



Avaliação da toxicidade de quitosana e derivados guanilados pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*

Amanda dos Reis Correia¹(PQ)*, Elisa Guimarães Barbosa Carvalho²(PQ), Máisa Borges Costa³(PQ), Roberta Signini³(PQ), Plínio Lázaro Faleiro Naves³ (PQ)
***amanda.dosreiscorreia@gmail.com**

¹ Universidade Federal de Goiás, R. 235, s/n - Setor Leste Universitário, Goiânia - GO

² Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, Rod. Washington Luiz, s/n - Monjolinho, São Carlos - SP

³ Universidade Estadual de Goiás, BR-153, 3105 Fazenda Barreiro do Meio, Campus Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis – GO.

Resumo: A quitosana é um polissacarídeo que pode ser obtido através do processo de desacetilação da quitina. Características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade dentre outras, permite múltiplas aplicações em diversas áreas. A baixa solubilidade da quitosana em condições fisiológicas limita seu uso principalmente na área da saúde. A derivação da quitosana é uma das estratégias utilizadas para melhorar aspectos limitantes como a solubilidade e outras características físico-químicas e biológicas, além de conferir novas propriedades do grupo apresentado, ampliando assim o potencial de utilização do composto original. Neste estudo a quitosana foi modificada com grupos guanidínicos dando origem às quitosanas *N,N*-guaniladas. Em seguida foi realizada a triagem das atividades biológicas com o ensaio de letalidade de *Artemia salina* e determinação da toxicidade com o cálculo da letalidade a 50% dos compostos. Os resultados demonstraram que a quitosana e os derivados guanilados apresentaram baixa toxicidade. A quitosana-guanilada 3d obteve menor valor de CL₅₀ enquanto que a quitosana-guanilada 3a obteve maior valor CL₅₀. Todas as quitosanas-guaniladas estão em ressonância eletrônica, no entanto ao que parece as quitosanas-guaniladas que possuem maior força na ressonância eletrônica apresentaram menor toxicidade, e as quitosanas-guaniladas que podem estar sofrendo reação de hidrólise apresentaram maior toxicidade.

Palavras-chave: Guanilação. Guanidinilação. Compostos quitosânico-guanilados. Triagem. Atividade biológica. Estrutura atividade.



Introdução

Os polímeros naturais apresentam aplicabilidade em diversas linhas de pesquisa, sendo uma delas o uso na síntese de fármacos devido a sua fácil obtenção e suas propriedades, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade, flexibilidade, renovabilidade e possibilidade de inclusão de sítios reativos para agregar novas funcionalidades (AZEVEDO et al., 2007). Dentre esses polissacarídeos destacam-se a quitina e a quitosana (AZEVEDO et al., 2007; BILAL, IQBAL, 2019).

A quitina é um polissacarídeo encontrado na natureza, principalmente em exoesqueletos de crustáceos, insetos e paredes celulares de fungos, (PATRUELA et al., 2015; PIRES, BIERHALZ, MORAES, 2015) porém, em menor abundância que a celulose (ABREU et al., 2013). A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina, e conserva algumas de suas características, como a biocompatibilidade e atoxicidade (ÁVILA FILHO et al., 2020; BARROS et al., 2016; SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2006). No entanto, a quitosana apresenta uma melhor faixa de solubilidade em relação à quitina, uma vez que em meio ácido, a quitosana é protonada, pela presença dos grupos aminos livres da cadeia polimérica, o que a torna solúvel em pH ácido (VINSOVA, VAVRIKOVA, 2011).

No intuito de melhorar as limitações apresentadas por sua solubilidade, é conveniente realizar modificações químicas de forma que a quitosana possa conservar ou potencializar suas propriedades existentes e ampliar a sua faixa de solubilidade (ZHAO-SHENG et al., 2012). Dentre as modificações possíveis destacam-se as reações de sulfatação, carboxialquilação, quaternização, de guanilação e guanidinilação (ROBERTS, 1992).



Na tentativa de melhorar a solubilidade das quitosanas, a funcionalização com grupos biguanidínicos foi empregada por meio de reações de guanilação. Esta funcionalização favoreceu o aumento de sua solubilidade em meio aquoso, além de influenciar no seu potencial bactericida (HU et al., 2007; CAI et al., 2013).

A *Artemia salina* é um microcrustáceo muito utilizado em ensaios de toxicidade para avaliar compostos naturais ou sintéticos biologicamente ativos devido a sua fácil manutenção em condições de laboratório (SIQUEIRA et al., 1998; RAHMAM, CHOUDHARY, THOMSON, 2005; APETROAEI et al., 2018). Para realização do teste de toxicidade é necessário expor os náuplios a concentrações crescentes dos compostos testes por um período de 24 a 48 horas, e em seguida realizar a contagem do número de indivíduos mortos ao final do período de exposição e o cálculo da concentração letal média da população exposta (PIMENTEL et al., 2011). Nesse contexto, o trabalho objetivou avaliar a toxicidade da quitosana e de quitosanas *N,N*- guaniladas pelo ensaio de letalidade em *Artemia salina*.

Material e Métodos

A quitosana foi adquirida da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) (Lote #SLBF5331V-% GA de 25% e massa molar viscosimétrica de $155000 \text{ g.mol}^{-1}$). Os derivados quitosânico-guanilados foram sintetizados por Andrade (2016) no Laboratório de Síntese, Isolamento e Modificação de Compostos Orgânicos - LaBSIMCO/UEG campus central Anápolis.

A toxicidade dos compostos foi determinada com o ensaio de letalidade de *Artemia salina* seguindo a metodologia descrita por Molina-Salinas e Said-Fernandez (2006) com pequenas modificações. Foi preparado água marinha artificial (AMA) através da dissolução de 36 g.L^{-1} de sal marinho em água destilada,



suplementado com 6 mg.L^{-1} de extrato de levedura e esterilizado em autoclave. Foram pesados 0,3 g de cistos de *Artemia salina*, colocou no artemilheiro por 36 horas em 500 mL do meio AMA a temperatura ambiente, oxigenação e iluminação constantes. Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz, pipetados e transferidos para uma placa de Petri com 5 mL de meio fresco.

O teste foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 10 indivíduos com 100 μL de AMA e 100 μL de compostos dissolvidos no mesmo meio nas concentrações de 2,5, 1,25, 0,625 e 0,3125 mg.mL^{-1} . A placa foi incubada a temperatura ambiente e iluminação constante por 24 horas.

Foram adicionados ao ensaio controles de viabilidade com poços sem compostos, de letalidade utilizando diluições de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e controle de técnica utilizando ácido acético 1% (CH_3COOH) neutralizado com carbonato de sódio a 1 Mol.L^{-1} (Na_2CO_3) em pH 6,0 - 5,5 nas concentrações 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625% para excluir possíveis interferências na acidificação necessária para a dissolução dos compostos testados.

Os resultados permitiram o cálculo da CL_{50} pelo método gráfico para dose resposta – Próbito, no programa *Statistica*. Todos os ensaios realizados foram realizados em triplicata e de maneira independente.

Resultados e Discussão

Os resultados do teste de letalidade da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados sobre *Artemia salina* são apresentados na Tabela 1.



Tabela 1 - Concentração Letal (CL_{50}) da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados para *Artemia salina*.

Compostos testados	CL_{50} (mg.mL ⁻¹)	95% CL
Quitosana	1,26	1,12 - 1,41
Quito-Guani 3a	1,47	1,25 - 1,69
Quito-Guani3b	1,33	1,24 - 1,41
Quito-Guani 3c	1,33	1,24 - 1,42
Quito-Guani 3d	1,05	0,74 - 1,35
Quito-Guani 3e	1,31	1,25 - 1,36

Fonte: Os autores.

Legenda:

Quito-Guani = quitosana guanilada;

Quito-Guani 3a = (Z)-N-((Ciclohexil amina)-(quitosana)-metileno)-benzamida;

Quito-Guani 3b = (Z)-1,2-Diciclohexil-3-(quitosana)-guanidina;

Quito-Guani 3c = (Z)-N((benzilamina)-(4-metoxifenil))-(quitosana) 4-carboxamidina;

Quito-Guani 3d = (Z)-Etil-(4-metoxifenilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato;

Quito-Guani 3e = (Z)-Etil-(ciclohexilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato.

A quitosana apresentou CL_{50} de 1,26 mg.mL⁻¹ para *A. salina*. Em trabalho realizado por Pereira et al.,(2019) observou-se que a quitosana foi atóxica para *A. salina* com percentual de mortalidade menor que 10% em concentrações ≤ 1 mg.mL⁻¹.

O derivado da quitosana mais tóxico foi a quito-guani 3d que apresentou CL_{50} 1,05 mg.mL⁻¹, e possui em sua estrutura dois substituintes retiradores de elétrons. Já a quito-guani 3a foi o derivado que apresentou menor toxicidade, e também possui em sua estrutura dois substituintes retiradores de elétrons.

Os substituintes dos derivados guanilados 3a e 3d estão em ressonância eletrônica em R₁ e R₂, porém, o substituinte R₂ da quito-guani 3a apresenta uma estrutura de cadeia fechada indicando que os elétrons estão mais envolvidos com a ressonância eletrônica e dessa forma acabam tendo menor possibilidade de



interação com outros meios e com os náuplios. Já a quito-guani 3d possui uma cadeia aberta no substituinte R_1 indicando uma menor ressonância e maior disponibilidade de interação dos elétrons com os náuplios, além disso, o substituinte R_1 do derivado guanilado 3d pode estar sofrendo uma reação de hidrólise, sendo esta outra possibilidade para justificar a toxicidade da quitosana-guanilada 3d.

As quitosanas-guaniladas 3d e 3e possuem substituintes retiradores de elétrons iguais em R_1 . Estes substituintes possuem cadeia aberta, menor ressonância e maior disponibilidade de interação com o meio quando comparado aos outros derivados quitosânico-guanilados e também podem estar sofrendo a reação de hidrólise. Além disso, foram os compostos que obtiveram menores valores de CL_{50} , sendo o composto quito-guani 3d CL_{50} de $1,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o composto quito-guani 3e CL_{50} de $1,31 \text{ mg.mL}^{-1}$.

As quito-guanis 3b e 3c possuem substituintes distintos, tendo a quito-guani 3b substituintes doadores de elétrons em R_1 e R_2 e a quito-guani 3c substituintes retiradores de elétrons em R_1 e R_2 , no entanto ambos apresentaram o mesmo valor de CL_{50} $1,33 \text{ mg.mL}^{-1}$. A partir dos resultados obtidos podemos inferir que os grupos retiradores e doadores de elétrons não explicam as diferenças de resultados obtidos neste ensaio.

Os controles de viabilidade e de técnica apresentaram resultados esperados (ausência de mortalidade espontânea) e o controle com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) obteve valores referentes ao controle interno do laboratório com CL_{50} de $0,03456 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Considerações Finais

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que tanto a quitosana quanto derivados quitosânico-guanilados não apresentaram toxicidade considerável



contra *A. salina* e nem melhora significativa nas suas características de solubilidade em pH fisiológico em relação à quitosana. Embora todos os compostos estejam em ressonância eletrônica, foi possível observar que quanto mais forte é a ressonância nos substituintes, menor é a toxicidade dos compostos. Além disso, é possível que o processo de hidrólise nos substituintes R_1 das quitosanas-guaniladas 3d e 3e possa estar influenciando a toxicidade desses compostos quando comparada aos outros derivados quitosânico-guanilados. Por último, o resultado da CL_{50} das quitosanas-guaniladas 3b e 3c pode estar relacionado aos diferentes tipos de substituintes que as compõem, uma vez que possuem substituintes distintos e obtiveram o mesmo valor de CL_{50} .

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de recursos para o Projeto de pesquisa “ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS QUITOSÂNICO-GUANILADOS” Edital Universal nº 01/2016. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Pós-graduação para a primeira autora.

Referências

ABREU, F. O. M. S.; CAVALCANTE, L. G.; DOUDEMONT, P. V.; CASTRO, A. M.; NASCIMENTO, A. P. D.; MATOS, J. E. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros**, v. 23, n. 05, p. 630-635, 2013.



ANDRADE, C. C. **Síntese e avaliação biológica de quitosanas n-guaniladas.** Dissertação (Mestrado Em Ciências Moleculares), Universidade Estadual De Goiás - Ueg, 2016.

APETROAEI, M. R.; PĂDUREȚU, C.; RĂU, I.; SCHRODER, V. New-chitosan characterization and its bioassay in different salinity solutions using *Artemia Salina* as bio tester. **Chemical Papers**, v. 72, p.1853-1860, 2018.

ÁVILA FILHO, S. H.; FERREIRA, P. G. C.; FARES, N. B.; SILVA, L. A. F. Propriedades físico-químicas, atividades biológicas e resultados obtidos após utilização médica da quitosana e seus derivados. **Brazilian Journal Of Development**, v. 6, n. 12, p.95250-95270, 2020.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F.; Quitina e Quitosana: propriedades químicas e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 03, p. 27-34, 2007.

BARROS, A. P. H.; MORANTES, M. T. A.; HOYOS, M. I. C.; OSPINO, L. J. M. Preparación de nanopartículas de quitosano modificadas con alginato de sodio con potencial para la liberación controlada de medicamentos. **Revista Eia**, v. 12, n. 02, p. 75-83, 2016.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 462-482, 2019.

CAI, Z. S.; SUN, Y. M.; ZHU, X. M.; ZHAO, L. L.; YUE, G. Y. Preparation and characterization of ortho-biguanidiny l benzoyl chitosan hydrochloride and its antibacterial activities. **Polymer Bulletin**, v. 70, p. 1085-1096, 2013.

HU, Y.; DU, Y.; YANG, J.; KENNEDY, J. F.; WANG, X.; WANG, L. Synthesis, characterization and antibacterial activity of guanidinylated chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 01, p.66-72, 2007.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia Salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633-638, 2006.

PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417- 246, 2015.

PEREIRA, L. A.; DA SILVA REIS, L.; BATISTA, F. A.; MENDES, A. N.; OSAJIMA, J. A.; SILVA-FILHO, E. C. Biological properties of chitosan derivatives associated with the ceftazidime drug. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 115002, 2019.

PIMENTEL, M. P.; SILVA JÚNIOR, F. C. G.; SANTAELLA, S. T.; LOTUFO, L. V. C. O uso de *Artemia Sp.* como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. **Journal Of The Brazilian Society Of Ecotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2011.



PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957, 2015.

RAHMAN, A.-; CHOUDHARY, M. I.; THOMSON, W. J. **Bioassay techniques for drug development**. Singapore: Taylor & Francis E-Library, 240, 2005.

Roberts, G.A.F. **Chitin Chemistry**. London: Macmillan, 1992.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SIQUEIRA, J. M. DE.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis Lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia Salina Leach*. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities-a review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 32, p. 3596-3607, 2011.

ZHAO-SHENG, C.; YUE-MING, S.; CHUN-SHENG, Y.; XUE-MEI, Z. Preparation, characterization, and antibacterial activities of para-biguanidinyll benzoyl chitosan hydrochloride. **Journal Of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 2, p. 1146-1151, 2012.

REALIZAÇÃO

PRG
Pró-Reitoria de
Graduação

PRP
Pró-Reitoria de
Pesquisa e
Pós-Graduação

PRE
Pró-Reitoria de
Extensão e
Assuntos Estudantis



**Universidade
Estadual de Goiás**