



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOPROTETOR DE *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., CONTRA EFEITO TÓXICO DO CLORETO DE MERCÚRIO

Ana Raquel Pereira da Silva¹; Gioconda Morais de Andrade Bezerra Martins²;
Rafael Pereira da Cruz¹; Maria do Socorro Costa¹; Fábila Ferreira Campina¹;
Henrique Douglas Melo Coutinho³

Resumo: Os metais pesados são potentes poluentes ambientais que podem causar sérios danos a aos seres vivos quando em contato prolongado. O mercúrio, metal com elevada capacidade de bioacumulação no solo e em ambientes aquáticos, pode atingir uma cadeia biológica e bioacumular-se, representando um alto risco aos organismos vivos. O *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., popularmente conhecido como “barbatimão” bastante citado quanto ao seu uso popular em virtude das propriedades antimicrobianas e de suas funções biológicas referente à atividade antioxidante, pode ser uma alternativa para a proteção ambiental contra metais pesados. O presente estudo objetiva avaliar o efeito citoprotetor *S. rotundifolium*, contra cloreto de mercúrio (HgCl_2) em modelos microbianos (bactérias e fungos). Para tanto, realizou-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e, a partir desta, a avaliação do potencial tóxico do HgCl_2 por meio do uso de placas estéreis de microdiluição. O extrato foi utilizado nas concentrações subinibitórias de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ para bactérias e de 128 e 256 $\mu\text{g/mL}$ para fungos e o HgCl_2 na concentração inicial de 1mM. Observou-se que o extrato em questão apresentou leve efeito citoprotetor em modelos bacterianos e não apresentou tal efeito em cepas fúngicas. Vale ressaltar ainda que, nesse último, extrato potencializou o efeito tóxico do, promovendo a morte dos fungos em concentrações menores do metal. Acredita-se que tal fato possa ser explicado pelos efeitos antimicrobianos atribuídos ao *S. rotundifolium*, devido ao seu elevado conteúdo de taninos, o que requer estudos mais aprofundados para maiores conclusões.

Palavras-chave: Citoproteção. *Stryphnodendron rotundifolium*. Funções biológicas.

EVALUATION OF POTENTIAL CYTOPROTECTIVE *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., AGAINST TOXIC EFFECTS OF MERCURY CHLORIDE

Abstract: Heavy metals are potent environmental pollutant that can cause serious damage to living beings when in prolonged contact. Mercury, metal with high bioaccumulation capacity in soil and aquatic environments, can reach a biological chain and bioaccumulate up, representing a high risk to living organisms. *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., popularly known as "barbatimão" widely cited as to its popular use because of antimicrobial properties and their biological functions related to antioxidant activity, may be an alternative to environmental protection against heavy metals. This study aims to evaluate the effect cytoprotective *S. rotundifolium*, Against mercuric chloride (HgCl_2) in microbial models (bacterium and fungi). The extract was subinibitory used in concentrations of 32 and 64 $\mu\text{g/ml}$ for bacterium and 128 and 256 $\mu\text{g/ml}$ for fungi and HgCl_2 in the initial concentration of 1mM. It was observed that the statement in question showed a slight cytoprotective effect on bacterial models and did not show such an effect on fungal strains. It is also worth mentioning that in the latter,

¹ Egressa curso Ciências Biológicas pela Universidade Regional do Cariri – URCA

² Mestranda em Bioprospecção pela Universidade Regional do Cariri – URCA

³ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA

Autor correspondente: anaraquel_ar@hotmail.com

potentiated the toxic effect of the extract, promoting the death of fungi at lower metal concentrations. For this purpose, we carried out to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and, from this, the evaluation of potential toxic HgCl₂ through the use of sterile plates microdilution. It is believed that this fact can be explained by antimicrobial effects attributed to *S. rotundifolium*, due to its high tannin content, which requires further study further conclusions.

Keywords: Cytoprotection, *Stryphnodendron rotundifolium*. Biological functions.

Introdução

Os metais pesados são substâncias químicas naturalmente encontradas em pequenas concentrações na atmosfera, nos solos, nas águas e no conjunto de seres vivos de uma região, porém, com a resultante atividade humana tanto industrial quanto urbana, as concentrações destes metais vêm se elevando, ocasionando contaminações no ambiente e, conseqüentemente, sérios riscos por exercerem ação inibitória nos diversos organismos podendo prejudicar seu crescimento, morfologia, metabolismo e também sua reprodução (LACERDA; MIGUENS, 2011).

O Cloreto de Mercúrio (HgCl₂) é o principal representante de compostos de mercúrio (Hg), que é um metal líquido pesado, inodoro e de fácil volatilização, o qual pode se apresentar em diferentes formas na atmosfera, sendo que nem todas são identificadas devido à complexidade do ciclo global (LIMA et al., 2009).

O mercúrio é um dos elementos presentes na superfície terrestre com maior frequência na lista de metais pesados (CETESB, 2001). A toxicidade do mercúrio provoca mudanças no sistema nervoso dos seres humanos, pois uma vez absorvido pelo organismo o mesmo é distribuído primeiramente para o sistema nervoso central e rins (VERBEL; RESTREPO, 2002; SWIFT, 1997).

Dentre as classes com características antioxidantes estão os compostos fenólicos, onde a atividade antioxidante desses compostos deve-se especialmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas particularidades desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; SHETTY et al., 2005).

O gênero *Stryphnodendron* Mart., pertencente a família Fabacea, inclui cerca de 48 espécies, todas nativas do Cerrado brasileiro. A casca do caule de várias destas espécies contém cerca de 20% de taninos estes que tem a capacidade de complexar com íons metálicos dando origem a estruturas quelatadas e sendo eficaz na proteção das plantas contra ataques de insetos e

ainda confere às espécies que os contém em considerável concentração, ação bactericida e fungicida (LAKS, 1991).

O *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., popularmente conhecido como Barbatimão é uma espécie típica da Chapada do Araripe, bastante citada quanto ao seu uso na prática popular, em virtude das propriedades antimicrobianas da casca do caule dessa espécie, sendo também utilizada na medicina tradicional devido os extratos terem funções biológicas referente à atividade antioxidante e também principalmente por ser rica em taninos (CRONQUIST, 1988; SANTOS e MELLO, 2004).

Avaliar o efeito citoprotetor *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., contra cloreto de mercúrio (HgCl₂) em modelos microbianos (Fungos e Bactérias).

Material e Métodos

Material Vegetal

A coleta do material para preparo da exsicata da espécie *Stryphnodendron rotundifolium* Mart., e para obtenção do seu Extrato Hidroetanólico – EHSR foi realizada, de acordo com Oliveira (2010) na Fazenda Barreiro Grande, Crato-Ceará, em área de Cerrado da Chapada do Araripe. Os procedimentos para preparo da exsicata seguiram as recomendações descritas por Di Stasi (1996), sendo a mesma depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima – HCDAL da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob o número 4661.

Microorganismos

Os microorganismos utilizados foram *Escherichia coli* 06 e a *Candida krusei* 02 cedida pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

Preparação do Extrato Hidroetanólico de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart – EHSR

O material vegetal, no caso as cascas secas de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. (3710,5g) foi submetido à extração a frio com água e etanol a 99,99% na proporção de 1:1 (8,7L de solvente), sendo o solvente etanólico removido por meio do rotaevaporador (modelo Q-344B-Quimis, Brasil), obtendo-se 627,8g de extrato bruto após o processo de liofilização (OLIVEIRA,

2010). A opção pelo extrato hidroetanólico se deu devido a maior concentração de fenóis no EHSR (102.7 ± 2.8) quando comparado com suas folhas (93.8 ± 9.1 μg de fenol/mg da planta) (COSTA et al., 2012).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. O inóculo foi depositado em solução salina para formar uma suspensão de 10^5 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). A concentração do extrato variou de 1024-8 $\mu\text{g/mL}$. Uma solução contendo 900 μL BHI a 10% e 100 μL do inóculo foi colocado em cada *ependorf*. Em seguida foram distribuídos 100 μL desta solução em cada cavidade da placa de microdiluição e logo após adicionaram-se 100 μL do produto natural na primeira cavidade, sendo passado para as demais, através de sucessivas diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade, sendo a última cavidade reservada para controle (meio + inóculo). As placas foram colocadas na estufa a 35 °C, por um período de 24 horas (JAVADPOUR et al., 1996).

Para evidenciar a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 μL da solução indicadora foram adicionadas em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa, devido à redução da resazurina indicou o crescimento bacteriano (MANN; MARKHAN, 1998; PALOMINO et al., 2002), auxiliando a visualização da CIM, que foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

Avaliação do Potencial Citoprotetor em Modelo Microbiano contra Cloreto de Mercúrio

Para a avaliação do efeito protetor do extrato de *Stryphnodendron rotundifolium* contra o metal pesado, foram preparados *ependorfs* contendo concentrações sub-inibitórias das amostras e suspensões de 10^5 UFC/mL de *E. coli* em meio BHI a 10% e *ependorfs* com 10^5 UFC/mL de *C. krusei* em meio *Sabouraud Dextrose Agar*. Cada solução foi distribuída nas cavidades da placa de 96 poços. Logo em seguida 100 μL de cloreto de mercúrio foram adicionados, a maior do mesmo na primeira cavidade seguindo com sucessivas microdiluições até a penúltima cavidade. A concentração do metal variou de 500 a 0,49 μM . As placas de microdiluição foram incubadas por 48 h a 35 °C, em estufa. Em seguida, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a

Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram determinadas como as menores concentrações capazes de matar o crescimento dos microrganismos. Foram utilizadas placas de petri com Nutrient Agar - NA para transferência das soluções incubadas com bactérias, e para fungos com Sabouraud Dextrose Agar – DAS. Uma alíquota de cada poço da placa de microdiluição foi subcultivada nas placas com os referidos meios. Após 24 horas de incubação a 35°C, leitura foi realizada, com a finalidade de observação do crescimento das colônias. As leituras das CBM e CFM foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CBM e CFM, as menores concentrações das amostras capazes de inibir crescimento visível do subcultivo (SHADOMY; ESPINELINGROFF; CARTWRIGHT, 1985).

Resultados e Discussões

A partir do teste para determinação da CIM, as concentrações caracterizadas como Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram, respectivamente, 256 µg/mL e 1.024 µg/mL.

Para avaliação do efeito citoprotetor, realizado em sextuplicata, foram utilizadas as seguintes concentrações subinibitórias do extrato: para bactérias 32 µg/mL e 64 µg/mL (correspondendo a CBM/8 e CBM/4) e para fungos 128 µg/mL e 256 µg/mL (CFM/8 e CFM/4).

Os dados apresentados na tabela 1, relativos ao efeito citoprotetor em cepas bacterianas multirresistentes de *Escherichia coli* 06, não apresentaram resultado significativo em relação ao controle, mesmo diante de duas concentrações diferentes do extrato.

Tabela 1: Efeito citoprotetor do EHSR contra HgCl₂ em modelo bacteriano (EHSR - Extrato Hidroetanólico de *Stryphnodendron rotundifolium*; HgCl₂ – Cloreto de Mercúrio; n = número de repetições).

N	Controle HgCl ₂ (mM)	EHSR 32 µg/mL	EHSR 64 µg/mL
1	0,5	>0,5	>0,5
2	≥1,0	>0,5	>0,5
3	≥1,0	0,5	0,5
4	≥1,0	>0,5	>0,5
5	≥1,0	0,5	0,5
6	≥1,0	0,063	0,5

Fonte: Dados da Pesquisa.

Esse fato pode ser explicado em virtude de os microrganismos serem naturalmente resistente à maioria dos metais, resistência esta atribuída a mecanismos celulares de efluxo, os quais, segundo Silver e Hobman (2007), removem metais do citoplasma para o sequestrante extracelular do contaminante.

Além disso, espécies deste gênero têm ações antibacterianas e antifúngicas, o que fazem com que elas sejam bastante utilizadas pela medicina popular principalmente em processos inflamatórios e diarreia (VASCONCELOS et al., 2004; SOUZA et al., 2007). Isso pode comprometer seu efeito citoprotetor em bactérias e fungos, uma vez que o extrato apresenta ações contra esses microrganismos.

A partir do exposto, não se pode atribuir efeito citoprotetor ao extrato de *Stryphnodendron rotundifolium*.

Entretanto, é possível encontrar atividades citoprotetoras em modelos microbianos a partir de extratos. Estudos realizados por Sobral-Souza et al., (2014) utilizando o extrato etanólico de *Eugenia jambolana* Lam., detectaram, em linhagens bacterianas similares, efeito de proteção leve do extrato contra cloreto de mercúrio em relação ao controle do metal.

Já a tabela 2 apresenta os dados do efeito citoprotetor do EHSR em cepas de *Candida krusei* 02:

Tabela 2: Efeito citoprotetor do EHSR contra HgCl₂ em modelo fúngico (EHSR - Extrato Hidroetanólico de *Stryphnodendron rotundifolium*; HgCl₂ – Cloreto de Mercúrio; n = número de repetições).

N	Controle HgCl ₂ (mM)	EHSR 128 µg/mL	EHSR 256 µg/mL
1	0,016	0,009	0,016
2	0,016	0,016	0,016
3	0,016	0,016	0,016
4	0,016	0,016	0,016
5	0,016	0,016	0,016
6	0,016	0,031	0,009

Fonte: Dados da Pesquisa.

O que se pode de fato observar é que houve, embora de maneira discreta, um aumento na toxicidade do mercúrio, uma vez que houve crescimento fúngico em concentrações menores do metal quando comparado ao crescimento relativo ao controle de HgCl₂ isolado. Esperava-se que

houvesse crescimento microbiano em maiores concentrações do metal, o que evidenciaria efeito citoprotetor.

Apesar da conhecida atividade antioxidante do extrato em estudo, atribuída à presença elevada de taninos em sua composição fitoquímica (CRONQUIST, 1988; SANTOS; MELLO, 2004), aliada a sua capacidade de complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de formar complexos com proteínas e polissacarídeos (SANTOS; MELLO, 2007), acredita-se que esses mesmos componentes sejam os responsáveis pelo aumento do efeito tóxico do mercúrio, uma vez que apresentam também atividades antifúngicas comprovadas.

Conclusões

A partir da análise dos dados, observou-se que o extrato hidroetanólico de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. não apresentou efeito citoprotetor contra cloreto de mercúrio em modelos microbianos (bactérias e fungos), ressaltando-se ainda que, em cepas fúngicas, o mesmo potencializou o efeito tóxico do metal pesado.

Tal fato pode ser atribuído ao seu alto teor de taninos, que embora confirmam, dentre outras, ação antioxidante ao extrato, são responsáveis também por efeitos de natureza antifúngica.

Sugere-se, portanto, que estudos mais aprofundados sejam realizados a fim de esclarecer tais resultados encontrados.

Referências

CETESB. **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas.** São Paulo. CETESB, 2001.

COSTA, J.G.M.; LEITE, G.O.; DUBOIS, A.F.; SEEGER, R.L.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; CAMPOS, A.R.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant Effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius Extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): **Potential Involvement in Its Therapeutic Use Molecules.** v.17, p.934-950, 2012.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants.** 2nd.ed., New York: The New York Botanical Garden, p. 261-449, 1988.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência.** Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal Natural Products.** v.59, n. 2, p. 205–215, 1996.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M.M.; LO, W. C.J; BISHOP, S.M. ; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 39 n. 16 p. 3107-3113, 1996.

LACERDA, L.D.; MIGUENS, F.C. A Ressureição do Metal: Contaminação em sedimentos de estuários e deltas. **Ciências Hoje**. v. 48, p.38-41, 2011.

LAKS, P.E., **Chemistry of bark**. Wood and Cellulosic Chemistry, Hon, D.N.S., Shiraishi. New York: Marcel Dekker Inc, p. 257-330, 1991.

LIMA, E.R.Z.; COLON, J.C.; SOUZA, M.T. Alterações auditivas em trabalhadores expostos ao mercúrio. **Revista CEFAC**. v.11, n.1, pp.62-67, 2009.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 84, p. 538-44, 1998.

OLIVEIRA, D.R. **Contribuição ao estudo da bioprospecção farmacológica de plantas medicinais do Nordeste brasileiro: Barbatimão (*Stryphnodendron rotundifolium* Mart.)**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, 2010.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. v. 46, n.8, p. 2720-22, 2002.

SANTOS, S.C., MELLO, J.C.P. Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, eds. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 527-554, 2004.

SANTOS, S. C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, cap. 2007, p. 615-656.

SHADOMY, S.; ESPINEL-INGROFF, A.; CARTWRIGHT, R. **Laboratory studies with antifungal agents: susceptibility tests and bioassays**. In: LENNETE, E.H.; 1985

SHETTY, K.; CHUN, S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 809-816, 2005.

SILVER, S., HOBMAN, J.L. Mercury microbiology: resistance systems, environmental aspects, methylation, and human health. **Microbiology Monographs**. V. 6, p. 357-370, 2007.

SOBRAL-SOUZA, C.E.; LEITE, N.F., CUNHA, F.A.B.; PINHO, A.I.; ALBUQUERQUE, R.S.; CARNEIRO, J.N.P.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; FRANCO, J.L.; COUTINHO, H.D.M. Cytoprotective effect against mercury chloride and bioinsecticidal activity of *Eugenia jambolana* Lam. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 7, p. 165-170, 2014.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v.15, n.1, pp.71-81, 2002.

SOUZA, T.M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae mimosoideae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, 221-226, 2007.

SWIFT, J. A. Morphology and histochemistry of human hair. **Exs.** v.78, p.149-75, 1997;

VASCONCELOS, M.C.A. et al. Evaluation of biological activities of the seeds of *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 14, 121–127, 2004.

VERBEL, J.O.; RESTREPO, B.J. **El lado gris de la minera del oro: La contaminación con mercurio en el norte de Colombia.** Colombia, 2002, p.123.

Recibido: 02/12/2019

Aceito: 20/12/2019