

Síntese e bioensaio toxicológico frente a larvas de *artemia salina* leach de um derivado de carboidrato**Synthesis and toxicological bioensa in front of leaves of *artemia salina* leach of a carbohydrate derivative**

DOI:10.34117/bjdv6n8-714

Recebimento dos originais: 27/07/2020

Aceitação para publicação: 31/08/2020

Herbert Igor Rodrigues de Medeiros

Graduado em Farmácia
Universidade Federal da Paraíba
Campus I - Cidade Universitária, João Pessoa - PB, 58033-455
E-mail: igorpls_15@hotmail.com

Iany Louise de Medeiros

Técnico em Eletrotécnica
Universidade Federal de Campina Grande
Sítio Olho D'água da Bica, s/n, Cuité – PB, 58175-000
E-mail: ianylouise20@outlook.com

Bruna Barbosa Maia da Silva

Graduada em Farmácia
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manuel de Medeiros, Recife - PE, 52171-900
E-mail: brunambsilva1@gmail.com

Carlos Eduardo Rodrigues Aguiar

Ensino Médio Completo
Universidade Federal de Campina Grande
Sítio Olho D'água da Bica, s/n, Cuité – PB, 58175-000

Fernando Emanuel de Sousa Ferreira

Graduado em Farmácia
Universidade Federal da Paraíba
Campus I - Cidade Universitária, João Pessoa - PB, 58033-455
E-mail: ferdnan2010@hotmail.com

Natan Dias Fernandes

Graduado em Farmácia
Universidade Federal da Paraíba
Campus I - Cidade Universitária, João Pessoa - PB, 58033-455
E-mail: natandhias@gmail.com

Thiago Araújo de Medeiros Brito

Graduado em Farmácia
Universidade Federal da Paraíba

Campus I - Cidade Universitária, João Pessoa - PB, 58033-455
E-mail: thiago.farmacia.brito@gmail.com

Francisco Cesino de Medeiros Júnior

Doutor em Zootecnia

Centro Universitário de Ciências e Tecnologia do Maranhão

Rua Aarão Réis, Centro, Caxias - MA, 65606-020

E-mail: cesinocaico@yahoo.com.br

RESUMO

Os carboidratos são uma importante classe de biomoléculas, onde nos últimos anos foi comprovado que estes compostos desempenham um papel crucial na patogênese de diversas doenças, especificamente na diabetes, no desenvolvimento e crescimento do câncer, na septicemia, entre outras. Diante dos aspectos elencados, o trabalho teve como objetivo sintetizar o 1,2:3,4-Di-O-isopropilideno- α -D-galactopiranosose e avaliar sua toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. A síntese do 1,2:3,4-Di-O-isopropilideno- α -D-galactopiranosose deu-se a partir da reação entre a D-galactose e acetona empregando sulfato de cobre anidro e ácido sulfúrico concentrado, onde esta mistura foi submetida à agitação por 36 horas em temperatura ambiente e sob atmosfera inerte. Posteriormente, realizou-se o bioensaio toxicológico frente à *Artemia salina*, ao passo que a CL₅₀ das artêmias foi determinado através do *software* POLO-PC. O composto avaliado foi obtido com um ótimo rendimento, na forma de um líquido amarelado e a CL₅₀ encontrada através do *software* POLO-PC, com 95% de confiança, foi de 2300,020 μ g/mL, implicando em baixa toxicidade, ou seja, o composto sintetizado é atóxico. Os derivados de carboidratos não tóxicos são muito promissores, visto sua utilização em diversas áreas, como sua incorporação em produtos de prevenção contra cáries e de higiene oral. Em suma, o 1,2:3,4-Di-O-isopropilideno- α -D-galactopiranosose apresentou-se como um composto atóxico, o que servirá como motivação para futuros estudos de atividade biológica e/ou farmacológicas devido a esta importante característica.

Palavras-chave: Carboidratos; Toxicidade; *Artemia salina*.

ABSTRACT

Carbohydrates are an important class of biomolecules, where in recent years these compounds have been shown to play a crucial role in the pathogenesis of various diseases, specifically in diabetes, cancer development and growth, septicemia, among others. In view of the listed aspects, the work aimed to synthesize 1,2: 3,4-Di-O-isopropylidene- α -D-galactopyranose and to evaluate its toxicity against the microcrustacean *Artemia salina* Leach. The synthesis of 1,2: 3,4-Di-O-isopropylidene- α -D-galactopyranose occurred from the reaction between D-galactose and acetone using anhydrous copper sulfate and concentrated sulfuric acid, where this mixture was subjected to stirring for 36 hours at room temperature and in an inert atmosphere. Subsequently, the toxicological bioassay was performed against *Artemia salina*, while the LC₅₀ of the brine shrimp was determined using the POLO-PC software. The evaluated compound was obtained with an excellent yield, in the form of a yellowish liquid and the LC₅₀ found through the POLO-PC software, with 95% confidence, was 2300.020 μ g / mL, implying low toxicity, that is, the synthesized compound is non-toxic. Derivatives of non-toxic carbohydrates are very promising, given their use in several areas, such as their incorporation in tooth decay and oral hygiene products. In short, 1,2: 3,4-Di-O-isopropylidene- α -D-galactopyranose was presented as a non-toxic compound, which will serve as a motivation for future studies of biological and / or pharmacological activity due to this important feature.

Keywords: Carbohydrates; Toxicity; Saline artemia.

1 INTRODUÇÃO

Os carboidratos representam uma importante classe de biomoléculas encontradas em plantas, animais e bactérias (BANDERA et al., 2014). Segundo Oliveira (2002), estima-se que a maior parte de toda biomassa produzida no planeta é constituída por diferentes carboidratos. De acordo com Nogueira (2005), eles constituem as bases de várias indústrias, principalmente da farmacêutica, utilizados como vacinas, soluções intravenosas, antibióticos e como material de partida quiral para a síntese de agentes farmacêuticos. Nos últimos anos, foi demonstrado que estes compostos desempenham um papel crucial na patogênese de muitas doenças, particularmente da diabetes, infecções bacterianas e virais, inflamação, desenvolvimento e crescimento do câncer, septicemia, entre outras (NIGUDKAR, DEMCHENKO, 2015). Devido a esses aspectos elencados, é justificável o crescente aumento de artigos científicos, livros e grupos de pesquisas estudando a química dos carboidratos. Diante dessas considerações, o presente trabalho objetivou sintetizar o 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose e depois realizar o bioensaio toxicológico frente à *Artemia salina* Leach. O bioensaio toxicológico utilizando as larvas da *Artemia salina* é um método simples, rápido e de baixo custo (MERINO et al., 2015).

2 METODOLOGIA

2.1 MATERIAL E INSTRUMENTAÇÃO

A reação foi realizada utilizando solventes e reagentes na sua forma comercial (P.A.), enquanto que o monitoramento da reação aconteceu por meio da cromatografia em camada delgada (CCD). Para visualização da CCD, foi utilizada luz ultravioleta e vapor de iodo. As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em um espectrômetro VARIAN[®] modelo *Unity Plus-300* utilizando como solvente o clorofórmio deuterado (DMSO- d_6). Este espectrômetro foi calibrado usando tetrametilsilano (0,00 ppm) como referência interna para os núcleos de ^1H e ^{13}C , e todas as constantes de acoplamento (J) foram descritas em hertz (Hz). O ponto de fusão foi realizado no *Electro-thermal* série IA 9100 *Digital Melting Point*. O espectro de infravermelho foi obtido em espectrofotômetro de IV com Transformada de Fourier, sendo a amostra preparada como pastilhas de KBr. As estruturas dos compostos foram geradas através do *software* ChemBioUltra[®] versão 12.0.

2.2 PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO 1,2:3,4-DI-O-ISOPROPILIDENO- α -D-GALACTOPIRANOSE

Em um balão de fundo de capacidade de 250 mL, contendo 45 mL de propanona (acetona) seca e destilada, foram adicionados a D-galactose anidra (2,0 g, 6,6 mmol), CuSO₄ anidro (4,5 g, 28 mmol) e 0,23 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura reacional foi agitada por 36 horas em temperatura ambiente e sob atmosfera inerte. Uma vez comprovado o término da reação por CCD, o CuSO₄ foi removido por filtração a vácuo e lavado com acetona. Na sequência o filtrado foi neutralizado com bicarbonato de sódio. O produto bruto foi concentrado utilizando um evaporador rotativo e purificado por cromatografia em coluna em um sistema eluente hexano/acetato de etila (7,5:2,5).

2.3 BIOENSAIO TOXICOLÓGICO FRENTE A LARVAS DE ARTEMIA SALINA LEACH

O bioensaio toxicológico com *Artemia salina* Leach foi baseado no protocolo descrito por Meyer e colaboradores (1982). Foram utilizados 30 mg do 1,2:3,4-di-O-isopropilideno- α -D-galactopiranoose, a qual foi adicionado 50 μ l de dimetilsulfóxido. A solução foi homogeneizada e o volume completado para 5 ml com água salinizada filtrada (água do mar e água destilada 1:1) a pH = 8,0. Desta solução foram retiradas alíquotas de 2500, 2291, 2083, 1875, 1666, 1458 e 1250 μ l que foram transferidas para outros balões volumétricos de 5 ml e os volumes completados com o mesmo solvente, obtendo-se concentrações de 3000, 2750, 2500, 2250, 2000, 1750 e 1500 μ g/ml, para a solução aquosa de 1,2:3,4-Di-O-isopropilideno- α -D-galactopiranoose. O teste foi acompanhado por controle positivo onde utilizou-se o dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) e controle negativo utilizando apenas água marinha artificial e dimetilsulfóxido. Os cistos de *Artemia salina* (20 mg) foram incubados sob iluminação artificial por 48 horas para que houvesse a eclosão das larvas (metanáuplios), e estas, separadas em nove grupos com 10 artêmias cada. O primeiro e o segundo grupo recebeu a solução controle positivo (solvente e dicromato de potássio) e controle negativo (solvente e dimetilsulfóxido) e as sete seguintes receberam a solução aquosa do composto em diferentes concentrações. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas, e após este período foram contabilizadas as larvas vivas e mortas. O experimento foi realizado em triplicata para cada substância-teste.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para obtenção dos valores da concentração letal para matar 50% das larvas (CL₅₀), foi utilizada a análise através do *software* POLO-PC (Copyright LeOra Software 1987) com 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi iniciado com a síntese do 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose a partir da reação entre a D-gactose e acetona empregando sulfato de cobre e ácido sulfúrico. Esta síntese seguiu o método descrito por Schmidt (1963), com algumas modificações, o 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose foi obtido com 91% de rendimento na forma de um líquido amarelado, cujo valor da rotação específica foi de $[\alpha]_D^{25} - 44,3$ (c 1,0, MeOH), valor esse, próximo ao relatado por Schmidt (1963). O 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose foi caracterizado pelas técnicas espectroscópicas de IV e RMN ¹H e ¹³C, cujos os dados obtidos foram: no infravermelho (Pastilha de KBr), principais bandas de vibração, 3440, 2985, 2937, 1379, 1069 cm⁻¹; no espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), sinais em ppm, 5,55 (*d*, 1H, J_{3,4} = 5,08 Hz, H-3), 4,60 (*dd*, 1H, J_{5,4} = 2,36 Hz, J_{5,8} = 7,84 Hz, H-5), 4,32 (*dd*, 1H, J_{4,3} = 5,08 Hz, J_{4,5} = 2,36 Hz, H-4), 4,26 (*dd*, 1H, J_{8,5} = 7,84 Hz, J_{8,9} = 1,56 Hz, H-8), 3,89-3,69 (*m*, 3H, H-9, H-10, H-10'), 2,16 (*sl*, 1H, OH), 1,44 (*s*, 3H, -CH₃), 1,32 (*s*, 6H, -CH₃), 1,24 (*s*, 3H, -CH₃); no espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), sinais em ppm, 109,4; 108,6; 96,2; 71,5; 70,7; 70,5; 68,1; 62,3; 29,2; 26,0; 25,9; 24,3.

Uma vez sintetizado e caracterizado o 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose, a próxima etapa do trabalho foi realizar o bioensaio toxicológico deste composto frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach, no qual os valores da taxa de mortalidade deste composto variou entre 0 e 100 %, visando determinar a concentração letal para matar 50% das larvas (CL₅₀). Deste modo, a CL₅₀ encontrada através do *software* POLO-PC, com 95% de confiança, foi de 2300,020 µg/mL com intervalo nos limites 2242,612 a 2367,418 µg/mL. De acordo com Merino et al. (2015), o valor da CL₅₀ igual a 2300,020 µg/mL implica que o 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose apresenta baixa toxicidade, uma vez que esse valor se enquadra nos índices superiores a 1000 µg/mL. O controle negativo não levou a morte de nenhuma larva, enquanto que a CL₅₀ do controle positivo foi semelhante ao descrito por Belem et al. (2015). Devulapalle et al. (2004), relata que os derivados de carboidratos considerados não tóxicos são muito promissores, principalmente pela sua incorporação em produtos de prevenção contra cáries e de higiene oral para o combate da placa bacteriana. Diante disso, o resultado da CL₅₀ encontrado para o 1,2:3,4-Di-*O*-

isopropilideno- α -D-galactopiranosose servirá como motivação para futuros estudos de atividade biológica e/ou farmacológicas devido a baixa toxicidade.

4 CONCLUSÕES

Em suma, o 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose foi sintetizada em bom rendimento (91%) e sua estrutura confirmada por diferentes técnicas espectroscópica. A avaliação de toxicidade do 1,2:3,4-Di-*O*-isopropilideno- α -D-galactopiranosose frente as larvas da *Artemia Salina* Leach resultou na CL₅₀ 2300,020 μ g/mL, valor esse que implica em baixa toxicidade.

FOMENTO

CNPQ, CAPES, UFCG-CES.

REFERÊNCIAS

- BANDERA, D.; SAPKOTA, J.; JOSSET, S.; WEDER, C.; TINGAUT, P.; GAO, X.; FOSTER, E. J.; ZIMMERMANN, T. *React. Funct. Polym.* 85, p. 134-141, 2014.
- BELEM, V. A.; LIMA, F. G. C.; BARROS, L. M.; DUARTE A. E. Estudo da toxicidade e atividade antifúngica de *Lantana camara* L. (Verbenaceae) como ferramenta de preservação da espécie. *Caderno de Cultura e Ciência*, ano IX, vol. 13, n. 2, p. 51-59, 2015.
- DEVULAPALLE, K. S.; SEGURA, A. G.; FERRER, M.; ALCALDE, G. M.; PLOU, F. J. *Carbohydr. Res.* 339, 1029, 2004.
- MERINO, F. J. Z.; OLIVEIRA, V. B.; PAULA, C. S.; CANSIAN, F. C.; SOUZA, A. M.; ZUCHETTO, M.; HIROTA, B. C. K.; DUARTE, A. F. S.; KULIK, J. D.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Planta Médica*. vol. 17, n. 4, p.1031-1040, 2015.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 45, p. 31-34, 1982.
- NIGUDKAR, S. S.; DEMCHENKO, A. V. Stereocontrolled 1,2-*cis* glycosylation as the driving force of progress in synthetic carbohydrate chemistry. *Chem. Sci.*, 6, 2687, 2015.
- NOGUEIRA, C. M. Síntese e Avaliação Biológica de Derivados de Carboidratos e Nucleosídeos. 2005. 162f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos – SP, 2005.
- OLIVEIRA, R. N.; FREITAS FILHO, J. R.; SRIVASTAVA, R. N. Microwave-induced synthesis of 2,3-unsaturated O-glycosides under solvent-free conditions. *Tetrahedron Letters*. Recife, v. 43, p. 2141-2143, 2002.
- SCHMIDT, O. T.; In: Whistler, Roy L.; Wolfrom, M. L. ed.s. *Methods in carbohydrate chemistry*. Volume 2, Reactions of carbohydrates. Academic Press: New York, p. 318-325, 1963.