

SÍNTESE DO 1,2:3,4-DI-*O*-ISOPROPILIDENO- α -D-GALACTOPIRANOSE E BIOENSAIO TOXICOLÓGICO FRENTE A LARVAS DE *ARTEMIA SALINA LEACH*

Herbert Igor Rodrigues de Medeiros¹; Antonio Ruan Souto Dos Santos²; Fernando de Sousa Oliveira³; Juliano Carlo Rufino Freitas⁴

¹ Universidade Federal de Campina Grande, igorpls_15@hotmail.com

² Universidade Federal de Campina Grande, ruam_souto@hotmail.com

³ Univerdade Federal de Campina Grande, fernandoufcg@hotmail.com

⁴ Univerdade Federal de Campina Grande, julianocrf@gmail.com

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 aos 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-galactopiranoose 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).

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 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 ¹³C, 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.

Procedimento para síntese do 1,2:3,4-di-O-isopropilideno- α -D-galactopiranoose

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).

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-galactopiranosose, 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-galactopiranosose. 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 de *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 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.

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) com 95% de confiança.

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 ^{13}C , 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 ($CDCl_3$, 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, $-CH_3$), 1,32 (*s*, 6H, $-CH_3$), 1,24 (*s*, 3H, $-CH_3$); no espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 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 (CL_{50}). Deste modo, a CL_{50} encontrada através do *software POLO-PC*, com 95% de confiança, foi de 2300,020 μ g/mL com intervalo nos limites 2242,612 a 2367,418 μ g/mL. De acordo com Merino et al. (2015), o valor da CL_{50} igual a 2300,020 μ g/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.

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 µg/mL, valor esse que implica em baixa toxicidade.

Palavras-Chave: D-galactose; Toxicidade; *Artemia Salina Leach*.

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.