

## SÍNTESE E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA BENZAMIDOXIMA FRENTE A LARVAS DE *ARTEMIA SALINA LEACH*

Herbert Igor Rodrigues de Medeiros<sup>1</sup>; Rodrigo Ribeiro Alves Caiana<sup>2</sup>; Fernando de Sousa Oliveira<sup>3</sup>; Juliano Carlo Rufino Freitas<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Campina Grande, igorpls\_15@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Campina Grande, rodrigoriibeiroalves@hotmail.com

<sup>3</sup> Univerdade Federal de Campina Grande, fernandoufcg@hotmail.com

<sup>4</sup> Univerdade Federal de Campina Grande, julianocrf@gmail.com

### Introdução

Atualmente, as amidoximas apresentam inúmeras aplicações nos mais variados campos do conhecimento. Por exemplo, na área da química sintética as amidoximas são utilizadas como precursores de inúmeros sistemas heterocíclicos, enquanto que na área farmacológica e biológica atuam como pró-fármacos das amidinas (FREITAS et al., 2015). Especificamente, a literatura descreve alguns estudos da atividade da benzamidoxima como antitripanossomicidas, tuberculostáticas e hipotensivas (LOPES et al., 2005). Apesar da importância dessas substâncias, após proposição em algumas plataformas de pesquisa tais como: *Scielo* e *Web of Science*, não foi encontrado relatos do ensaio de toxicidade da benzamidoxima frente à *Artemia salina*. A *Artemia salina*, popularmente conhecida como camarão salmoura, é uma espécie de microcrustáceo da ordem *Anostraca* e família *Artemiidae* (MEYER et al., 1982), empregada na avaliação preliminar da toxicidade de substâncias de origem natural ou sintética (BELÉM et al., 2015), uma vez que é um método simples, rápido e de baixo custo (MERINO et al., 2015). Vale ressaltar que este ensaio é muito usado em testes de ecotoxicologia, para a avaliação da toxicidade de efluentes e poluentes ambientais (PETERS et al., 1997) e de acordo com Garcia-Rodriguez et al. (2004), foi possível detectar toxinas produzidas por cianobactérias através do ensaio utilizando à *Artemia salina*. Diante dessas considerações, no presente trabalho objetivou-se, sintetizar e avaliar a toxicidade da benzamidoxima frente à *Artemia salina*.

### Metodologia

#### *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 a visualização da CCD, foi utilizada luz ultravioleta. As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em um espectrômetro *VARIAN*<sup>®</sup> modelo *Unity Plus-300* utilizando como solvente o clorofórmio deuterado. Este espectrômetro foi calibrado usando tetrametilsilano (0,00 ppm) como referência interna para os núcleos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>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.

#### *Procedimento para síntese da benzamidoxima*

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 125 mL foram adicionados o cloridrato de hidroxilamina (1,04 g; 15 mmol), o carbonato de sódio (0,78 g; 7,50 mmol) e a água (20 mL). Depois colocou-se o balão em um banho ultrassônico até cessar a efervescência. Após o término da efervescência, adicionou-se a benzonitrila (0,51 mL; 0,51 g; 5,00 mmol) e o etanol (20 mL), e outra vez levou-se o balão ao banho ultrassônico sob temperatura de 55±5°C, por 20 minutos. Após a comprovação do término da reação através da CCD, concentrou-se a mistura reacional

utilizando um evaporador rotatório à pressão reduzida. Ao sistema bifásico formado, adicionou-se acetato de etila (70 mL) e lavou-se a fase orgânica com solução saturada de cloreto de amônio (2 x 40 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (2 x 40 mL). Depois a fase orgânica foi secada sob  $MgSO_4$  anidro. O solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo e o produto bruto foi cristalizado usando o sistema clorofórmio:hexano.

#### ***Toxicidade frente a larvas de Artemia salina Leach.***

O ensaio toxicológico com *Artemia salina Leach* foi baseado no protocolo descrito por Meyer et al. (1982). Foram utilizados 10 mg da benzamidoxima, a qual foi adicionado 50  $\mu$ L de dimetilsulfóxido. A solução foi homogeneizada e o volume completado para 5 mL com água salinizada filtrada (água salina artificial preparada a partir de 38 g de sal marinho *Marinex*<sup>®</sup> em 1 L de água destilada) a pH = 8,0. Desta solução foram retiradas alíquotas de 375, 250, 187,5, 125, 87,5, 62,5 e 25  $\mu$ L que foram transferidas para outros balões volumétricos de 5 mL e os volumes completados com o mesmo solvente, obtendo-se concentrações de 150, 100, 75, 50, 35, 25 e 10  $\mu$ g/mL para a solução aquosa de benzamidoxima. O teste foi acompanhado por controle positivo onde utilizou-se o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) e controle negativo utilizando apenas água marinha artificial e dimetilsulfóxido. Os cistos da *Artemia salina* (20 mg) foram incubados sob iluminação artificial por 48 horas para que houvesse a eclosão das larvas (metanúplios), 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 os sete seguintes receberam a solução aquosa do composto em diferentes concentrações. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas, após este período foram contabilizadas as larvas vivas e mortas. O experimento foi realizado em triplicata para cada substância-teste.

#### ***Análise estatística***

Para obtenção dos valores da concentração letal para matar 50% das larvas ( $CL_{50}$ ), foi utilizada a análise através do *software POLO-PC* (Copyright LeOra Software 1987).

#### **Resultados e discussão**

O trabalho foi iniciado com a síntese da benzamidoxima a partir da reação entre a benzonitrila e cloridrato de hidroxilamina em meio hidroetanólico. Deste modo, empregando o método descrito por Barros et al. (2011), com algumas modificações, a benzamidoxima foi obtida com 80% de rendimento na forma de um sólido cristalino, cujo o ponto de fusão variou de 78-79 °C, valor esse, próximo ao relatado por Andrade, Freitas Filho e Freitas (2016). Adicionalmente, a benzamidoxima foi caracterizada pelas técnicas espectroscópicas de IV e RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, cujos os dados obtidos foram: no infravermelho (Pastilha de KBr), principais bandas de vibração, 3945, 3453, 3361, 3229, 3057, 2893, 2285, 1649, 1591, 1450, 1387, 1104, 926, 17, 79, 691, 582  $cm^{-1}$ ; no espectro de RMN <sup>1</sup>H ( $CDCl_3$ , 400 MHz), sinais em ppm, 8,91 (s, 1H, OH); 7,64-7,62 (m, 2H,  $H_{aromático}$ ); 7,4-7,3 (m, 3H,  $H_{aromático}$ ); 4,96 (s, 2H,  $NH_2$ ); no espectro de RMN <sup>13</sup>C ( $CDCl_3$ , 100 MHz), sinais em ppm, 151,0;133,5; 129,0; 128,2; 125,5. Uma vez sintetizado e caracterizado a benzamidoxima, a próxima etapa do trabalho foi avaliar a sua toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina Leach*, no qual os valores da taxa de mortalidade desta substância variou entre 0 e 100 %, visando determinar a concentração letal para matar 50% das larvas ( $CL_{50}$ ). Deste modo, a  $CL_{50}$  encontrada através do *software POLO-PC*, com 95% de confiança, foi de 40,724  $\mu$ g/mL com intervalo de confiança nos limites 37,881 a 43,775  $\mu$ g/mL. De acordo com Merino et al. (2015), o valor da  $CL_{50}$  igual a 40,724  $\mu$ g/mL implica que a benzamidoxima apresenta elevada toxicidade, uma vez que esse valor se enquadra nos índices inferiores a 100  $\mu$ g/mL. Em geral, extratos e substâncias com alta toxicidade contra a *A. salina* sugerem alto potencial para atividades biológicas, sendo, portanto, muito útil à utilização deste bioensaio, no direcionamento de estudos na busca de

substâncias bioativas (AMARANTE, et al., 2011). O controle negativo não levou a morte de nenhuma larva, enquanto que a  $CL_{50}$  do controle positivo foi semelhante ao descrito por Belem et al. (2015). Vale ressaltar, que o resultado encontrado para benzamidoxima no bioensaio com *A. salina* serve como motivação para futuros estudos envolvendo outras amidoximas.

### Conclusões

Em suma, a benzamidoxima foi sintetizada em bom rendimento (80%) utilizando a irradiação de ultrassom e sua estrutura confirmada por diferentes técnicas espectroscópica. A avaliação de toxicidade da benzamidoxima frente às larvas da *Artemia Salina Leach* resultou na  $CL_{50}$  40,724 µg/mL, valor esse que implica em elevada toxicidade.

**Palavras-Chave:** Benzamidoxima; Toxicidade; *Artemia Salina Leach*.

**Fomento:** CNPQ, CAPES, UFCG-CES.

### Referências

- AMARANTE, C. B., MÜLLER, A. H., PÓVOA, M. M., DOLABELA, M. F. Estudo Fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*M. linifera*). *Acta Amazonica*, vol.41, n. 3, p. 431, 2011.
- ANDRADE, D.; FREITAS FILHO, J. R. F.; FREITAS, J. C. R. Aplicação de amidoximas como catalisadores da reação de alilação por aliltrifluoroborato de potássio em meio bifásico. *Química Nova*. vol. 39, n. 10, p. 1225-1235, 2016.
- BARROS, C. J. P.; DE FREITAS, J. J. R.; OLIVEIRA, R. N.; FREITAS FILHO, J. R. Synthesis of amidoximes using an efficient and rapid ultrasound method. *Journal of the Chilean Chemical Society*. vol.56, n.2, p 721-722, 2011.
- 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.
- FREITAS FILHO, J. R.; da SILVA, R. L.; da SILVA, E. E.; SANTOS, J. A. M.; de FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R. Amidoximas: Aplicações e Principais Estratégias Sintéticas. *Revista Virtual Química*. vol. 7, n. 6, p. 2549-2596, 2015.
- GARCIA-RODRIGUEZ, A.; CAETANO, G. G. I.; BORGES, M. B.; SANTOS, C. A.; CARDOSO, G. S. Toxicidade por microcystis sp. E, Goiás: Estudo dos efeitos tóxicos em camundongos e *Artemia salina*. *Estudos*. vol. 31, n. 9, p.1595-1606, 2004.
- LOPES, P. G. M.; SPADER, T.; ALVES, S. H.; DORNELLES, L. Perspectivas sobre atividades antimicrobianas de compostos derivados 1,2,4-oxadiazólicos. *Saúde*. vol. 31, n. 1-2, p. 57-58, 2005.
- 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.; FERRIGNE, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. E. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. vol. 45, p. 31-34, 1982.
- PETERS, E. C.; GASSMAN, N. J.; FIRMAN, J. C.; OBERT R. H.; RICHMOND, R. H.; POWER, E. A. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 16, n. 1, p. 12-40, 1997.