 36(3), 461-466.

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.* 30, 225–235.

Rehman, K., Fatima, F., Waheed, I., Akash, M.S.H., 2018. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J. Cell. Biochem.* 119 (1), 157–184.

Rocha, J.E., Guedes, T. T.A.M., Bezerra, C.F., Costa, M.S., Campina, F.F., De Freitas, T.S. et al., 2019a. Identification of the gallic acid mechanism of action on mercury chloride toxicity reduction using infrared spectroscopy and antioxidant assays. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 141, 24-29.

Rocha, J.E., Guedes, T.T.A.M., Bezerra, C. F., Costa, M. S., Campina, F. F., De Freitas, T.S., et al., 2019b. Mercury chloride phytotoxicity reduction using antioxidative mechanisms evidenced by caffeic acid FTIR. *Applied Geochemistry.* 104, 109–115.

Safari, F., Akramian, M., Salehi-Arjmand H., Khadivi., 2019. A. Physiological and molecular mechanisms underlying salicylic acid-mitigated mercury toxicity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Ecotoxicol Environ Saf.* 15, 183:109542.

Santos, P.M., Almeida, P.D.O., Lima, E.S., Moraes, M.O., Costa, P.M., Meira, A.S., et al., 2014. Perfil de flavonoides e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico de *Bauhinia purpúrea* (Fabaceae) da região amazônica. *Revista Quimica Nova.* 37(1), 89-94.

Shadomy, S., Espinel-Ingroff, A., Cartwright, R., 1985. Laboratory studies with antifungal agentes: susceptibility test and bioassay. In: Lennette, E.H., Ballows, A., Hausler Jr.W.J., Shadomy, H.J. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 4 ed. American Society of Microbiology, Washington.

Silva, C.F.G., Mendes, M.P., Almeida, V.V., Michels, R.N., Sakanaka, L.S., Tonin, L.T.D., 2016. Parâmetros de qualidade físico-químicos e avaliação da atividade antioxidante de folhas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae) submetidas a diferentes processos de secagem. *Rev Bras Plant Med.* 18, 48-56.

Silver, S., Hobman, J.L., 2007. Mercury Microbiology: Resistance Systems, Environmental

Aspects, Methylation, and Human Health. *Microbiol Monographs*. 6, 357-370.

Singh, R.; Behera, M.; Kumar, S., 2019. Nano-bioremediation: an innovative remediation technology for treatment and management of contaminated sites. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. 7, 165–182.

Soares, S.E., 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. 15, 71-81.

Sobral-Souza, C.E., Leite, N.F., Cunha, F.A.B., Pinho, A.I., Albuquerque, R.S., Carneiro, J.N.P., et al., 2014. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. *Arabian Journal of Chemistry*. 7, 165–170.

Sobral-Souza, C.E., Silva, A. R. P, Leite N. F, Costa, J. G. M., Menezes, I.R.A., Cunha F. A. B., et al., 2018. LC-MS Analysis and Cytoprotective effect against the Mercurium and Aluminium Toxicity by Bioactive products of *Psidium brownianum* Mart. ex DC. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.03.039>.

Sobral-Souza, C.E., Silva, A.R.P., Leite, N.F., Rocha, J.E., Sousa, A.K. Costa, J.G.M., et al., 2019. *Psidium guajava* bioactive product chemical analysis and heavy metal toxicity reduction, *Chemosphere*. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.174.

Sooksawat, N., Meetam, M., Krua trachue, M., Pokethitiyook, P., Koravisd, N., 2013. Phytoremediation potential of charophytes: Bioaccumulation and toxicity studies of cadmium, lead and zinc. *Journal of Environmental Sciences*. 25(3), 596–604.

Tran, T.A.T., Zhou, F., Yang, W., Wang, M., Dinh, Q. T., Wang, D., Liang, D., 2018. Detoxification of mercury in soil by selenite and related mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 159, 77-84.

Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., Strähle, U., 2020. Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*. 245, 125586.

Yang, J., Li, G., Bishopp, A., Heenatigala, P. P.M., Hu, S., Chen, Y., et al., 2018. A comparison of growth on mercuric chloride for three Lemnaceae species reveals differences in growth dynamics that effect their suitability for use in either monitoring or remediating ecosystems

contaminated with mercury. *Frontiers in Chemistry*. 6, 112.

Zhou, Z.S., Guo, K., Elbazz, A.A., Yang, Z.M., 2008. Salicylic ac alleviates Mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. *Environ Exp Bot*. 65, 27-34.

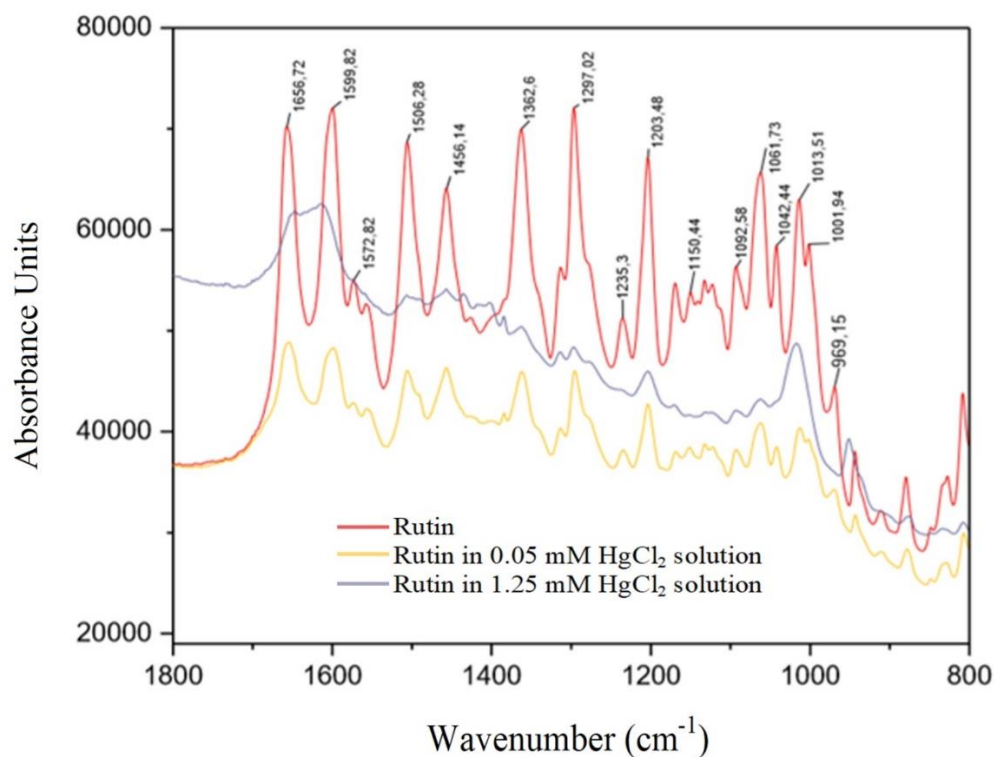


Fig. 1. Infrared spectroscopy pattern of rutin alone and in association with HgCl₂ 0.05 mM and 1.25 mM.

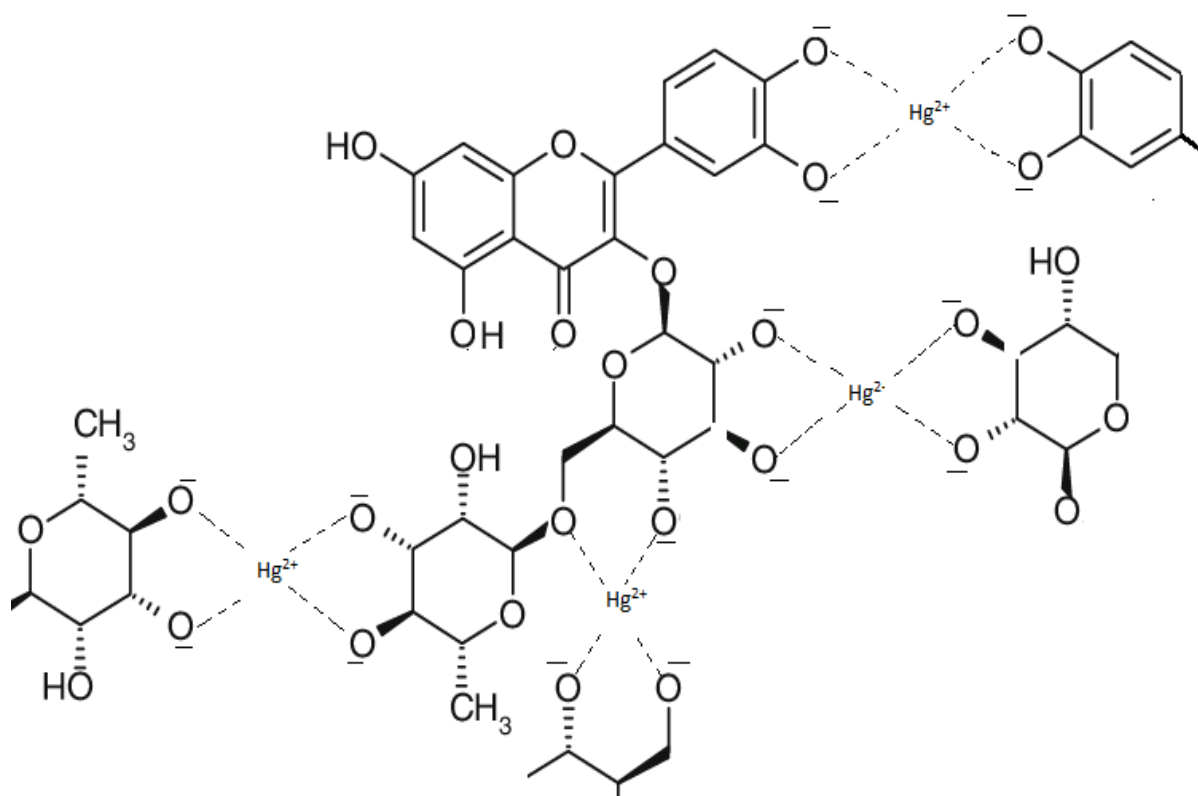


Fig. 2. Suggested pattern of coordination between rutin and the metallic ion Hg²⁺.

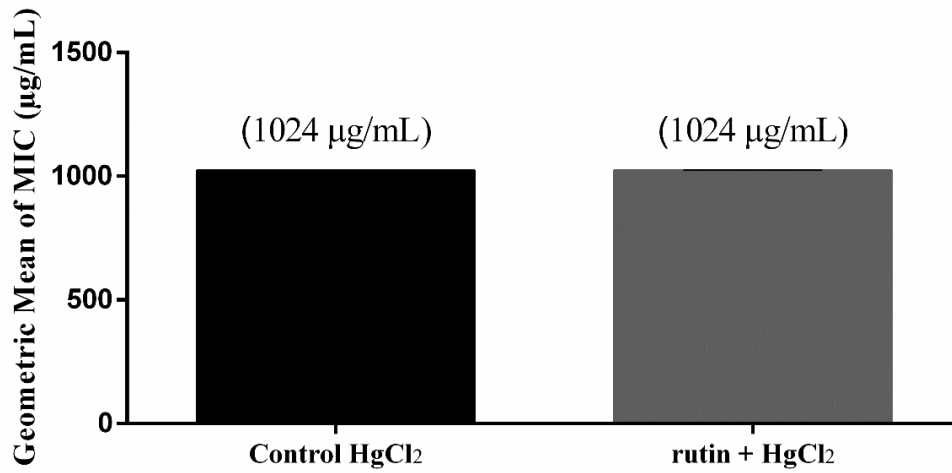
Escherichia coli 06

Fig. 3. Bactericidal concentrations of the HgCl₂ and associated with the rutin.

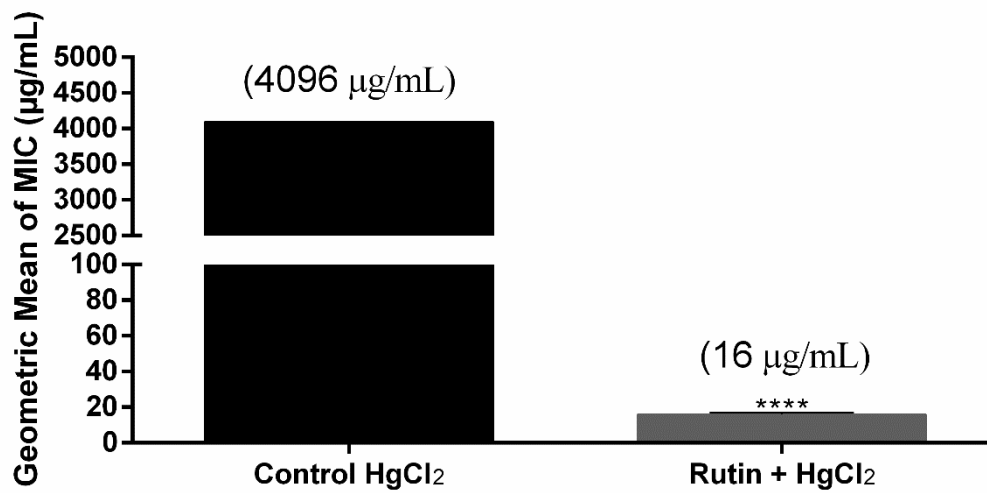
Candida albicans

Fig.4. Fungicidal concentrations of the HgCl₂ alone and associated with the rutin.

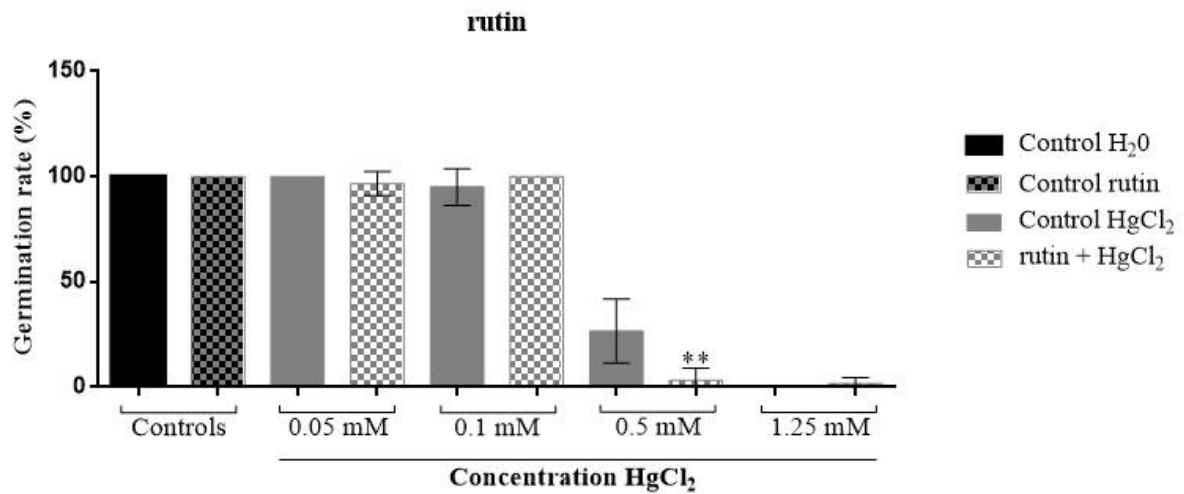


Fig. 5. Germination rate of *Lactuca sativa* seeds subjected to treatment with water, rutin, different concentrations of HgCl₂ and its association with the isolated substance.

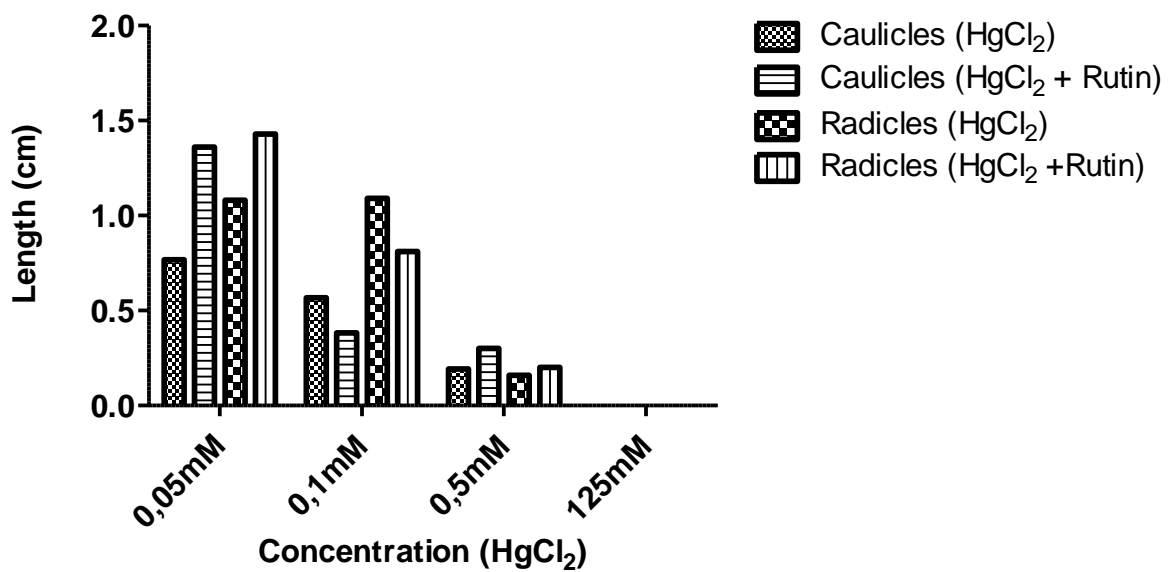


Fig. 6. Citoprotective potential of the rutin against the HgCl₂ toxicity on the *Lactuca sativa* plant model.

Table 1. Values of antioxidant activity and chelating effect of Fe(II) and Fe(III).

	EC ₅₀ (DPPH) (mmol/g)	IC ₅₀ Fe(II) (µg/g of sample)	IC ₅₀ Fe(III) (µg/g of sample)
Ascorbic acid	27.61 ± 1.40	27.61 ± 1.40	27.61 ± 1.40
Rutin	4.55 ± 0.02	4.50 ± 0.38	42.37 ± 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 PRINCIPAIS CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o flavonoide rutina pode ser uma alternativa de produto natural com efeitos de proteção celular, provavelmente, devido à atividade antioxidante e quelante desta substância. A citoproteção foi verificada no modelo eucariótico de planta quando a rutina foi associada ao HgCl₂ em baixas concentrações para promover o crescimento de radículas e caulículos. No entanto, a rutina não foi capaz de reverter a toxicidade causada pelo HgCl₂ contra cepas de *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Assim, sugere-se que, embora o cloreto de mercúrio cause citotoxicidade em diversas espécies vegetais, seu complexo com a rutina pode atenuar estes efeitos. Este é o primeiro relato sobre a atividade citoprotetora do flavonoide rutina em modelo procarioto e eucarioto frente à ação tóxica do cloreto de mercúrio. Os testes de toxicidade, utilizando micro-organismos e vegetais, constituem recurso prático de boa sensibilidade na indicação qualitativa da presença de substâncias citoprotetoras que podem ser usadas no combate aos danos ambientais, produzidos pelo acúmulo de metais tóxicos.

Embora estes resultados sejam inovadores e promissores quanto a busca de novas alternativas para descontaminação de áreas poluídas por metais tóxicos, a partir desta substância com atividade citoprotetora, mais estudos são necessários para observar o efeito de sua aplicação em áreas contaminadas.

4.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se, escrever manuscritos com os resultados dos ensaios com outros flavonoides como quercetina e catequina, visando à obtenção de resultados semelhantes ou melhores, em relação aos da presente pesquisa, tendo em vista o potencial que os flavonoides apresentam, como agentes quelantes e antioxidantes.

4.3 ORÇAMENTO

Esta pesquisa contou com o suporte e financiamento da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior da CAPES (Programa de Demanda Social - DS), através da Bolsa (Nível Doutorado) concedida à discente Yedda Maria Lobo Soares de Matos.

Do recurso da bolsa foi possível pagar as despesas com passagens (Crato, CE x Recife, PE), alimentação e hospedagem na capital Pernambucana, onde a discente cursou a maioria das disciplinas. Além dessas despesas, houve gastos com a participação em eventos científicos, inclusive, obtendo premiação dos trabalhos apresentados.

As despesas referentes à compra de materiais foram pagas com o recurso da bolsa, a citar: reagentes, substâncias isoladas, cloreto de mercúrio, meios de cultura, assim como materiais descartáveis e equipamentos de proteção individual; e com recursos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA), assim como do Projeto direcionado ao Programa de Bolsa de Produtividade em Pesquisa e Estímulo à interiorização (BPI) da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), coordenado pelo Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, orientador desta pesquisa.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A. Comprovante de publicação no periódico *Vibrational Spectroscopy*.

Vibrational Spectroscopy 109 (2020) 103084



Contents lists available at ScienceDirect

Vibrational Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vibspec

Reduction of the phytotoxic effect of mercury chloride by rutin and evaluation of interactions by vibrational spectroscopy (Raman and FTIR)

Yedda M.L.S. de Matos^a, Daniel L.M. Vasconcelos^{b,*}, Antonio C.H. Barreto^b, Janaina E. Rocha^c, José B. Neto^c, Fabia F. Campina^c, Tássia T. de A. M. Guedes^d, Amanda K. Sousa^c, Raimundo N.P. Teixeira^c, Juan C. Alvarez-Pizarro^e, Henrique D.M. Coutinho^c, João H. da Silva^f

^a Department of Biology, Regional University of Cariri, 63000-000, Crato, CE, Brazil

^b Department of Physics, Federal University of Ceara, 60.440-900, Fortaleza, CE, Brazil

^c Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, 63100-000, Crato, CE, Brazil

^d Unileão University Center, 63040-005, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^e Center of Agrarian Sciences and Biodiversity, Federal University of Cariri, 63133-610, Crato, CE, Brazil

^f Center of Science and Technology – CCT, Federal University of Cariri, 63048-080, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Flavonoid
Rutin
Vibrational spectroscopy

ABSTRACT

Toxic metals can cause toxicity problems in the organisms exposed to them. Many substances are able to reverse this toxicity. Among the secondary metabolites of plant origin investigated are flavonoids. To evaluate the cytoprotective activity, dry mass and possible damage to the membranes of *Lactuca sativa* (lettuce) seedlings subjected to different concentrations of mercury chloride in association with rutin in sublethal concentration (8 µg/mL) were determined. It was observed that rutin gives cytoprotection to lettuce seedlings, allowing greater growth and development of the roots of these seedlings, probably through the coordination of mercury with the rutin molecule. The interaction of rutin with mercury chloride was evidenced through vibrational spectroscopy (Raman and FTIR). Although mercury chloride causes cytotoxicity in several plant spe-

ANEXO B. Comprovante de publicação no periódico *Rhizosphere*.

FTIR analysis and reduction of the phytotoxic effect of mercury dichloride by rutin

Yedda Maria Lobo Soares de Matos^a, Janaina Esmeraldo Rocha^a, Celestina Elba Sobral Souza^b, Tássia Thaís de Alencar Martins Guedes^b, José Bezerra de Araújo Neto^a, Fabia Ferreira Campina^a, Jacqueline Cosmo Andrade^a, Thiago Sampaio de Freitas^a, Amanda Karine Sousa^b, Saulo Relison Tintino^a, Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga^a, Daniel Linhares Militão Vasconcelos^d, Antonio César Honorato Barreto^d, João Hermínio da Silva^c, Irwin Rose Alencar Menezes^a, Raimundo Nonato Pereira Teixeira^e, Juan Carlos Alvarez-Pizarro^c, Henrique Douglas Melo Coutinho^{c,*}

^a Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

^b University Center UNILEAO, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^c Federal University of Cariri, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^d Laboratory of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^e Laboratory of Research in Natural Products, Regional University of Cariri, Crato, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Metals
Flavonoids
Cytotoxicity

ABSTRACT

Concerns regarding environmental contamination by heavy metals extends worldwide with some studies showing promising alternatives for soil recovery using plants. This research aimed to evaluate the ability of rutin flavonoid to reduce the toxicity of mercury dichloride (HgCl₂) in microbiological and vegetable models, by an-