

DQ - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Avaliação do potencial tóxico de novos compostos e
de compostos de interesse ambiental através do
ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina***

*Mariana Gava Milani¹
Roberta Lourenço Ziolli²*



¹ Aluno de Graduação do curso de Engenharia Química da PUC-Rio.

² Bacharel em Química, DSc., Professora do Departamento de Química da PUC-Rio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS	4
3. RESULTADOS	5
4. CONCLUSÃO	8
AGRADECIMENTOS	8
REFERÊNCIAS	8

1. INTRODUÇÃO

Artemia salina é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo, estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70 ‰.

Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a baixas temperaturas (IPIMAR). Quando re-hidratados os ovos de *Artemia salina* eclodem em cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Esse ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica.

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra (2 – 20 mg). A simplicidade desse teste, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório (Siqueira et al., 1998).

McLaughlin e al. (1998) relatam que esse ensaio tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos e levou à descoberta dos *Annonaceous acetogenins* como nova classe de agentes antitumorais ativos. Os mesmos autores observaram que os valores de ED₅₀ encontrados para citotoxicidade, em geral eram 1/10 dos valores de LC₅₀ encontrados nos testes realizados com *Artemia salina*, sugerindo que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos.

Nesse trabalho utilizamos *Artemia salina* para verificar o potencial citotóxico de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe(III).

As tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na Química Medicinal e, especificamente, na Química Medicinal Inorgânica, em razão de sua capacidade quelante e do papel da coordenação no seu mecanismo de ação. As tiossemicarbazonas são hoje a segunda classe mais importante de compostos antitumorais depois dos derivados do *cis*-diaminodicloroplatina(II), o cisplatina (Beraldo et al., 2004). Tiossemicarbazonas derivadas de 2-formil, 2-acetil e 2-benzoilpiridina e seus complexos de cobre(II) possuem atividade *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais humanas. No entanto, por tratar-se de compostos insolúveis em água, essas tiossemicarbazonas e seus complexos são menos promissores para testes *in vivo* (West et al., 1999). Com o objetivo de melhorar a solubilidade em água, sintetizamos tiossemicarbazonas derivadas de 2-piridinoformamida (H₂Am₄R, Figura 1), nas quais um grupo amino substitui um alquil ou aril em C(7), e seus

complexos de Fe(III), a partir de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Os complexos obtidos são octaédricos, solúveis em água, do tipo $[\text{Fe}(\text{2Am4DH})_2]\text{Cl}$ (**1**), $[\text{Fe}(\text{2Am4Me})_2]\text{Cl}$ (**2**) e $[\text{Fe}(\text{2Am4Et})_2]\text{Cl}$ (**3**) (Figura 2).

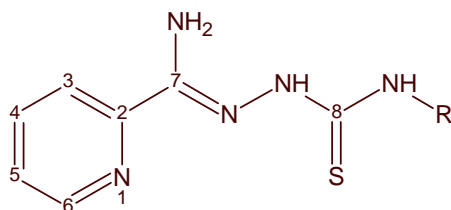


Figura 1 - Estrutura de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas. R=H (H2Am4DH), R=CH₃ (H2Am4Me) ou R = CH₃CH₂ (H2Am4Et)

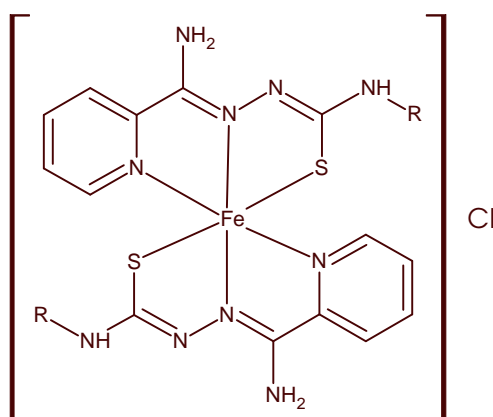


Figura 2 - Estrutura dos complexos de Fe(III) de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas (R=H, CH₃ ou CH₃CH₂)

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para os ensaios de toxicidade utilizando *Artemia salina* foi baseada em Meyer et al.(1982), em Nascimento et al. (1999) e nas normas da CETESB-SP (1991).

Incubação

Em um recipiente retangular de 13,0 x 8,0 x 7,0 cm, com uma divisória contendo furos de aproximadamente 0,02 cm de espessura espaçados por 0,5 cm e distribuídos uniformemente, foram adicionados 350 mL de solução de sal marinho sintético (Tropic Marin). O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada fluorescente. Em um dos lados desse recipiente, adicionou-se cerca de 46 mg de cistos de *Artemia salina*, tomando-se o cuidado para que os mesmos não ultrapassassem a divisória. A parte do sistema contendo os cistos de *Artemia salina* foi coberto com papel alumínio, para que os organismos, ao nascerem, fossem atraídos pela luz do

outro lado do sistema, forçando-os a atravessar a divisória. Tal procedimento visa uma homogeneização das condições físicas dos organismos-teste. A incubação foi feita por um período de 48 horas. Durante todo o ensaio a temperatura foi monitorada.

Exposição

Após o período de incubação, os organismos-testes (náuplios de *Artemia*) foram expostos às drogas de interesse por 48 horas, utilizando-se tubos de ensaio graduados, cada um contendo 10 náuplios de *Artemia salina*, previamente selecionados. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração de cada composto. Além disso, cada droga foi testada, no mínimo, três vezes, totalizando um mínimo de 9 ensaios por concentração do composto.

Determinou-se a faixa de concentração a ser testada, buscando sempre a maior concentração em que se observasse 0% de mortalidade e a menor concentração em que se deflagrasse 100% de mortalidade. As demais concentrações foram distribuídas dentro desse limite (Veiga et al., 1989), de modo a obter a DL₅₀ (dose letal para 50% da população) do composto testado.

As soluções dos compostos a serem testadas foram preparadas em 1% de DMSO (dimetilsulfóxido) e avolumadas com solução salina. Os teste para o controle também foram realizados em triplicata, utilizando-se uma solução de DMSO 1% diluído em solução salina.

Os controles foram utilizados também para se ter certeza de que a mortalidade observada nos náuplios de *Artemia salina* fora resultante da toxicidade aos compostos e não devido à falta de alimentação (Carballo et al., 2002).

Contagem

Após 48 horas de exposição, foi feita a contagem de náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados próximos a uma fonte luminosa. Só foram considerados válidos os testes nos quais o controle apresentou uma mortalidade igual ou inferior a 10 % da população. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o PROBIT, o qual forneceu os valores de DL₅₀.

3. RESULTADOS

A Tabela 1 mostra, para as 2-piridinofarmamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III), os valores de DL₅₀ e os limites de confiança obtidos da média das triplicatas para cada ensaio de toxicidade, assim como, a média dos valores de DL₅₀, o desvio padrão, a covariância (%) obtidos em cada composto.

Observa-se que, em geral, não houve grandes variações nos valores de DL₅₀ entre as replicatas de um mesmo composto. Os coeficientes de variação entre as replicatas variaram entre 6,40 e 20,16%.

Sabe-se pela literatura que os resultados dos testes de toxicidade variam consideravelmente. Em trabalho desenvolvido com *Lytechinus variegatus* (Nipper et al., 1993) foi encontrado um coeficiente de variação de 40,3% entre testes de toxicidade realizados com embriões. Outros autores relatam índices de variação em torno de 30%. Portanto, os índices de variação obtidos nesse trabalho são considerados aceitáveis, indicando que a metodologia utilizada forneceu dados que podem ser considerados repetitíveis.

Tabela 1 - DL₅₀ para as 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III)

Composto	DL ₅₀ (mg L ⁻¹)	Limite de confiança
H2Am4DH	8,93	4,76 < DL < 17,09
	6,92	5,73 < DL < 7,74
	5,60	3,46 < DL < 6,61
	5,60	3,42 < DL < 6,61
	7,35	4,14 < DL < 9,05
Média DL₅₀ ± DP	6,88 ± 1,39	
CV (%)	20,16 %	
H2Am4Me	5,01	3,66 < DL < 6,23
	6,59	5,96 < DL < 7,57
	4,70	3,61 < DL < 5,67
	5,55	4,08 < DL < 6,66
Média DL₅₀ ± DP	5,46 ± 0,83	
CV (%)	15,18 %	
H2Am4Et	7,88	6,49 < DL < 9,15
	7,13	6,03 < DL < 8,34
	6,37	5,10 < DL < 7,34
Média DL₅₀ ± DP	7,12 ± 0,76	
CV (%)	10,61 %	
[Fe(2Am4DH) ₂]Cl (1)	13,81	11,73 < DL < 21,62
	15,52	13,63 < DL < 18,02

	14,06	12,24 < DL < 16,41
Média DL₅₀ ± DP	14,46 ± 0,93	
CV (%)	6,40 %	
[Fe(2Am4Me) ₂]Cl (2)	6,71	4,89 < DL < 7,94
	7,70	6,40 < DL < 8,93
	7,09	5,62 < DL < 8,28
Média DL₅₀ ± DP	7,17 ± 0,50	
CV (%)	6,94 %	

DL₅₀ = dose letal para 50% da população, DP= desvio padrão, CV=covariância

A Tabela 2 resume os resultados mostrando o valor médio de DL₅₀ para os compostos estudados. Os ligantes H2Am4DH, H2Am4Me e H2Am4Et mostraram-se tóxicos nas concentrações de 6,88 mg L⁻¹; 5,46 mg L⁻¹ e 7,12 mg L⁻¹, respectivamente. Os complexos (1) e (2) apresentaram toxicidade nas concentrações de 14,46 mg L⁻¹ e 7,17 mg L⁻¹, respectivamente. O complexo (3) não apresentou toxicidade até a concentração de 48 mg L⁻¹.

Quanto menor o valor de DL₅₀, mais tóxico é o composto frente a um organismo-teste, e maior é sua atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral.

Tabela 2 - DL₅₀ (valor médio) para as 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e seus complexos de Fe(III)

Composto	DL ₅₀ (mg L ⁻¹)*
H2Am4DH	6,88
[Fe(2Am4DH) ₂]Cl (1)	14,46
H2Am4Me	5,46
[Fe(2Am4Me) ₂]Cl (2)	7,17
H2Am4Et	7,12
[Fe(2Am4Et) ₂]Cl (3)	> 48

DL₅₀ = dose letal para 50 % da população

*valor médio

Os compostos estudados, com exceção do complexo (3), apresentam significativa toxicidade aguda frente à *Artemia salina*, em baixas concentrações, quando comparados ao Lapachol que é a droga de referência (DL₅₀ = 68 mg L⁻¹) (Santos Pimenta et al.,2003). Os ligantes mostram menores valores de DL₅₀ que os complexos, sendo que, H2Am4Me é o mais ativo com DL₅₀ = 5,46 mg L⁻¹.

Pela complexação os valores de DL₅₀ aumentam, indicando menor citotoxicidade. Dentre os três complexos, [Fe(2Am4Me)₂]Cl (2) é o mais promissor (LD₅₀ = 7,17 mg L⁻¹).

Embora os ligantes tenham mostrado maior toxicidade que seus respectivos complexos de Fe(III), esses apresentam a vantagem de serem solúveis em água o que permitirá que essas drogas sejam testadas *in vivo* futuramente.

Como dito anteriormente, o complexo (3) foi o único que não apresentou toxicidade até a concentração de 48 mg L⁻¹. Uma possível explicação seria a presença de um grupo mais volumoso no nitrogênio terminal (ver Figuras 1 e 2) que poderia dificultar a penetração da droga na célula do organismo-teste.

4. CONCLUSÃO

Testes utilizando *Artemia salina* indicam que as 2-piridinoformamida tiosemicarbazonas e seus complexos de Fe(III) têm atividade citotóxica, sugerindo que poderiam igualmente apresentar ação antitumoral.

AGRADECIMENTO

Os autores deste trabalho gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PIBIC).

REFERÊNCIAS

- Beraldo H, Gambino D (2004). The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. *Mini-Reviews on Medicinal Chemistry* 4, 159.
- CETESB. São Paulo (1991). Água do Mar – Teste de Toxicidade Aguda com Artemia. Norma Técnica L5.021, São Paulo.
- Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávelalos MD (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* citotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2:17.
- Instituto de Investigação das Pescas e do Mar – Disponível em: http://ipimar-iniap.ipimar.pt/crips/estacao_piscicultura/artemia.html - Acesso em: 17 de maio de 2007.
- McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, *Drug Information Journal* 32: 513-524.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45, p.31-34.

- Nascimento IA, Araújo MMS (1999). Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 2(1): 41-47.
- Nipper MG, Proserpi VA, Zamboni NS (1993). Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 646-452.
- Santos Pimenta LPS, Pinto GB, Takahashi JA, Silva LGF, Boaventura MAD (2003). Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test), *Phytomedicine* 10, 209.
- Siqueira JM, Bomm MD, Pereira NFG, Garcez WS, Boaventura MAD (1998). Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Revista Química Nova* 21(5).
- Veiga LF, Vital NA, Portela MR, Oliveira FF (1989). Avaliação de faixa de sensibilidade de Artemia salina ao Lauril Sulfato de Sódio. Rio de Janeiro. PETROBRÁS/CENPES/SUPESQ/DITER, 64p. il. (Projeto 04.05.27).
- West DX, Swearingen JK, Valdés-Martinez J, Hernandez-Ortega S, El-Sawaf AK, van Meurs F, Castiñeiras A, Garcia I, Bermejo E (1999). Spectral and structural studies of iron(III), cobalt(II,III) and nickel(II) complexes of 2-pyridineformamide N(4)-methylthiosemicarbazone. *Polyhedron* 18, 2919.