



Avaliação do Potencial Tóxico da O-carboximetilquitosana Guanilada em *Artemia salina*

Elisa Guimarães Barbosa Carvalho^{1*}(PG), Roberta Signini¹(PQ), Plínio Lázaro Faleiro Naves¹(PQ); Maísa Borges Costa¹(PQ)

¹Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo – Universidade Estadual de Goiás (CCET/UEG)

*elisaans@gmail.com

Resumo: Os polímeros naturais apresentam uma vasta aplicabilidade devido a sua fácil obtenção e suas propriedades tais como biodegradabilidade e biocompatibilidade. Nesta classe de polímeros os polissacarídeos naturais se mostram potencialmente favoráveis no desenvolvimento de moléculas bioativas, com destaque para a quitosana, matéria prima encontrada nos exoesqueletos de insetos, crustáceos e também na parede celular de alguns cogumelos. Esse composto carrega o fator da hidrossolubilidade, condição as quais enzimas fisiológicas exercem sua atividade. A O-carboximetilquitosana guanilada (O-CMQG), um derivado da quitosana, possui uma maior faixa de solubilidade e propriedades físicas aperfeiçoadas devido a sua modificação estrutural. Este trabalho apresentará uma proposta de avaliar o potencial tóxico da O-CMQG em *Artemia salina*. Este teste é uma ferramenta empregada na avaliação preliminar de toxicidade de compostos, por possuir uma alta sensibilidade, baixo custo, rapidez, fácil manuseio e principalmente por permitir boas correlações de citotoxicidade, faz com que este ensaio seja bastante utilizado.

Palavras-chave: Quitosana. O-carboximetilquitosana guanilada. *Artemia salina*.

Introdução

A quitosana é um derivado da quitina natural obtida através da desacetilação do N-acetil unidades de glucosamina de quitina, muito comum, por hidrólise sob condições alcalinas a uma temperatura elevada (RIVA et al., 2011).

As aplicações da quitosana e derivados vão desde a produção de materiais cerâmicos (LAMAS, 2008) à obtenção de fibras, filmes, géis, microesferas e membranas, além da capacidade da quitosana de formar complexos com íons metálicos (JANEGITZ, 2007) e em fármacos, sendo estes limitados por questões de



hidrossolubilidade, condição as quais as enzimas fisiológicas exercem sua atividade (SILVA et al., 2006).

Com o objetivo de melhorar a solubilidade de tal polímero, tem-se focado bastante em modificações estruturais através de diversas reações para a produção de quitosanas funcionalizadas. Dentre elas destacam-se a síntese da carboximetilquitosana (LAMAS, 2008) e as reações de guanilação das quitosanas (ANDRADE, 2016). A carboximetilquitosana é obtida através da reação de carboximetilação da quitosana, essa vem ganhando cada vez mais espaço por suas características importantes na área biomédica como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxidade, baixa imunogenicidade, atividade antimicrobiana e ainda a capacidade de formar géis e solubilidade em amplo intervalo de acidez, que ampliam as possibilidades de aplicação (DARÓZ et al., 2008).

A O-carboximetilquitosana guanilada (CMQG) é obtida via reações de guanilação da carboximetilquitosana, esta apresenta uma maior faixa de solubilidade em relação à quitosana, podendo assim melhorar as condições da avaliação do seu potencial biológico/farmacológico.

Os procedimentos adotados para avaliação da bioatividade de compostos orgânicos, oriundos tanto de plantas quanto de origem sintética devem ser de fácil execução, assim como fornecer respostas rápidas e eficazes (CAVALCANTE et al., 2000). Os ensaios empregados a partir do teste de letalidade frente à *Artemia salina* (TAS) apresentam-se como uma ferramenta viável, devido sua simplicidade, eficiência, rapidez, baixo custo e principalmente por permitir boas correlações de citotoxicidade dentre outras propriedades biológicas (MONTANHER et al., 2003).

Material e Métodos

Para a realização do ensaio frente à *A. salina*, inicialmente as amostras de O-CMQG foram solubilizadas em uma solução aquosa de HCl 1%, e em seguida em uma solução marinha artificial preparada na dissolução do sal marinho em água destilada (40 g.L^{-1}), suplementado com extrato de leveduras (6 mg.L^{-1}) e esterilizado em autoclave.



Em um funil de separação foram adicionados 500 mL de água marinha e 80 mg dos cistos de *A. salina*. Para o crescimento de seus náuplios, o sistema foi deixado em incubação por 36 horas a temperatura ambiente, com iluminação natural e oxigenação constante realizada com auxílio de uma bomba de ar de aquário.

O ensaio foi realizado em microplaca de poliestireno estéril de 96 poços. Os náuplios foram distribuídos na placa com o auxílio de uma micropipeta, com padronização de um total de 10 ± 1 de indivíduos em cada poço. Em seguida, foram adicionadas 100 μL de amostras nas concentrações de 6,25; 10; 15; 25; 50; 100 e 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. O sistema foi incubado por um período de 24 horas. Após este período, contou-se a quantidade de larvas mortas ou imobilizadas. Como controle negativo, usou-se água salina e 10 náuplios de *A. salina*, no controle de viabilidade (água marinha e os náuplios) e controle positivo foram usadas soluções de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ nas concentrações de 7,25; 15; 30; 45; e 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, mais os náuplios de *A. salina*.

O ensaio foi realizado em duplicata, o que permitiu determinar a toxicidade a partir do cálculo da CL_{50} , ou concentração letal de 50% da população de microcrustáceo. Este valor foi determinado através do programa StatSoft Statistica 8 MR-3, a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração da amostra-teste.

Resultados e Discussão

Ensaio de letalidade com *Artemia salina* definem valores da dose letal média (DL_{50}) em $\mu\text{g}/\text{mL}$ de compostos sintéticos ou extratos, sendo que dezenas de substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade ao realizar este teste (MEYER et al., 1982). A atividade é considerada significativa quando a estimativa do valor da DL_{50} é menor que 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (STEFANELLO et al., 2006).

A atividade biológica preliminar dos extratos em TAS é classificada conforme os seguintes critérios baseados nos níveis de CL_{50} em *Artemia salina*: $\text{CL}_{50} < 80 \mu\text{g}/\text{mL}$, altamente tóxicos; entre 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, moderadamente tóxico; e $\text{CL}_{50} > 250 \mu\text{g}/\text{mL}$, com baixa toxicidade ou não tóxico (DOLABELLA et al., 1997).

A partir dos dados obtidos pelo ensaio, observa-se que a O-carboximetilquitosana guanilada apresenta uma CL_{50} de 82,5 ppm, nota-se que é



menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$, podendo assim considerar que esta possui atividade biológica. Com um CL_{50} entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, este composto apresenta uma toxicidade moderada.

Considerações Finais

O ensaio de letalidade da *O*-carboximetilquitosana guanilada com *Artemia salina* mostrou-se que este composto pode possuir atividade biológica e uma toxicidade moderada. Entretanto, será necessário estudo mais aprofundado sobre as condições para determinação do potencial tóxico de derivados quitosânicos, bem como o aperfeiçoamento da técnica para análises desses polímeros.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES pela bolsa fornecida, a Universidade Estadual de Goiás por todo o suporte fornecido e ao grupo de pesquisa Labsimco e ao programa de concessão de bolsas ao pesquisador (PROBIP/2016).

Referências

ANDRADE, C. C.; **Síntese e avaliação Biológica de Quitosanas N-guaniladas**. UEG, 2016, 134f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO.

CAVALCANTE, M. F., OLIVEIRA, M. C. C. DE., VELANDIA, J. R., "Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach". **Química Nova**, V. 23, p. 20, 2000.

DAROZ, L. R.; LOPES, J. B.; DALLAN, L. A. O.; CAMPANA FILHO, S.F.; MORREIRA, L. F. P.; STOLF, N. A. G. Prevenção de aderência pericárdicas pós-operatórias com uso de carboximetilquitosana termoestéril. **Revista Brasileira de cirurgia Cardiovascular**, V. 23, n. 4, p. 480-487, 2008.

DOLABELA, M. F.; **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-Tripanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. UFMG, 1997, 128f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.



JANEGITZ, B. C.; MARCOLINO, L. H. J.; FATIBELLO, O. F. **Determinação voltamétrica por redissolução anódica de cu(II) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana.** Química nova, São Carlos – SP. V. 30, 1673-1676, 2007.

LAMAS, J. C.; **Carboximetilquitosanas: Preparação, caracterização e aplicação como agentes de estabilização de suspensões aquosas de alumina.** USP, 2008; 103f.; Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.

MONTANHER, A B. P., PIZZOLATTI, M. G., BRIGHENTE, I. M. C. Monitoramento dos Extratos Brutos de Espécies de *Polygala* (Polygalaceae) utilizando *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, V. 13, n. 1, p. 66-68, 2003.

RIVA, R.; RAGELLE, H; RIEUX, A., DUHEM, N.; JÉRÔME, C.; PRÉAT, V. **Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering.** Bruxelas-bélgica, n 12, agosto, p.19-44, 2011.

SILVA, H. S. R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E. I. **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços.** Química nova, São Paulo-SP., V. 29, p. 776-785, 2006 .

STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; MACARI, P. A. T.; Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha ssp floccosa*; **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. V. 16, p. 525 - 530, 2006.