Artigo

Desenvolvimento e produção in vitro de compostos fenólicos de *Ruta graveolens* L. exposta a fenantreno e benzo[a]pireno**Lemos, S. D. C.;* Santana, I. C.; Marques, M.; Albarello, N.**

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (5), 1418-1432. Data de publicação na Web: 22 de outubro de 2019

<http://rvq.sbq.org.br>**Development and in vitro production of phenolic compounds of *Ruta graveolens* L. under the influence of phenanthrene and benzo[a]pyrene**

Abstract: Plants synthesize substances, such as phenolic compounds, as a defense to adverse environmental conditions. In this context, the addition of contaminants to the culture medium can induce specific stress responses in some plant organisms. The present study evaluated *in vitro* development of *R. graveolens* in culture medium artificially contaminated with benzo[a]pyrene and phenanthrene, as well as the production of total flavonoids in shoots grown under these conditions. Eight months old sprouts maintained *in vitro* on Murashige/Skoog medium without growth regulators were used. The solidified media were supplemented with phenanthrene (1.0; 5.0 and 10.0 mg/L) or benzo[a]pyrene (0.001; 0.010 and 0.100 mg/L) and analyzes were performed over 21 days of culture. The total phenolic compounds were determined by the Folin-Ciocalteu method, while the quantification of different flavonoid fractions was performed using the colorimetric technique adapted from Maia and Park. Species showed capacity for *in vitro* development and tolerance to the presence of hydrocarbons tested, thus revealing the potential for cultivation in areas contaminated by these compounds at the levels investigated. Analysis of phenolic compounds and total flavonoids indicated that shoots maintained under these conditions can develop at the maximum concentrations tested (10 mg / L of phenanthrene and at least 0.1 mg / L of benzo[a]pyrene), without changing their phytochemical profile about routine.

Keywords: Artificial contamination; *Ruta graveolens*; hydrocarbons; culture medium.

Resumo

As plantas sintetizam substâncias, como os compostos fenólicos, como estratégias de defesa às condições ambientais. Neste contexto, a adição de substâncias contaminantes ao meio de cultura pode induzir respostas de estresse específicas para alguns organismos vegetais. O presente estudo avaliou o desenvolvimento *in vitro* de *R. graveolens* em meio de cultura contaminado artificialmente com benzo[a]pireno e fenantreno, assim como a produção de flavonoides totais nos brotos crescidos nestas condições. Foram utilizados brotos mantidos *in vitro* em meio Murashige/Skoog sem reguladores de crescimento, com aproximadamente oito meses de idade. Os meios solidificados foram suplementados com fenantreno (1.0; 5.0 e 10.0 mg/L) ou benzo[a]pireno (0.001; 0.010 e 0.100 mg/L), e as análises foram realizadas ao longo de 21 dias de cultivo. Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, enquanto a quantificação de diferentes frações de flavonoides totais foi realizada pela técnica colorimétrica adaptada de Maia e Park. A espécie mostrou capacidade de desenvolvimento *in vitro* e tolerância à presença dos hidrocarbonetos testados, com potencial para o cultivo em áreas contaminadas nos níveis investigados. A análise de compostos fenólicos e flavonoides totais indicou que os brotos mantidos nestas condições podem se desenvolver nas concentrações máximas testadas (10 mg/L de fenantreno e pelo menos 0,1 mg/L de benzo[a]pireno), sem alteração do perfil fitoquímico em relação à rotina.

Palavras-chave: Contaminação artificial, *Ruta graveolens*, hidrocarbonetos de petróleo, meio de cultura.

* Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente-PPGMA, Rua São Francisco Xavier 524, Bloco F sala 12.005, Maracanã, CEP 20550-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ lemos.sdc@uerj.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20190098](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190098)

Desenvolvimento e produção *in vitro* de compostos fenólicos de *Ruta graveolens* L. exposta a fenantreno e benzo[a]pireno

Siomara Dias da Costa Lemos,^{a,*} Iranilda Calado Santana,^a Marcia Marques,^b Norma Albarello^a

^a Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratório de Biotecnologia de Plantas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, CEP 20550 900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologia, Faculdade de Engenharia, CEP 20550 900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* lemos.sdc@uerj.br

Recebido em 30 de setembro de 2019. Aceito para publicação em 30 de setembro de 2019

1. Introdução
2. Materiais e Métodos
3. Resultados e Discussão
4. Conclusão

1. Introdução

As plantas sintetizam, como parte de seu metabolismo secundário, compostos fenólicos e polifenóis que possuem estruturas químicas variadas. Estes compostos apresentam no mínimo um anel aromático com, pelo menos, um hidrogênio substituído por uma hidroxila. Estas substâncias possuem aplicações farmacológicas conhecidas, tais como ação anti-inflamatória, antimicrobiana e hipolipidogênica, efeito mutagênico e anticarcinogênico, incluindo atividade antioxidante.¹⁻⁶

Dentre os vários hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA's) descritos na literatura científica, o fenantreno é considerado "composto modelo" para estudos de degradação ambiental por não ser mutagênico ou carcinogênico, sendo

encontrado em altas concentrações em amostras ambientais contaminadas por HPAs. As suas características químicas são semelhantes às características apresentadas por HPAs que são carcinogênicos,^{7,8} como o benzo[a]pireno, lipossolúvel e rapidamente absorvido pelos organismos. O benzo[a]pireno foi descrito como passível de metabolização em culturas *in vitro* de diferentes espécies vegetais.^{7,8}

Sabe-se que a resposta fitotóxica a um xenobiótico é, em linhas gerais, caracterizada como uma resposta de estresse que envolve processos de reconhecimento de sinais moleculares para proteção, reparo e tolerância.^{8,10-12} Sendo assim, as pesquisas geobotânicas e a triagem de espécimes vegetais expostas aos xenobióticos mostram-se necessárias à identificação de espécies potenciais para o monitoramento e recuperação de áreas degradadas.^{8,11,13,14}

Ensaio sob condições controladas, como ocorre sob condições *in vitro*, demonstram que as respostas vegetais à presença de contaminantes no meio de cultivo podem ser exclusivas da espécie em estudo, anulando os efeitos das variações sazonais e favorecendo a produtividade de plantas e síntese de substâncias de interesse.^{8,15-16} Além de visar respostas morfológicas específicas, os sistemas *in vitro* também são indicados nos estudos relacionados à avaliação da capacidade de as células vegetais em tolerar, detoxificar e/ou armazenar/imobilizar substâncias orgânicas contaminantes, sendo possível estudar os fitorreguladores ativos sob tais condições, viabilizando a realização de testes de toxicidade com contaminantes orgânicos, em concentrações controladas.^{8,17}

A arruda (*Ruta graveolens* L.) é uma planta mencionada na Farmacopeia de 28 países, cujo uso medicinal deve-se à síntese de metabólitos secundários, com destaque para flavonoides (quercetina e rutina), cumarinas (psoraleno e bergapteno), ácidos orgânicos (ácido anísico e caprílico), terpenoides (limoneno e pineno), lactonas e várias classes de alcaloides.¹⁸⁻²⁰ A presença dessas substâncias confere à *R. graveolens* propriedades estimulante, diurética, anti-inflamatória e antitumoral, além de ter seu uso investigado no tratamento de dermatoses, como psoríase e vitiligo.²¹⁻²³

Pretendendo amplificar os estudos sobre o efeito dos HPAs sobre espécies vegetais em condições *in vitro* e os danos ocasionados pela contaminação ambiental, e pela atividade humana, com foco na recuperação de áreas através de plantas tolerantes ou fitoindicadoras,²⁵ o objetivo deste trabalho foi investigar o desenvolvimento *in vitro* de brotos de *R. graveolens* em meio de cultura contaminado artificialmente com benzo[a]pireno e fenantreno, assim como avaliar quantitativamente os flavonoides totais por brotos crescidos na presença desses contaminantes *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

O cultivo *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), localizado no Campus Maracanã da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Utilizou-se o meio de cultura MS24, contendo 30 g/L de sacarose e 8 g/L de ágar, com pH ajustado para 5,8. Após esterilização por autoclavagem por 1 atm por 15 min, o meio de cultura foi suplementado com fenantreno (FEN) ou benzo[a]pireno (B[a]P), ambos com 98 % de pureza (Sigma Aldrich® Brasil) e dissolvidos em diclorometano (DCM - Tedia grau HPLC).¹³

As concentrações utilizadas foram as seguintes: 1,0 mg/L (FEN1); 5,0 mg/L (FEN2); 10,0 mg/L (FEN3) para fenantreno ou B[a]P1 (0,001 mg/L); 0,01 mg/L (B[a]P2); 0,1 mg/L (B[a]P3) para benzo[a]pireno. Para cada substância (FEN ou B[a]P), foram realizados dois controles: (i) meio MS sem adição de HPA ou solvente DCM (MS0) e (ii) meio MS com DCM (MSDCM). A adição do contaminante em tubos de ensaio (15 cm x 2,5 cm) com 10 mL de meio de cultura foi realizada em capela de fluxo laminar. Os tubos foram vedados com folha dupla de papel alumínio e selados com filme plástico, mantidos em sala climatizada a 26 ± 2 °C, com 16 h de fotoperíodo por três dias para garantir a ausência de contaminação microbiana.

Os brotos utilizados no experimento eram provenientes do estoque mantido *in vitro* em meio MS sem reguladores de crescimento, originado de sementes anteriormente germinadas *in vitro*, com aproximadamente oito meses de idade. Estes brotos, que apresentavam em média 2 cm de comprimento, sem raízes e foram recultivados em tubos de ensaio contendo meio MS com ou sem a presença dos HPAs selecionados. Após o recultivo para o meio de cultura com a presença dos hidrocarbonetos, estes foram mantidas nas mesmas condições ambientais,

tais como temperatura e fotoperíodo, em que se encontravam originalmente.

As análises de compostos fenólicos e flavonoides totais foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias de cultivo. O material fresco foi pesado em balança analítica eletrônica de precisão e posteriormente submetido à extração por maceração estática em metanol 80 % (1:10 p/v), seguido de filtração e centrifugação a 1.000 xg por 10 min.

A quantidade de compostos fenólicos totais foi determinada através de técnica colorimétrica Folin-Ciocalteu.²⁴ Utilizou-se 250 µL do extrato vegetal na reação de oxidação com os reagentes Folin-Ciocalteu e solução aquosa de Na₂CO₃ (20 % p/v). A solução foi agitada e incubada a 25 °C no escuro por 30 min. Após este período, a absorbância foi determinada em 765 nm, sendo o branco constituído de metanol 80 %. Os constituintes fenólicos foram calculados utilizando curva analítica estabelecida com ácido gálico (5 µg/ml a 25 µg/ml). Os compostos fenólicos foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/g de peso fresco (seguir o padrão do texto).

A quantificação de diferentes frações de flavonoides totais foi realizada através de técnica colorimétrica.^{25,26} Adicionou-se solução aquosa de AlNO₃ (10 % p/v) e CH₃COOK (1 M) às amostras de 100 µL do extrato. A absorbância foi lida em 415 nm, sendo o branco constituído de metanol 80 %. A concentração dos flavonoides foi calculada através de curva analítica estabelecida com rutina (10 µg/ml a 50 µg/ml), sendo o conteúdo de flavonoides expresso em mg em equivalente de rutina (ER)/g de peso fresco.

Os valores médios amostrais de compostos fenólicos totais foram obtidos através de equação da curva de calibração do ácido gálico nas concentrações de 5 µg/ml a 25 µg/ml, de $y = 0,0888x + 0,0628$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,99$ para os brotos expostos ao fenantreno, e $y = 0,101x - 0,0245$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,99$ para os brotos expostos ao benzo[a]pireno. Já os valores médios amostrais de flavonoides

totais foram obtidos com curva de calibração de rutina nas concentrações finais de 10 µg/ml a 50 µg/ml, de $y = 16,281x + 0,0508$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,98$ para os brotos expostos ao fenantreno, e $y = 36,416x - 0,014$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,99$ para os brotos expostos ao benzo[a]pireno. Nas equações o “y” representa a absorbância encontrada nas amostras e o “x” a concentração da substância em questão na amostra.

O experimento foi delineado em seis tratamentos e quatro controles, cada um com quatro repetições, totalizando 72 brotos/tratamento, inteiramente casualizados. Os resultados foram processados utilizando o software Microsoft® Office Excel, interpretados estatisticamente por meio da análise de variância utilizando o programa IBM SPSS Statistics 20.0®, sendo as médias comparadas pelo teste DMS (Diferença Mínima Significativa) ao nível de significância de 95 % ($p \leq 0,05$).

3. Resultados e Discussão

A propagação *in vitro* de *R. graveolens* ocorreu em meio MS sem a adição de reguladores do crescimento, produzindo brotos saudáveis por organogênese direta. Tais aspectos são de extrema relevância para minimizar os riscos de variação somaclonal. É sabido que a contínua manutenção *in vitro* em presença de reguladores de crescimento, assim como a organogênese indireta, ou seja, a formação de plantas via calo, aumenta os riscos de alteração no material genético.²⁷ A propagação de *R. graveolens* na presença de hormônios para produção de brotos foi alcançada por alguns autores.^{16,28-30} Mas somente Orlita e colaboradores³¹ conseguiram manter a espécie em meio de cultura B5, caracterizado por conter baixas concentrações de sais minerais, sem suplementação hormonal, visando avaliar método de elicitação biótica com bactérias.

Ao longo dos 21 dias de análise, os brotos de *R. graveolens* expostos aos HPAs selecionados não apresentaram alterações morfológicas visíveis macroscopicamente (Figura 1 e Figura 2).

Figura 1. Brotos *in vitro* de *R. graveolens* em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno aos 7, 14 e 21 dias. Legenda: MS0 (MS sem suplementação), MSDCM (MS + 1 μ L de diclorometano), FEN1 (MS + 1,0 mg/L de fenantreno), FEN2 (MS + 5,0 mg/L de fenantreno) e FEN3 (MS + 10,0 mg/L de fenantreno)

Figura 2. Brotos *in vitro* de *R. graveolens* em meio de cultura MS contaminado artificialmente com benzo[a]pireno aos 7, 14 e 21 dias. Legenda: MSO (MS sem suplementação), MSDCM (MS + 1 µL de diclorometano), B[a]P1 (MS + 0,001 mg/L de benzo[a]pireno), B[a]P2 (MS + 0,01 mg/L de benzo[a]pireno) e B[a]P3 (MS + 0,1 mg/L de benzo[a]pireno)

Aos 7 dias de cultivo, os brotos expostos à maior concentração de fenantreno (FEN3) apresentaram alteração quantitativa de compostos fenólicos, seguidos pelos brotos

expostos à menor concentração (FEN1), com valores médios de 0,298 e 0,224 mg EAG/g MF, respectivamente. Aos 14 dias, os brotos expostos a 1,0 mg/L de fenantreno (FEN1)

apresentaram incremento quantitativo de compostos fenólicos, superando os brotos dos demais tratamentos com valores médios de 0,260 mg EAG/g MF. Entretanto, aos 21 dias os brotos apresentaram a mesma quantidade de compostos fenólicos, sem diferença estatística e com valores médios de 0,196 mg EAG/g MF (Figura 3A).

Os brotos expostos a benzo[a]pireno não demonstraram variação significativa na quantidade de compostos fenólicos. Aos 7 dias a concentração média destes compostos variou entre 0,147 mg EAG/g MF em MSDCM a 0,252 mg EAG/g MF em B[a]P3; aos 14 dias a variação foi entre 0,132 mg EAG/g MF em MSDCM a 0,178 mg EAG/g MF na presença de benzo[a]pireno (independente da concentração); e aos 21 dias a variação foi entre 0,174 mg EAG/g MF em MSDCM a 0,221 mg EAG/g MF em B[a]P2 (Figura B).

Haida e colaboradores³ descreveram concentrações mais elevadas dos compostos fenólicos em extratos de plantas de *R. graveolens in vivo* (cultivadas em um Horto), onde os extratos etanólicos apresentaram 179,26 mg EAG/g de massa seca, enquanto que os extratos aquosos apresentaram 159,85 mg EAG/g de massa seca. Anteriormente Asolini e colaboradores³² descreveram os concentrações dos compostos fenólicos de 47,0 e 43,0 mg EAG/g de massa seca para extratos etanólicos e aquosos, respectivamente, em plantas de *R. graveolens* cultivadas em campo. Szopa e colaboradores³⁰ ressaltaram que brotos com 28 dias, oriundos de segmentos nodais mantidos no cultivo *in vitro*, na presença de reguladores de crescimento - ácido naftaleno acético (ANA) e benziladenina (BA) - e mantidos sob luz branca produziram valores médios de 9,7 mg/g de peso seco de ácidos fenólicos totais, valores estes acima dos descritos no presente estudo, onde os brotos não foram expostos a nenhum fitoregulador e foram mantidos sob luz branca.

Os compostos fenólicos presentes nas plantas são influenciados intensivamente pelas condições ambientais, assim como a biossíntese destes compostos pode estar relacionada com a idade das plantas e o período anual em que as mesmas se encontram por ocasião da sua colheita.³³ Estas condições não ocorrem no cultivo *in vitro*, de onde os brotos do presente estudo eram oriundos, deste modo não sofrendo ação das condições ambientais e fisiologicamente jovens.³⁴⁻³⁵

Em relação aos flavonoides, após 7 dias de exposição ao fenantreno, houve um incremento na quantidade destas substâncias, sendo tal teor ampliado aos 14 dias na concentração de 10,0 mg/L de fenantreno, com valores médios de 0,549 µg ER/g MF. Neste último período de análise, um incremento também foi observado nos brotos expostos às demais concentrações de fenantreno - FEN1 e FEN2 - além do tratamento controle MSO. Aos 21 dias, assim como observado para os compostos fenólicos, a quantidade de flavonoides totais foi estabilizada em todos os tratamentos, sem diferença estatística entre os tratamentos e com valores médios de 0,410 µg ER/g MF (Figura 4A).

Porém, nos brotos expostos a benzo[a]pireno a quantidade de flavonoides apresentou incremento a partir do 14º dia. Neste período, os brotos expostos a concentração de 0,01 mg/L de benzo[a]pireno (B[a]P2), juntamente com os brotos expostos às demais concentrações de benzo[a]pireno, apresentaram incremento significativo da quantidade destas substâncias, com média de 0,319 µg ER/g MF. Entretanto aos 21 dias, os brotos expostos a concentração 0,1 mg/L de benzo[a]pireno (B[a]P3) apresentaram redução na quantidade de flavonoides totais, diferente dos demais brotos expostos a esta substância (B[a]P1 e B[a]P2), que mantiveram o incremento na quantidade, com médias de 0,245 µg ER/g MF e 0,357 µg ER/g MF, respectivamente (Figura 4B).

Figura 3. Conteúdo de compostos fenólicos em brotos de *R. graveolens* cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de fenantreno (A) e benzoapireno (B). Legenda: (MS0) MS sem suplementação; (MSDCM) MS + 1 μ L de diclorometano; FEN1: MS + 1,0 mg/L de fenantreno; (FEN2) MS + 5,0 mg/L de fenantreno; (FEN3) MS + 10,0 mg/L de fenantreno; (B[a]P1) MS + 0,001 mg/L de benzo[a]pireno; (B[a]P2) MS + 0,01 mg/L de benzo[a]pireno; (B[a]P3) MS + 0,1 mg/L de benzo[a]pireno. Barras seguidas pelas mesmas letras no mesmo período de análise não são significativamente diferentes, segundo o teste DMS ($p \leq 0,05$)

(A)

(B)

Figura 4. Conteúdo de flavonoides totais em brotos de *R. graveolens* cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de fenantreno (A) e benzoapireno (B). Legenda: (MS0) MS sem suplementação; (MSDCM) MS + 1 µL de diclorometano; FEN1: MS + 1,0 mg/L de fenantreno; (FEN2) MS + 5,0 mg/L de fenantreno; (FEN3) MS + 10,0 mg/L de fenantreno; (B[a]P1) MS + 0,001 mg/L de benzo[a]pireno; (B[a]P2) MS + 0,01 mg/L de benzo[a]pireno; (B[a]P3) MS + 0,1 mg/L de benzo[a]pireno. Barras seguidas pelas mesmas letras no mesmo período de análise não são significativamente diferentes, segundo o teste DMS ($p \leq 0,05$)

Segundo Noori e colaboradores,³⁶ pelo fato de serem imóveis, as plantas apresentam mecanismos que lhes proporcionam resistência a condições adversas, sendo tal resistência atribuída às substâncias sintetizadas pelo metabolismo secundário. Os flavonoides são substâncias reconhecidas como agentes relacionados à resistência do organismo ao estresse oxidativo. Segundo estes autores, plantas de *Robinia pseudoacacia* L. apresentaram incremento na quantidade de flavonoides na presença de petróleo no solo, quando comparadas a plantas cultivadas em solo sem contaminação. Já Izbińska e colaboradores³⁷ descreveram que plantas de *Lupinus luteus* L. expostas a solos com altas concentrações de chumbo (Pb) apresentaram altas concentrações de flavonoides e fenóis solúveis. Deste modo, os presentes resultados confirmariam que os flavonoides estão relacionados com a proteção da planta quando em situações de contaminação ambiental e um incremento na quantidade desses metabólitos pode ocorrer na presença de HPAs *in vitro*.

Quanto à relação entre a biomassa fresca (massa fresca) e a quantidade dos flavonoides totais nos brotos expostos a fenantreno e benzo[a]pireno, observou-se relação entre estes parâmetros. Aos 7 dias de cultivo, os brotos expostos a fenantreno apresentaram quantidade de flavonoides totais independente da biomassa fresca dos brotos,

sendo esta destacada na concentração mais alta destas substâncias (FEN3), com valores médios de 0,549 µg ER/g MF. Aos 14 dias todos os tratamentos apresentaram incremento da quantidade, com valores médios de 0,590 µg ER/g MF. Entretanto, aos 21 dias, a quantidade de flavonoides totais foi reduzida em todos os tratamentos, independente da produção de biomassa fresca, com valores médios de 0,412 µg ER/g MF (Figura 5).

Na exposição ao benzo[a]pireno, aos 7 dias de cultivo os brotos apresentaram quantidade dos flavonoides totais independentemente da quantidade de biomassa fresca dos brotos, sendo esta destacada nos meios MS0 e MSDCM, com valores médios de 0,371 µg ER/g MF. Por outro lado, este comportamento foi alterado aos 14 dias, quando os brotos mantidos nos meios com benzo[a]pireno demonstraram incremento na quantidade dos flavonoides totais independente da massa fresca vegetal. Aos 21 dias, destacou-se a quantidade de flavonoides totais nos brotos mantidos nas baixas concentrações de benzo[a]pireno. Apesar da produção de massa fresca ter sido semelhante em todos os tratamentos durante os 21 dias, assim como o aspecto morfológico dos brotos (dados não apresentados), a quantidade dos flavonoides totais se mostrou bastante diferenciada nos períodos analisados e nas condições simuladas (Figura 6).

Figura 5. Relação entre a média de biomassa fresca (massa fresca) das amostras vegetais e a quantidade de flavonoides totais de brotos *in vitro* de *R. graveolens* em meio de cultura MS contaminado artificialmente com fenantreno aos 7, 14 e 21 dias. Legenda: (A) MS0: MS sem suplementação; (B) MSDCM: MS + 1 µL de diclorometano; (C) FEN1: MS + 1,0 mg/L de fenantreno; (D) FEN2: MS + 5,0 mg/L de fenantreno; (E) FEN3: MS + 10,0 mg/L de fenantreno

Figura 6. Relação entre a média de massa fresca das amostras vegetais e a quantidade de flavonoides totais de brotos *in vitro* de *R. graveolens* em meio de cultura MS contaminado artificialmente com benzo[a]pireno aos 7, 14 e 21 dias. Legenda: (A) MS0: MS sem suplementação; (B) MSDCM: MS + 1 µL de diclorometano; (C) B[a]P1: MS + 0,001 mg/L de benzo[a]pireno; (D) B[a]P2: MS + 0,01 mg/L de benzo[a]pireno; (E) B[a]P3: MS + 0,1 mg/L de benzo[a]pireno

4. Conclusão

Os protocolos usados permitiram o desenvolvimento e multiplicação *in vitro* de *R. graveolens* em meio ausente de reguladores

de crescimento e na presença de contaminante. A análise de compostos fenólicos e flavonoides totais indicam que brotos de *R. graveolens* mantidos *in vitro* na presença dos HPAs fenantreno e benzo[a]pireno podem se desenvolver, nas concentrações máximas testadas de 10 mg/L

de fenantreno e de até pelo menos 0,1 mg/L de benzo[a]pireno. *R. graveolens* demonstrou tolerância à presença dos HPAs sob condições *in vitro* demonstrando, portanto, potencial para o cultivo *in vivo* em áreas contaminadas nos níveis investigados. Porém, outras análises fitoquímicas encontram-se em andamento em relação aos contaminantes utilizados e períodos de desenvolvimento da planta.

Agradecimentos

CNPq, FAPERJ e CAPES pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dos estudos.

Referências Bibliográficas

- ¹ Haida, K. S.; Baron, A.; Haida, K. S.; Faci, D.; Haas, J.; Silva, F. J. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de goiaba e arruda. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* **2011**, 28, 11. [\[Link\]](#)
- ² Achkar, M. T.; Novaes, G. M.; Silva, M. J. D.; Vilegas, W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde* **2014**, 11, 398. [\[Link\]](#)
- ³ Tanase, C.; Cosarcã, S.; Muntean, D. L. A. Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules* **2019**, 24, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴ Nour, Y.; Nawal, A.; Majed, J.; Chantal, M. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* **2018**, 10, 1. [\[PubMed\]](#)
- ⁵ García, M. H.; Dorantes, A. M. R. Evaluación del crecimiento, actividad de hemoperoxidasas y remoción de fenantreno de los cultivos celulares de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*. *Polibotânica* **2008**, 25, 101. [\[Link\]](#)
- ⁶ Lemos, S. D. C.; Rebello, T. J. J.; Lyra, J.; Marques, M.; Albarello, N. Germinação e desenvolvimento pós-seminal *in vitro* de *Ruta graveolens* L. sob influência de fenantreno e benzo[a]pireno. *Revista Ciência Agronômica* (UFC. Impresso) **2016**, 47, 737. [\[CrossRef\]](#)
- ⁷ Luttrell, W.; Thomas, C. Toxic tips: benzo(a)pyrene. *Journal of Chemical Health and Safety* **2007**, 14, 21. [\[CrossRef\]](#)
- ⁸ Alkio, M.; Tabuchi, T. M.; Wang, X.; Colón-Carmona, A. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany* **2005**, 56, 2983. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁹ Ahammed, G. J.; Wang, M. M.; Zhou, Y. H.; Xia, X. J.; Mao, W. H.; Shi, K.; Yu, J. Q. The growth, photosynthesis and antioxidant defense responses of five vegetable crops to phenanthrene stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2012**, 80, 132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹⁰ Gao, Y.; Li, H.; Gong, S. Ascorbic acid enhances the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in roots of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *PlosOne* **2012**, 7, e50467. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹¹ Díez Lazaro, J.; Kidd, P. S.; Monterroso Martinez, C. A phytogeochemical study of the Tras-os-Montes region (NE Portugal): possible species for plant-based soil remediation technologies. *The Science of the total environment* **2006**, 354, 265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹² Zhang, Z.; Rengel, Z.; Meney, K. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) differentially influence growth of various emergent wetland species. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, 182, 689. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ¹³ Reynoso-Cuevas, L.; Gallegos-Martínez, M. E.; Cruz-Sosa, F.; Gutiérrez-Rojas, M. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource technology* **2008**, 99, 6379. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

- ¹⁴ Singh, M.; Chaturvedi, R. Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from *in vitro* cell and tissue cultures of *Spilanthus acmella* Murr. *Industrial Crops and Products* **2012**, 36, 321. [CrossRef]
- ¹⁵ Debiane, D.; Garçon, G.; Verdin, A.; Fontaine, J.; Durand, R.; Grandmougin-Ferjani, A.; Shirali, P.; Sahraoui, A. L. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany* **2008**, 64, 120. [CrossRef]
- ¹⁶ Faisal, M.; Ahmad, N.; Anis, M. *In vitro* regeneration and mass propagation of *Ruta graveolens* L. - A multipurpose shrub. *HortScience* **2005**, 40, 1478. [Link]
- ¹⁷ Benzarti, S.; Mohri, S.; Ono, Y. Plant response to heavy metal toxicity: Comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype ganges) and nonaccumulator plants: lettuce, radish, and alfafa. *Environmental Toxicology* **2008**, 23, 607. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Kuzovkina, I. N.; Szarka, Sz.; Héthelyi, É.; Lemberkovics, E.; Szöke, É. Composition of essential oil in genetically transformed roots of *Ruta graveolens*. *Russian Journal of Plant Physiology* **2009**, 56, 846. [CrossRef]
- ¹⁹ Massot, B.; Milesi, S.; Gontier, E.; Bourgaud, F.; Guckert, A. Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **2000**, 62, 11. [CrossRef]
- ²⁰ Oliva, A.; Lahoz, E.; Contillo, R.; Aliotta, G. Effects of *Ruta graveolens* leaves on soil characteristics and on seed germination and early seedling growth of four crop species. *Annals of Applied Biology* **2002**, 141, 87. [CrossRef]
- ²¹ Diwan, R.; Shinde, A.; Malpathak, N. Phytochemical composition and antioxidant potential of *Ruta graveolens* L. *in vitro* culture lines. *Journal of Botany* **2012**, 2012, 1. [CrossRef]
- ²² Kummerová, M.; Váňová, L.; Fišerová, H.; Klemš, M.; Zezulka, S.; Krulová, J. Understanding the effect of organic pollutant fluoranthene on pea *in vitro* using cytokinins, ethylene, ethane and carbon dioxide as indicators. *Plant Growth Regulation* **2010**, 61, 161. [CrossRef]
- ²³ Machado, C. J. S.; Vilani, R. M.; Franco, M. G.; Lemos, S. D. C. Legislação ambiental e degradação ambiental do solo pela atividade petrolífera no Brasil. *Desenvolvimento e Meio Ambiente* **2013**, 28, 41. [CrossRef]
- ²⁴ Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **1962**, 15, 473. [CrossRef]
- ²⁶ Maia, A. B. R. A.; *Isolamento e caracterização de princípios ativos em própolis e produtos*, RHAÉ-BIOMINAS: Belo Horizonte, 1997.
- ²⁷ Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Abreu, J. A. S.; Alcici, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Food Science and Technology* **1998**, 18, 313. [CrossRef]
- ²⁸ George, E. F.; Hall, M. A.; De Klerk, G.-J.; *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd edition, Springer: Amsterdam, 2008.
- ²⁹ Bohidar, S.; Thirunavoukkarasu, M.; Rao, T. V. Effect of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of 'garden rue' (*Ruta graveolens* L.). *International Journal of Integrative Biology* **2008**, 3, 36. [Link]
- ³⁰ Sidwa-Gorycka, M.; Krolicka, A.; Orlita, A.; Malinski, E.; Golebiowski, M.; Kumirska, J.; Chromik, A.; Biskup, E.; Stepnowski, P.; Lojkowska, E. Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising approach for production of coumarins and furanocoumarins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **2009**, 97, 59. [CrossRef]
- ³¹ Szopa, A.; Ekiert, H.; Szewczyk, A.; Fugas, E. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta*

- graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **2012**, 110, 329. [[CrossRef](#)]
- ³² Orlita, A.; Sidwa-Gorycka, M.; Malinski, E.; Czerwica, M.; Kumirska, J.; Golebiowski, M.; Lojkowska, E.; Stepnowski, P. Effective biotic elicitation of *Ruta graveolens* L. shoot cultures by lysates from *Pectobacterium atrosepticum* and *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters* **2008**, 30, 541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Asolini, F. C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Brazilian Journal of Food Technology* **2006**, 9, 209. [[Link](#)]
- ³⁴ Chunlong, C.; Song, L.; Rongsu, L.; Fengping, W.; Junqing, L. Concentration of phenolic compounds of *Populus euphratica* and soil water contents in *Ejina oasis*, Inner Mongolia, China. *Acta Ecologica Sinica (International Journal)* **2008**, 28, 69. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Omosun, G.; Edeoga, H. O.; Markson, A. A. Anatomical changes due to crude oil pollution and its heavy metals component in three *Mucuna* species. *Recent Research in Science and Technology* **2009**, 1, 264. [[Link](#)]
- ³⁶ Rodríguez, A.; Infante, D. Characterization in silico of flavonoids biosynthesis in *Theobroma cacao* L. *IAEES* **2011**, 1, 34. [[Link](#)]
- ³⁷ Noori, M.; Askari, M.; Beigi, F. *Robinia Pseudoacacia* L. Flavonoids in defence of plant against soil crude oil pollution. *International Journal of Ecosystem* **2012**, 2, 1. [[Link](#)]
- ³⁸ Izbiańska, K.; Arasimowicz-Jelonek, M.; Deckert, J. Phenylpropanoid pathway metabolites promote tolerance response of lupine roots to lead stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2014**, 110, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]