

TESTE DE TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE DERIVADOS CUMÁRICOS

Alexandre Santiago Silva Cardoso¹ (PG), Luciana Machado Ramos² (PQ)

Alexandresscardoso@hotmail.com

Resumo: Conhecidas como benzopironas, as cumarinas são metabólitos secundários que podem advir de origem natural através da sua extração em plantas, alguns fungos e vírus ou de origem sintética através de ferramentas da química orgânica. À estas moléculas são atribuídas diversas atividades biológicas que possam ter potencial farmacológico. Elas ainda podem ser utilizadas como precursores para a síntese de outros derivados bioativos, sendo empregadas em diversas reações, dentre elas, as reações multicomponentes. As reações multicomponentes têm sido amplamente estudadas por se constituírem como um protocolo extremamente eficaz na síntese de compostos biologicamente ativos, em especial, a reação de Mannich. No presente trabalho foram obtidos três derivados cumaríneos via reação de Mannich, os quais apresentaram DL₅₀ que variaram de 40,04 a 57,84, o que permitiu classificar esses derivados como possíveis agentes tripanomissidas e antitumoral. Adicionalmente, os compostos supracitados apresentaram valores de concentração mínima inibitória (CMI₅₀) entre 2000 a 1000 µg/mL quando submetidos ao teste de sensibilidade à antimicrobianos, demonstrando possível atividade bactericida/bacteriostática.

Palavras-chave: Cumarinas. Reações de Mannich. Concentração Mínima Inibitória (CMI).

Introdução

As cumarinas (benzopironas), representam uma classe de metabólitos secundários que podem ser encontrados na sua forma natural oriunda de diversas classes de plantas e de algumas espécies de fungos e vírus, ou na sua forma sintética advindo de ferramentas da química orgânica. A esses compostos atribui-se uma grande variedade de atividades biológicas como: antibióticas, anti-inflamatória, bronco dilatadora, fungicida e anticoagulante, o que atrai a atenção de diversos pesquisadores (SANTOS et al., 2013; SIMÕES et al., 1999).

Na forma sintética, estas moléculas podem ser sintetizadas através de várias metodologias como por exemplo Pechmann, Perkin, de Knoevenagel, Reformatsky, Wittig, entre outras, sendo a metodologia de Pechmann a mais usual dentre elas. (BENJARAN et al., 2009).

Além de todas suas aplicações e suas possíveis utilizações em patologias as cumarinas também podem ser utilizadas como materiais de partida nas reações



multicomponentes para a formação de moléculas mais complexas, derivados cumaríneos, que também podem vir a apresentar atividades biológicas importantes (KENCHAPPA et al., 2013).

Para a determinação das atividades biológicas mais especificamente o potencial toxicológico dos compostos naturais e sintéticos, vários testes podem ser utilizados, porém o mais usual é o teste de toxicidade com *Artemia salina* (TAS) (AMARATE et al., 2011; COSTA et al., 2009; DOLABELA, 1997).

Este que é um ensaio biológico preliminar de toxicidade onde seus resultados apresentam uma boa correlação com a atividade citotóxica contra tumores humanos, atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, antibacteriana, antifúngica etc. Em geral, derivados com alta toxicidade contra a *A. salina* sugerem alto potencial para atividades biológicas, sendo, portanto, muito útil a utilização deste bioensaio na busca de substâncias bioativas (AMARATE et al., 2011; COSTA et al., 2009; DOLABELA, 1997).

Dentre os métodos descritos na literatura para a avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica o teste de difusão em ágar e o teste de microdiluição e microdiluição são os mais utilizados (BRANSON, 2000; OSTROSKY et al., 2008).

Em ensaios de diluição são testados a capacidade que uma amostra possui em inibir o crescimento do microorganismos contendo diversas diluições da concentração da amostra em contato com as bactérias ou fungos (BRANSON, 2000; OSTROSKY et al., 2008).

Dado a importância dos derivados cumarínicos devido a suas potenciais atividades o presente estudo tem como intuito a avaliação toxicológica dos derivados obtidos frente à *A. salina* e avaliação da concentração mínima inibitória (CMI), frente a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Material e Métodos

METODOLOGIA DO TESTE DE ARTEMIA

O teste de *A. Salina* se deu a partir da preparação de uma solução salina com concentração de 36,5 g/L e pH entre 8,4 – 8,8, tornando a solução ideal para que as larvas de *Artemia salina* sobrevivam (MEYER et al., 1982).



Posteriormente ao preparo da solução colocou-se os ovos de *Artemia salina* em um recipiente com incidência de luz e oxigênio por 48 convertendo os ovos em larvas do tipo náuplio (MEYER et al., 1982).

Paralelo a este procedimento prepaou-se as soluções a serem analisadas com três concentrações, 50, 25 e 12,5mg/ml. Foram utilizados uma mistura de Tween 80 e DMSO não excedendo 5% do volume nas amostras que precipitaram quando em contato com a solução salina (MEYER et al., 1982).

Colocou-se nos frascos-testes a solução e as larvas (10 em cada tubo), 3 frascos de controle foram deixados na presença de luz visível em repouso à temperatura ambiente por 24 horas (MEYER et al., 1982).

Após 24 h em contato com a amostra realizou-se a contagem do número de larvas mortas e vivas em cada frasco. Os dados obtidos foram processados em um programa computacional PROBIT, onde analisou-se os dados estatístico para a determinação dos valores de DL₅₀ (MEYER et al., 1982).

METODOLOGIA DO CMI

Realizou-se a análise do CMI em triplicatas através do método de microdiluição em placas de Elisa de fundo chato. Inicialmente preparou-se as soluções estoques dos compostos onde 80 mg do composto foram diluídas em 1,0 ml de DMSO. Após o preparo das soluções estoque preparou-se o caldo BHI e as diluições das amostras obtendo as concentrações de 2000µg/mL, 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL, 62,5µg/mL de cada composto.

As diluições do antibiótico (cloranfenicol) foram preparadas de acordo com o CLSI. A solução estoque do antibiótico foi preparada com 51,2 mg de cloranfenicol, o qual foi diluído em 10 mL de etanol P.A. Para o preparo do inóculo semeou-se a cepa *S. aureus* em placa contendo o meio ágar Mueller Hinton onde a mesma foi mantida em estufa à 35°C durante 24h. Após as 24 horas transferiu-se 3 colônias puras e isoladas para um tubo contendo 5 mL de solução fisiológica a 0,9% ate que fosse obtido uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala de Mac Farland (10⁸ UFC/mL). A solução foi então diluída para a concentração de 1:10 em solução fisiológica (0,5 mL da suspensão da bactéria em 4,5 mL de solução fisiológica), obtendo uma concentração de células de 10⁷ UFC/mL.

O preparo da microplaca foi realizado adicionando 100µL de cada concentração do composto da linha A até a linha F. Em seguida á esses poços foram adicionados 100µL do meio (caldo BHI) e nos poços com números impar adicionou-se 5 µL do inóculo.O controle de viabilidade (controle negativo) foi disposto na coluna 10 adicionando 100µL do meio com o inóculo, sem os compostos. Na coluna 11 foram adicionados 100µL de DMSO à 10% e 100µL do meio.

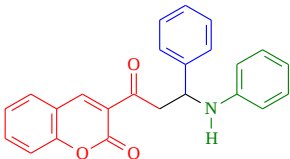
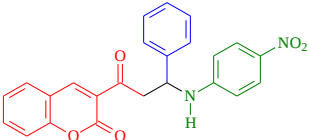
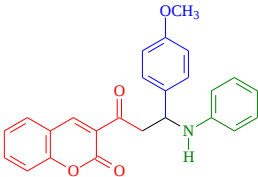
As microplacas foram tampadas e mantidas em estufa à 35°C por 22 horas. Após estas 22 horas de incubação as placas foram analisadas observando a formação ou nao de um precipitado branco, caso este fosse formado indicou-se que naquela concentração a amostra em análise não conseguiu inibir o crescimento da bactéria.

Resultados e Discussão

Resultado TAS

Através do teste de *Artemia salina* é possível analisar a toxicidade dos compostos e determinar quais as possíveis atividades biológicas através de valores de DL 50 de cada composto sendo possível assim comparar os resultados obtidos com valores descritos na literatura (Tabela 1).

Tabela 1: Teste de *Artemia salina*

Código	Produto	DL50 (Mg/mL)	Correlação da Atividade biológica*
M01		40,04	Tripanomissida e antitumoral
M02		57,84	Tripanomissida e antitumoral
M11		51,83	Tripanomissida e antitumoral

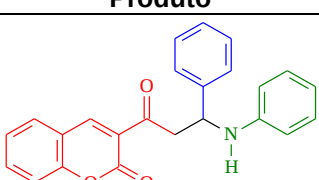
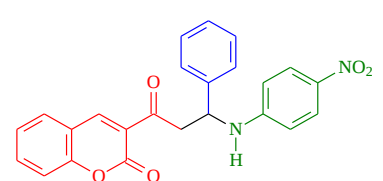
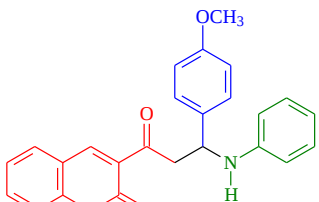
*(DOLLABELLA, 1997)

Após a realização do teste pode-se observar que os derivados analisados apresentaram DL_{50} menor que 200 Mg/mL, apresentando assim uma toxicidade elevada frente a *Artemia salina*. Segundo DOLABELA (1997) os valores de DL_{50} apresentados indica potenciais biológicos a apresentarem atividade tripanomissida e atividade antitumoral.

Resultados CMI

A microdiluição é um teste quantitativo que permite avaliar qual a mínima concentração necessária de um composto para que aproximadamente 50% das colônias tenham seu crescimento impedido, a avaliação de resultados são feitas em duas etapas, a primeira e através da observação da formação de um precipitado branco no fundo do poço, este que indica se a inibição foi o suficiente para o crescimento da bactéria em questão. Quando ele não é formado se inicia a segunda etapa, esta que determina se o composto é bactericida ou bacteriostático através do teste de CMB.

Tabela 2. Cálculo concentração mínima inibitória CMI 50% frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213:

Código	Produto	CMI 50%
M01		1000 µg/mL
M02		2000 µg/mL
M11		1000 µg/mL

*obs: O ponto de corte do CMI foi feito em triplicata.



Os produtos M1 e M11 apresentaram valores de concentração mínima inibitória (CMI₅₀) igual a 1000 µg/mL já o produto M02 apresentou valores de CMI₅₀ igual a 2000 µg/mL para a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Considerações Finais

Até o presente momento foi possível observar a partir da toxicidade frente a *Artemia salina* e dos cálculos de DL₅₀ que os três compostos analisados obtiveram valores menores que 200mg/mL o que sugere que os derivados cumaríneos testados podem apresentar potenciais atividade tripanomissida e antitumoral.

Foi possível observar também que os três compostos apresentaram concentrações de CMI₅₀ dentro das concentrações testadas, o que indica que eles podem ter ação bactericida ou bacteriostática, esta que será confirmada através da realização do teste de CMB.

Agradecimentos

UEG, BOLSA BIP e PRÓ-PROJETO PESQUISA EDITAL 010/2016.

Referências

BENJARAN, M. R.; BONINGARI, T.; MEGHSHYAM, K. P. One-Pot Synthesis os Substituted Coumarins Catalyzed by Silica Gel Supported sulfuric Acid Under Solvent-Free Conditions. **The open Catalysis Journal**, v. 8, n.2 p.33-39, 2009.

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

KENCHAPPA,R; BODKE.D,Y; PEETHAMBAR,S.K; TELKAR,S; BHOVI,K,V; Synthesis of β-amino carbonyl derivatesof coumarin and benzofuran and evaluation of their biological activity, **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n.10, p.4787-4797, 2013.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., McLAUGHLIN, J, L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982

dos SANTOS, W. H.; SIQUEIRA, M. S.; da SILVA, L. C. Síntese de derivados 4-aril-3,4-di-hidrocumarínicos catalisada por NbCl₅. **Química Nova**, v. 36, n.9, p. 1303-1307, 2013.