

Planejamento, Síntese e Avaliação biológica de derivados de cumarinas

Gabriela Hilario Cardoso Oliveira^{*1} (PG), Raíssa Kelly Corrêa de Paiva¹ (PG), Luciana Machado Ramos¹ (PQ).

*gabriela.hc@hotmail.com

¹Mestrado em Ciências Moleculares, UEG-CCET, Anápolis.

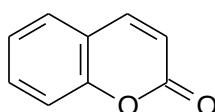
Resumo: As cumarinas representam uma importante classe de heterociclos. Ocorrem na natureza, em forma de metabólitos secundários disponibilizados por plantas, fungos e bactérias. Seus derivados estão correlacionados a diferentes atividades biológicas como atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, anti-tumoral, anticoagulante, anti-hipertensiva entre outras. Por apresentar aplicações e atividades diversificadas, o interesse por derivados de cumarinas vem ganhando destaque em estudos. Um dos ensaios utilizados para a análise da toxicidade de substâncias é o ensaio biológico com *Artemia salina* que é um microcrustáceo de água salgada. Este ensaio é amplamente empregado para análise de compostos orgânicos por ser um ensaio de acessível e confiável. Foram sintetizadas três diferentes cumarinas, a 3-Acetil-2H-1-benzopirano-2-ona, a Etil 3-(2-oxo-2H-Cromen-3-il)-3-oxopropano-ato e 3-acetil-7- (dietilamino) -2H-cromen-2-ona, através de uma metodologia que favoreceu os resultados obtidos. Posteriormente foi realizado o ensaio biológico das cumarinas sintetizadas frente a *Artemia salina*. Os resultados obtidos mostraram uma toxicidade moderada para as 3-Acetil-2H-1-benzopirano-2-ona, a Etil 3-(2-oxo-2H-Cromen-3-il)-3-oxopropano-ato e para a 3-acetil-7- (dietilamino) -2H-cromen-2-ona, alta toxicidade, frente ao microcrustáceo podendo assim estar relacionada a atividades biológica diversas como atividade tripanomicida.

Palavras-chave: Cumarina. Atividade biológica. bioatividade

Introdução

As Cumarinas (2H-1-Benzopirano-2-ona) representam uma importante classe de heterocíclicos (Figura 1) derivados do ácido cinâmico (VITO et al., 2015).

Figura 1. Núcleo cumarina



Podem ser classificadas em cumarinas simples, piranocumarinas, cumarinas oxigenadas e fenilcumarinas (BOURGAUD et al., 2006).

Diversos estudos com derivados de cumarinas tem sido realizados sobre a atividade biológicas das cumarinas, dentre elas destacam-se atividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, anti-tumoral, anticoagulante, anti-hipertensiva (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013) entre outras.

Por apresentar diversas propriedades e aplicações, as cumarinas tem se tornado um alvo para a síntese de novos heterociclos. A síntese desses novos compostos pode ocorrer tendo a cumarina com um precursor, podendo sofrer diferentes reações e gerar produtos promissores (MEDINA et al., 2015).

Um dos ensaios biológicos que pode ser aplicado para a avaliação da toxicidade de compostos é através do ensaio biológico com *Artemia salina* Leach (GRAMMOU et al., 2011).

Segundo Dolabela e colaboradores (1997), o ensaio biológico frente a *Artemia salina* (TAS), é um teste preliminar que pode ser correlacionado com possível atividade anti-bacteriana, antifúngica, atividade tripanomicida e também atividade anti-tumoral.

Este método é baseado na toxicidade dos compostos com a Dose Letal média (DL_{50}) em *Artemias salina*, para concentrações de DL_{50} em *A. salina* $DL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$, altamente tóxico; DL_{50} entre $80 \mu\text{g/mL}$ e $250 \mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxico; $DL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, com baixa toxicidade ou não tóxico e valores $DL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$, estes, são considerados atóxicos (DOLABELA, 1997).

Estão correlacionados atividade tripanomicida em compostos que apresentam DL_{50} na faixa de $80 \mu\text{g/mL} < DL_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$ e atividade antitumoral para compostos que apresentam $DL_{50} < 145 \mu\text{g/mL}$ (DOLABELA, 1997).

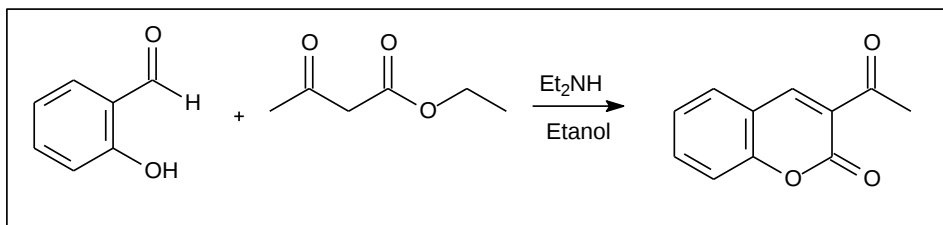
Dessa forma, o presente trabalho, visa a síntese de algumas cumarinas assim como avaliação da atividade citotóxica através do ensaio biológico com *Artemia salina*.

Material e Métodos

Síntese da 3-Acetil-2H-1-benzopiran-2-ona: Em balão de fundo redondo foram adicionados 0,2 mol de salicialdeído (21,34 mL) e 0,25 mol de acetoacetato de etila (31,89 mL) e 5 mL de etanol. Deixou-se agitando em banho de gelo e lentamente foram adicionados 3mL de dietilamina, após 20 minutos foi observado a formação de um precipitado de coloração amarela, a reação foi lavada com etanol gelado.

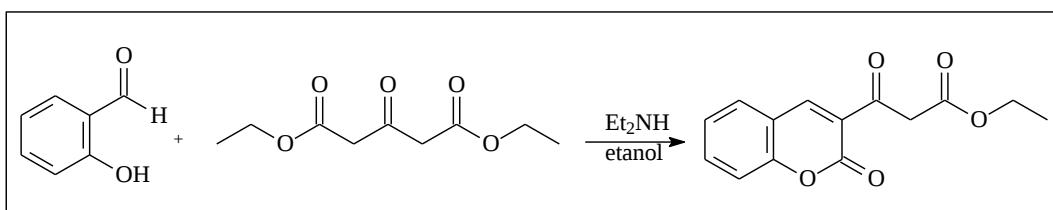
Após seca, calculou-se o rendimento da reação e tirou o respectivo ponto de fusão (Esquema 2).

Esquema 2. Síntese da 3-Acetil-2H-1-benzopiran-2-ona



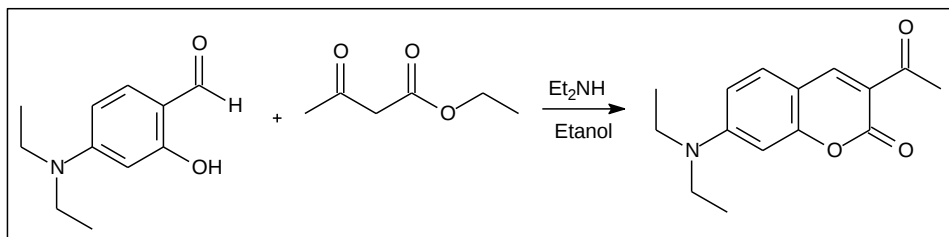
Síntese da Etil 3-(2-oxo-2H-Cromen-3-il)-3-oxopropano-ato: Em um balão de fundo redondo foram adicionados 10 mmol de salicilaldeído (1,22g) e 10 mmol de dietil 1,3- acetoadicarbóxilato (2,022 g) e 2 mL de metanol sob agitação em banho de gelo por 30 min. Posteriormente foi adicionado 0,5 mL de dietilamina e deixou em agitação por mais 30 min, repetiu-se o processo mais duas vezes (totalizando 1,5mL). Após a adição de dietilamina, deixou-se o sistema em T.A sob agitação por 24 horas, percorrido o tempo reacional, o precipitado amarelo foi lavado com etanol gelado, e após seca, tirou-se o ponto de fusão e calculou-se o rendimento (Esquema 3).

Esquema 3. Síntese da Etil 3-(2-oxo-2H-Cromen-3-il)-3-oxopropano-ato.



Síntese da 3-acetil-7- (dietilamino) -2H-cromen-2-ona: Foram adicionados em um balão de fundo redondo de 50 mL 0,00284 mol (0,5493g) de dietilaminosalicilaldeído e 1mL de etanol e deixou-se o sistema em constante agitação. Posteriormente em banho de gelo, foram adicionados ao balão 0,00284mol(0,3692g) de acetoacetato de etila, e lentamente foram adicionados 100μL de dietilamina, e deixou-se a reação em agitação por 1h.Após esse período a reação foi refluxada por 1h. Observou-se a formação de precipitados amarelos, que foram então filtrados a vácuo com etanol gelado e após seco, foi pesada e determinou-se o ponto de fusão (Esquema 4).

Esquema 4. Síntese da 3-acetil-7- (dietilamino) -2H-cromen-2-ona.



Ensaio com *Artemia salina* L.

Preparou-se a solução salina (36,5 g/L) com pH 9,6 e colocou os cistos para eclodirem no período de 48 horas sob luz artificial, para que o microcrustáceo atingisse a fase ideal (Naúplio) para o ensaio .

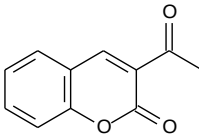
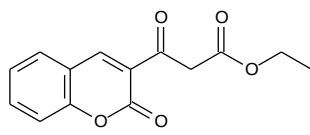
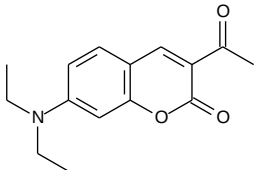
Posteriormente, foram preparadas soluções com os produtos em diferentes concentrações: 12,5, 25 e 50 µg/mL (solubilizados em DMSO 5% e solução salina) e adicionado 10 larvas de *Artemia salina* em cada amostra. O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando-se como controle o DMSO e o K₂Cr₂O₇.

Após o período de 24 horas, realizou-se a contagem de *Artemias* vivas e mortas e o cálculo da dose letal de 50% (DL₅₀) de acordo o método de Probitos.

Resultados e Discussão

As cumarinas foram obtidas através de uma metodologia simples e que favoreceu os resultados.

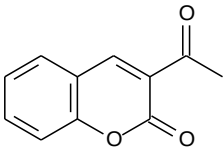
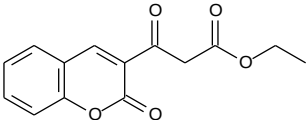
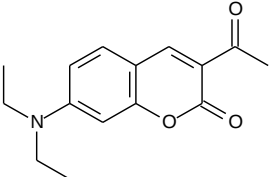
Tabela 1. Resultados obtidos para as cumarinas sintetizadas.

Cumarinas	Ponto de fusão	Rendimento
	120- 121°C	59%
	130- 131°C	67%
	155- 157°C	45%

Os produtos obtidos foram então submetidos ao ensaio biológico frente a *Artemia salina*, a fim de verificar a toxicidade dos compostos obtidos conforme estabelecido por Dolabella (1997).

A tabela 2 abaixo, mostra os valores de DL₅₀ para os compostos em estudo.

Tabela 2. Resultado do teste biológico DL₅₀ para as cumarinas sintetizadas.

Composto	DL ₅₀	Toxicidade
	228,71	moderadamente tóxico
	149,50	moderadamente tóxico
	0,18	altamente tóxico

Analisando os resultados obtidos, é possível verificar as cumarinas sintetizadas apresentaram valores de DL₅₀ entre 80µg/mL e 250 µg/mL, sendo moderadamente tóxico e DL₅₀ menor que 80µg/mL com alta toxicidade, podendo assim apresentam atividades biológicas associadas.

Considerações Finais

A metodologia utilizada para a síntese das cumarinas proporcionou a obtenção dos produtos de forma satisfatória, através do uso de solventes convencionais, podendo ser amplamente empregada para síntese de diversos heterociclos com aplicações variadas.

O ensaio biológico frente a *Artemia salina* apresentou valores significativos quanto a atividade biológica dos produtos obtidos demonstrando toxicidade moderada frente ao microcrustáceo.

Agradecimentos

CNPq, UEG, BOLSA BIP e PRÓ-PROJETO PESQUISA EDITAL 026/2016.

Referências

BOURGAUD, F.; HEHN, A.; LARBAT, R.; DOERPER, S.; GONTIER, E.; KELLNER, S.; MATERN, U. Biosynthesis of coumarins in plants: A major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2–3, p. 293–308, 2006.

DOLABELA, M. F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. 1997. Belo Horizonte. 130 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

GRAMMOU, A.; PAPADIMITRIOU, C.; SAMARAS, P.; VASARA, E.; PAPADOPOULOS, A. I. Effect of municipal waste water effluent upon the expression of Glutathione S-transferase isoenzymes of brine shrimp *Artemia*. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 105–109, 2011.

MEDINA, F. G.; MARRERO, J. G.; MACÍAS-ALONSO, M.; GONZÁLEZ, M. C.; CÓRDOVA-GUERRERO, I.; TEISSIER GARCÍA, A. G.; OSEGUEDA-ROBLES, S. Coumarin heterocyclic derivatives: chemical synthesis and biological activity. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 10, p. 1472–1507, 2015.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. **BioMed research international** v. 2013, n. Table 1, 2013.

VITO, F.; PEREIRA, T. M.; CASTRO, R. N.; GUEDES, G. P.; GRAEBIN, C. S.; KU, A. E. Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin – dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction †. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 2323-2332, 2015.