



UNIVERSIDAD DEL BÍO- BÍO
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
ESCUELA DE PEDAGOGÍA EN CIENCIAS NATURALES

**ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA ESFINGOMIELINASA C CON
BASES DE SCHIFF DE GLUCOSAMINAS Y COMPLEJOS DE
GLUCOSAMINAS DE HIERRO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE PROFESOR DE
ENSEÑANZA MEDIA EN CIENCIAS NATURALES MENCIÓN QUÍMICA

**AUTORAS: FERRADA CONTRERAS, DANIELA PAZ
VILLAGRA HERNÁNDEZ, ESTRELLITA DEL PILAR**

Profesora guía: Caro Díaz, Claudia Andrea

CHILLÁN 2019



UNIVERSIDAD DEL BÍO- BÍO
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
PEDAGOGÍA EN CIENCIAS NATURALES

**“Estudio de la Inhibición de la Esfingomielinasa C con
bases de Schiff de glucosaminas y Complejos de
glucosaminas de hierro.”**

Proyecto para ser presentado a la Escuela de Pedagogía en Ciencias Naturales en
cumplimiento de los requisitos para optar al desarrollo de tesis de grado.

Daniela Ferrada Contreras

Estrellita Villagra Hernández

Dr. Claudia A. Caro-Díaz

Chillán, 2019.

ÍNDICE

| | |
|---|-------|
| 1-. Resumen..... | 3 |
| 2-. Introducción | 4-5 |
| 3-. Discusión bibliográfica..... | 5-7 |
| 4-. Hipótesis | 7 |
| 5-. Objetivos | |
| 5.1 Objetivos Generales..... | 8 |
| 5.2 Objetivos Específicos | 8 |
| 6-. Antecedentes Generales | |
| 6.1 Esfingomielinasa | 9 |
| 6.2 Glucosamina | 9-10 |
| 6.3 Microscopía y detalle experimental..... | 10-12 |
| 7-. Resultados y Discusiones | 12-17 |
| 8-. Conclusiones | 18 |
| 9-. Bibliografía | 19-22 |

1-. RESUMEN

La esfingomielinasa C (SMASE), isómero de la esfingomielinasa D producida por la araña *Loxosceles* destruye eritrocitos produciendo muchos problemas, principalmente dermo-necrosis, coagulación intravascular, respuesta inflamatoria, etc. [1-6].

La necesidad de disminuir la toxicidad de SMASE ha establecido un área de investigación muy importante, cuyos resultados pueden tener un gran impacto en la salud de nuestra sociedad. El propósito de este estudio es identificar complejos activos en la inhibición de la esfingomielinasa C (SMASE) mediante el uso de derivados de glucosaminas de hierro con diferentes sustituyentes (R= -F, -Cl, -Br, -CH₃, -OCH₃, -NO₂, -H). Los complejos de glucosamina se presentan como una especie biodegradable y su potencial actividad se estudió en solución tampón de fosfato (pH 7.3), mediante recuento de eritrocitos en presencia de los complejos y de éstos en presencia de SMASE a diferentes tiempos. Los resultados de este análisis pueden usarse para encontrar un tipo de complejo que presente una actividad inhibitoria frente a la SMASE y un daño menor al que produce la esfingomielinasa en los eritrocitos.

2-. INTRODUCCIÓN

Nuestra molécula de interés es la esfingomielinasa C, una enzima de 35 kD [7] isómero de la esfingomielinasa D producida por la araña *Loxosceles*, que actúa en las terminaciones nerviosas produciendo dolor en el sitio de la lesión y en los ganglios linfáticos regionales. Esta destruye eritrocitos liberando fibrinógeno y factores de la coagulación intravascular induciendo una anemia progresiva que puede agravarse produciendo un estado de shock o coma [2, 3]. La necesidad de disminuir la toxicidad de la SMASE ha creado a un área activa de investigación. En nuestro país, la vacuna (fragmentos de anticuerpos) se utiliza en casos complicados sin tratamiento para la respuesta inflamatoria, dermo-necrosis, muerte celular y efectos secundarios que pueden terminar en hemoglobinuria, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, taquicardia, hipotensión, insuficiencia renal y eventualmente causar la muerte. Por esta razón encontrar una especie sensible y selectiva para la SMASE puede ser muy importante. En investigaciones posteriores grandes complejos metálicos de quitosano resultaron ser muy atractivos proporcionando una estrategia ideal, ya que estos polisacáridos son biodisponibles, y se presentan como especies biodegradables [8]. Estos resultados muestran que existe un complejo de Fe (II) de quitosano con actividad inhibitoria de la SMASE [8], lamentablemente los complejos de quitosano son prácticamente insolubles [8]. En este contexto, el trabajo con monómeros derivados de quitosano puede dar buenos resultados frente a la SMASE, estos mediadores serán complejos de glucosamina de Fe (II) con grupos atractores y dadores de electrones en el ligando salicilaldehído (-Br, -Cl, -F, -NO₂, -OCH₃, -CH₃, -H).

La glucosamina (C₆H₁₃NO₅) es un amino azúcar muy abundante [9], estudios recientes proporcionan evidencia preliminar de que la glucosamina puede ser biodisponible en el líquido sinovial después de su administración oral [10]. Las modificaciones selectivas del monosacárido permiten obtener moléculas con propiedades novedosas para su aplicación industrial y en el campo biológico. Las modificaciones selectivas de estos monómeros naturales a través de métodos químicos implican la modificación de un grupo o un residuo particular. En el contexto biomédico, las modificaciones químicas

selectivas son de interés en el desarrollo farmacológico de liberación lenta y derivados con actividad antioxidante, antitumoral y antimicrobiana [11-13].

3-. DISCUSIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las interacciones entre un mediador y una especie activa pueden ocurrir a través de ciertos grupos funcionales, los complejos de bases de Schiff derivadas de aminoazúcares con metales de transición han sido objeto de numerosos estudios con miras a su aplicación en la tecnología como catalizador [15-18], y en medicina [19, 20]. Las propiedades de los complejos están relacionadas con la estructura del ligando.

Existen estudios de las características de coagulación del ácido húmico modificado con glucosamina [21] y estudios sobre su aplicación en la osteoartritis primaria de rodilla sintomática [22-27]. Se sabe sobre su actividad anti-VIH-1 [28], bioactividad [29], propiedades anti-inflamatorias [30, 31], antioxidantes y antimicrobianas [32, 33].

Las modificaciones selectivas de la estructura de los monosacáridos a través de métodos químicos o enzimáticos implican la modificación de un tipo de grupo funcional o un residuo. Estos derivados son importantes en diversas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas [34].

Se sabe que los carbohidratos forman complejos con los iones metálicos que generalmente se estudian en solución y algunos se han aislado como sólidos estables [35]. Se ha informado la síntesis, estructura y propiedades magnéticas de los complejos de cobre (II) y níquel (II) con un ligando de 2-aminoglucosa [36].

Yano y colaboradores [37] han estudiado la síntesis y caracterización de complejos de níquel (II) que contienen N-glucósidos derivados de la D-glucosamina, la etilendiamina y la trimetiletilendiamina mostrando actividad antifúngica efectiva contra la levadura patógena, *Candida albicans*. Nuevos complejos trinucleares Mn (II), Mn (III), Mn (II) con puentes de carbohidratos derivados de complejos de manganeso (II) hepta coordinados con N-glucósido, fueron informados por Tanase y colaboradores utilizando ligandos como Cl y Br [38]. El derivado glicosil sacárido, (D-glucopiranos) 4-

feniltiosemicarbazida y sus complejos, con cobalto (II), níquel (II), cobre (II) y zinc (II) se sintetizaron, caracterizaron y probaron para efectos citotóxicos. El complejo de cobre inhibió el carcinoma Ehrlich Ascites, inducido por líneas celulares de cáncer en ratones albinos suizos y tan claramente mejor que el ligando libre y otros complejos [39]. Por otro lado, ocho complejos de platino (II) de carbohidratos sintetizados a partir de conjugados de carbohidrato-diamina. D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-xilosa y L-glucosa se estudiaron en la actividad antitumoral [40]. Los amino azúcares forman fácilmente bases de Schiff con aldehídos aromáticos, que se ha demostrado que proporcionan complejos estables con iones de metales de transición tales como Cu (II), Fe (III) y Co (II) [41]. Adam y Hall [41] no pudieron obtener complejos de Ni (II) con salicilaldiminas derivadas de amino azúcares, probablemente por la constante de estabilidad lo de los complejos, los complejos con ligandos de base de Schiff podrían ser útiles como catalizadores asimétricos. Holland y colaboradores [42] informaron que la base de Schiff de Cu (II) catalizó los complejos derivados de amino-azúcares catalizados por la ciclopropanación asimétrica de olefinas.

La base de Schiff de o-salicilaldehído con D glucosamina se conoce desde hace muchos años, pero sus propiedades en solución no se han descrito. En las soluciones de metanol (MeOH) y dimetilsulfóxido (DMSO), la base de Schiff presenta los equilibrios anomérico y enolimina *versus* cetoimina. Se ha informado sobre la tautomerización en los productos de condensación de metilamina y bencilmina con 2-hidroxi-1-naftaldehído. Korobov y colaboradores encontraron mediante métodos espectroscópicos que la base de Schiff de alquilaminas con 5-nitro-tiosalicilaldehído existe predominantemente en forma de cetoamina en solventes no polares [43]. Por otro lado, las 2 hidroxina ftaidiminas de D-galactosamina, D-glucosamina y D-manosamina exhiben la enol-imina-ceto-amina y los equilibrios anoméricos en soluciones de DMSO [44].

Como se mencionó anteriormente, la SMASE C es una proteína tóxica de alto peso molecular que induce un marcado aumento en la secreción de transmisores de los nervios afectados, que son altamente específicos para vertebrados, insectos y crustáceos. El alto peso molecular de esta toxina afecta el proceso de secreción en las terminales presinápticas. Su capacidad es inducir la activación de canales catiónicos no

específicos en la membrana presináptica como resultado de su enlace a un receptor de membrana específico.

Se ha estudiado la inhibición de la SMASE con complejos de quitosano de hierro modificados con grupos R donde R= -F, -Cl, -Br, -CH₃, -OCH₃, -NO₂, -H y se ha encontrado que cuando R= -CH₃, el complejo no destruye la esfingomielina de los eritrocitos significativamente, mostrando ser un protector celular en presencia de la SMASE [8]. Estudios similares no han sido reportados.

4-. HIPÓTESIS.

Se ha trabajado en estudios sistemáticos de la interacción de la SMASE C y el grupo hemo u otros complejos afectados por el quitosano. En este estudio hay algunos problemas como; solubilidad del quitosano debido a su alto peso molecular y el grado de N-acetilación del quitosano comercial (es del 30%). El complejo de glucosamina propuesto para este trabajo es más pequeño en comparación con el quitosano pero con propiedades similares, entonces: ¿existe un complejo de glucosamina con un comportamiento similar que el complejo de quitosano frente a la SMASE C?

5-. OBJETIVOS.

5.1-. Objetivo general:

Contribuir a aumentar el conocimiento fundamental sobre la interacción entre la esfingomielinasa C y complejos metálicos de glucosamina y su actividad inhibitoria.

5.2-. Objetivos específicos:

- 1-. Estudios del comportamiento de la membrana celular con glucosamina.
- 2-. Estudio del comportamiento de las bases de Schiff frente a la SMASE.
- 3-. Estudio del comportamiento de los complejos metálicos de glucosamina y membrana celular en presencia de esfingomielinasa C a través del recuento de eritrocitos bajo el microscopio a distintos tiempos.

6-. ANTECEDENTES GENERALES

6.1-. Esfingomielinasa

Toxinas y venenos como los isómeros esfingomielinasa C y D, presentan actividad hemolítica de los eritrocitos e inducen dermonecrosis [3-6]. Los eritrocitos o hematies son cuantitativamente los componentes más abundantes de la sangre. Constituyen el componente principal que los vertebrados usan para transportar oxígeno por medio de la hemoglobina a través de la sangre y los vasos sanguíneos hacia las diferentes partes del cuerpo. La membrana del eritrocito es un complejo bi-lipídico y proteínico, que es importante para mantener la forma celular y mantener su permeabilidad selectiva. Los eritrocitos transportan oxígeno por medio de la hemoglobina, un complejo molecular que contiene grupos hemo cuyos centros de hierro se unen temporalmente al oxígeno molecular en los pulmones que luego se liberan en diferentes tejidos del cuerpo. Estudiaremos la inhibición de esta toxina (SMASE) por los complejos de glucosamina a través de conteo de glóbulos rojos humanos en solución, utilizando un microscopio invertido y un contador celular.

6.2-. Glucosamina.

Este es un precursor en la síntesis bioquímica de proteínas y lípidos glicosilados, es parte de la estructura de los polisacáridos quitosano y quitina, que componen los exoesqueletos de crustáceos y otros artrópodos, paredes celulares en hongos y muchos organismos superiores. Se produce comercialmente mediante la hidrólisis de exoesqueletos de crustáceos o, menos comúnmente mediante la fermentación de granos de maíz o trigo [14].

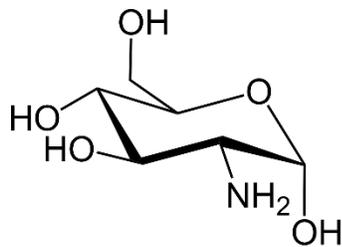


Figura 1: Estructura molecular de la glucosamina.

6.3-. Microscopía y detalle experimental

Mediante la utilización de un microscopio invertido y cámara de recuento Neubauer analizaremos la inhibición de la toxina esfingomielinasa C (SMASE) ante diferentes complejos derivados de glucosaminas. Para ello, es necesario preparar tres micro tubos con soluciones conformadas por sangre y suero (NaCl 0,9%) guiando las cantidades utilizadas a partir de la tabla nº1, luego se procede a preparar ocho micro tubos con diferentes bases de Schiff de glucosaminas y Complejos de glucosaminas de hierro (Q), expuestas en la tabla nº 2 con la finalidad de realizar el control 1, control 2 , control 3 y control 4 en los tiempos 3, 5, 10, 15, 30, 120 y 180 minutos. Ver tabla nº3.

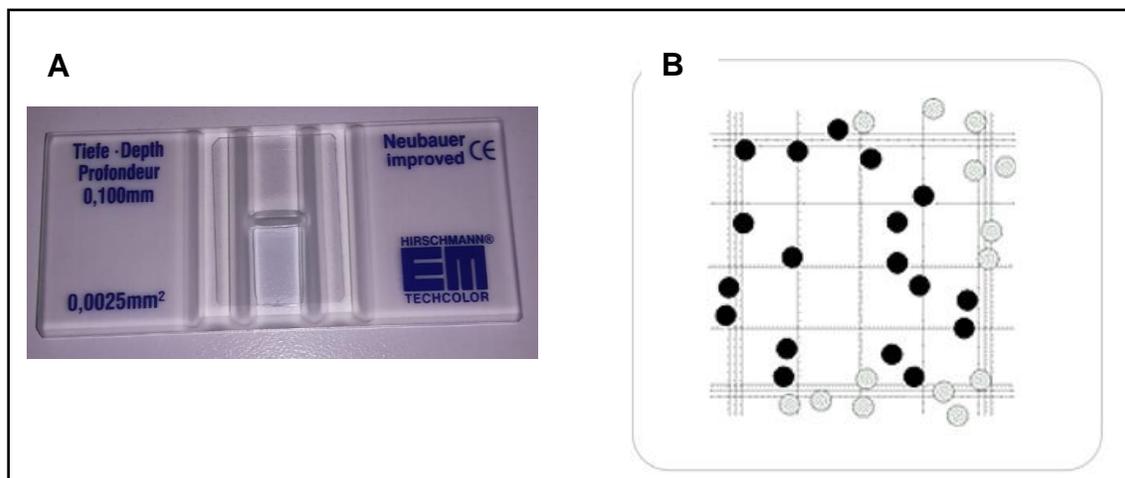


Figura 2. A: Cámara de Neubauer comercial. **B:** Conteo de un cuadrante de cámara de Neubauer.

Tabla 1. Preparación de la solución madre (sangre).

| | NaCl 0,9% | Sangre | Micro tubo nº1 | Micro tubo nº2 |
|----------------|-----------|--------|----------------|----------------|
| Micro tubo nº1 | 50 µL | 20 µL | | |
| Micro tubo nº2 | 205 µL | --- | 5 µL | |
| Micro tubo nº3 | 90 µL | --- | | 10 µL |

Tabla 2. Concentración molar de compuestos utilizados.

| Q | Molaridad |
|-----------------------|--------------------------|
| Fe-G-Cl | $3.1163 \times 10^{-5}M$ |
| Fe-G-NO ₂ | $2.8192 \times 10^{-5}M$ |
| Fe-G-F | $3.7443 \times 10^{-5}M$ |
| Fe-G-OCH ₃ | $1.6961 \times 10^{-5}M$ |
| G-H-Fe | $7.4670 \times 10^{-5}M$ |
| G-CH ₃ -Fe | $6.7591 \times 10^{-5}M$ |
| G-Br- Fe | $1.8511 \times 10^{-4}M$ |

Tabla 3. Especificaciones de especies contenidas en cada control.

| Especie | Control 1 (µL) | Control 2 (µL) | Control 3 (µL) | Control 4 (µL) |
|----------------|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Solución madre | 10 (3.795X10 ⁵ cel/mL) | 10 | 10 | 10 |
| Suero | 90 | 80 | 70 | 80 |
| Azul de tripan | 1 | 1 | 1 | 1 |
| SMASE | ----- | 10 | 10 | --- |
| Q | ----- | ----- | 10 | 10 |

7-. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para nuestro análisis de los diferentes gráficos se tomarán en cuenta los controles cuyos conteos corresponden a las células vivas, dando explicación a los diferentes comportamientos en presencia de la toxina esfingomielinasa C (SMASE), así como también sin la presencia de ésta.

En la figura 3 se observa el comportamiento de los diferentes compuestos de glucosaminas de hierro frente a los glóbulos rojos sin toxina. El conteo de células se realizó a los 3, 5,10, 15, 30, 120,150 y 180 minutos. Cada barra es un promedio del conteo de las células vivas en cada cuadrante de la cámara Neubauer.

Se sabe que los glóbulos rojos disminuyen drásticamente en el minuto 15 en presencia de la toxina esfingomielinasa C [8], lo que se espera entonces es que los complejos sean inocuos frente a los eritrocitos durante todo el tiempo en estudio.

Se visualiza que a medida que transcurre el tiempo de análisis disminuyen la cantidad de células sanguíneas vivas de nuestro interés, en el caso de los gráficos A, C, F, y G, representativos de los complejos de glucosaminas con R=-CH₃, -CH₃O, -H y -Cl, se observa una disminución de eritrocitos notoria al minuto 120 con un 56%, 78%, 64% y 79% de células vivas con respecto al porcentaje inicial, aunque la mayoría muestra una

disminución paulatina de células vivas entre el minuto 3 y 120 y un valor constante desde el minuto 120. Los complejos recién analizados no muestran ser nocivos para los eritrocitos destacando los complejos con $R = -CH_3O$ y $-Cl$, que muestran ser menos nocivos que los otros, aunque los complejos con $R = -CH_3O$ y $R = -H$ tienen otra disminución de células vivas en el minuto 180, de un 30 y 14% respectivamente, con respecto al minuto 120. El complejo de glucosamina con $R = -NO_2$, muestra una disminución de células hasta llegar a una cantidad de células vivas de un 83% en el minuto 5 y de un 55% en el minuto 10 para permanecer constante con un 55% de células con respecto al tiempo inicial.

Con respecto al gráfico E ($R = -F$), se observa una disminución de células vivas hasta un 72% aproximadamente en el minuto 15 con respecto al valor inicial, permaneciendo constante hasta el minuto 180. Finalmente, el comportamiento del complejo con $R = -Br$ (gráfico B) muestra una cantidad de células vivas relativamente constante en el que hay sólo una pérdida de un 9% app. hasta el minuto 180.

Considerando que a los 15 minutos muere un 5% de glóbulos rojos bajo microscopio [8], se puede decir que los complejos que presentan ser más inocuos frente a los glóbulos rojos a los 15 minutos, son los complejos de glucosamina de hierro cuando el radical R es $= -CH_3$, $-Br$, $-CH_3O$ y $-Cl$. Mueren un 9.8; 7.5; 8.0 y un 10% de glóbulos rojos respectivamente. Estos complejos, por lo tanto, son potenciales complejos para estudiar en presencia de la toxina SMASE.

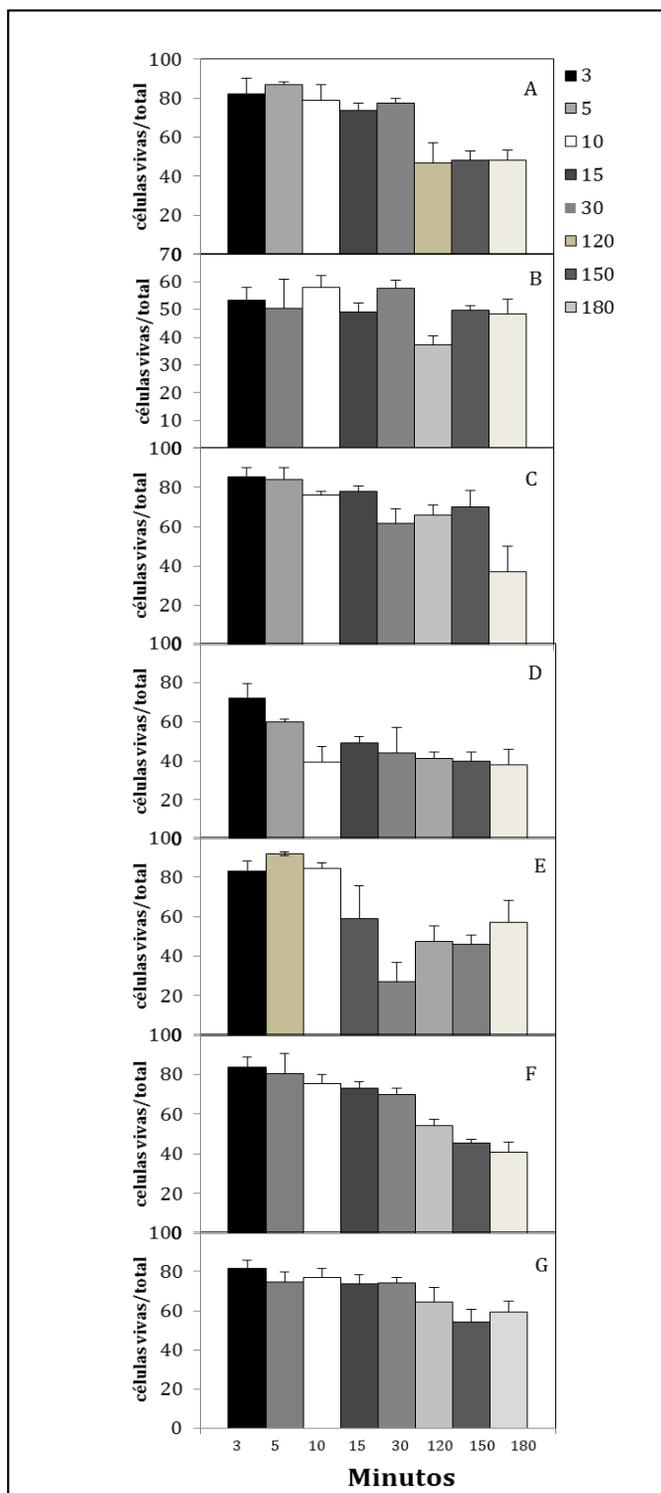


Figura 3. Comportamiento de complejos de glucosaminas de hierro en presencia de glóbulos rojos a diferentes tiempos de 3, 5, 10, 15, 30, 120, 150 y 180 minutos, a temperatura ambiente en una solución de suero fisiológico. Gráficos que representan los resultados para los complejos con diferentes radicales. A: -CH₃; B: -Br; C: -OCH₃; D: -NO₂; E: -F; F: -H; G: -Cl.

En la figura 4 se puede observar el comportamiento de los distintos complejos, a temperatura ambiente y en presencia de la esfingomielinasa C, en el conteo de eritrocitos.

En la mayoría de los gráficos se puede ver que la disminución de eritrocitos vivos disminuye lentamente a medida que pasa el tiempo, en los cuales la mayoría de las células vivas disminuye ya a los 10 minutos. Los gráficos B, C, D y G (R= -Br, -CH₃O, -NO₂ y -Cl) muestran un comportamiento en donde se puede apreciar una disminución de células en el minuto 10 de un 25% para R= -Br manteniéndose relativamente constante hasta el minuto 180 donde hay un 62% de células muertas, mientras que los otros muestran una muerte celular de un 36%, respecto a la cantidad de células en el minuto inicial, manteniéndose constante hasta el final del estudio.

El complejo de glucosamina con R= -CH₃, presenta un valor constante durante todo el estudio, considerando la desviación estándar. Por otro lado, el complejo de glucosamina con R= -H, presenta una muerte celular de un 44% en el minuto 30 permaneciendo constante hasta el minuto 180. Con respecto al complejo con R= -F (figura 4 E) se puede observar que sólo un 13% de células mueren desde el minuto 3 al 120, mientras que las células muertas alcanzan un 33% en el minuto 150 manteniéndose en el minuto 180.

Se sabe que la esfingomielinasa C presenta un 60 % de células muertas en el minuto 3 y este porcentaje sube a un 70% en el minuto 50 [8], esto nos indica que el complejo de glucosamina con R= -F es un buen candidato para seguir en estudios posteriores.

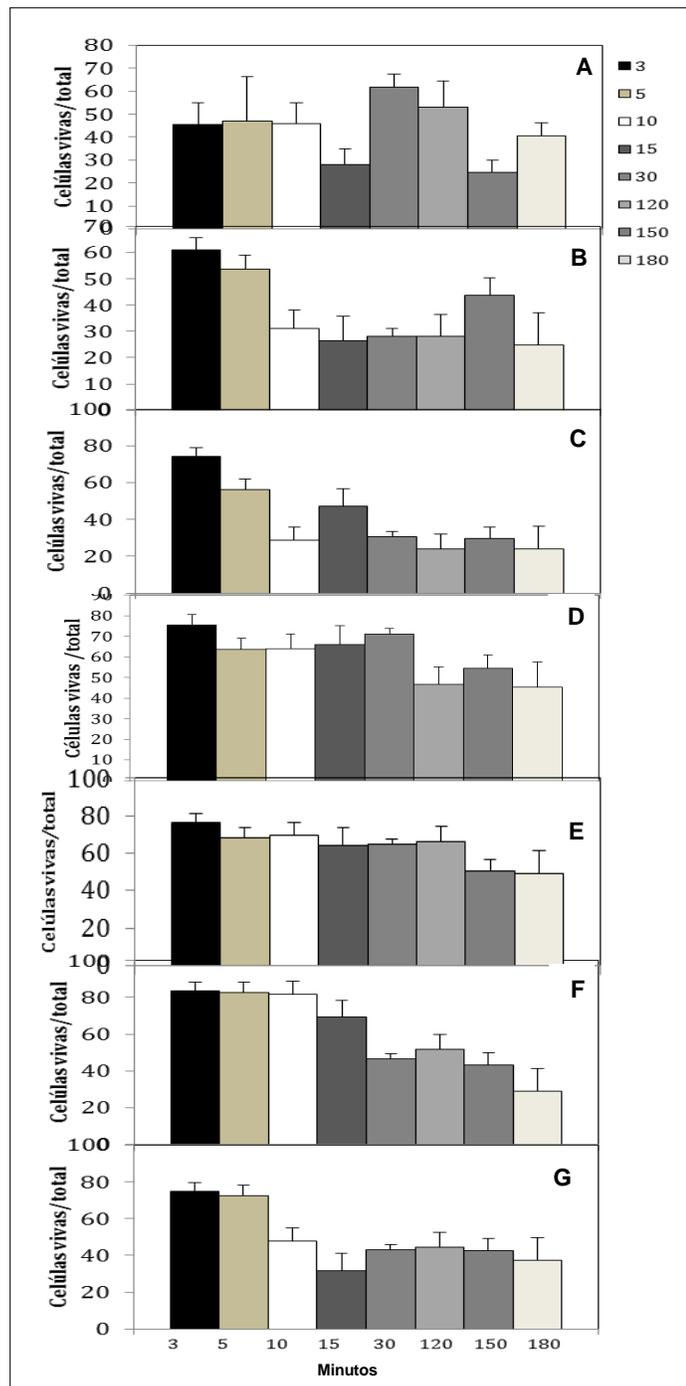


Figura 4. Muestra de sangre en presencia de complejos de glucosaminas de hierro modificados químicamente con diferentes radicales: A: -CH₃; B: -Br; C: -OCH₃; D: -NO₂; E: -F; F: -H; G: -Cl, a los 3, 5, 10, 15, 30, 120, 150 y 180 minutos a temperatura ambiente en una solución de suero fisiológico en presencia de SMASE.

En la figura 5 se compara la cantidad de células vivas con los distintos compuestos en los diferentes tiempos de cada control, estos resultados muestran y corroboran el análisis anterior en el cual los compuestos Fe-G-Br, Fe-G-CH₃, Fe-G-OCH₃, Fe-G-H y Fe-G-Cl marcan su mayor disminución desde el minuto 15 hasta el minuto 30, es decir, al pasar los 30 minutos la esfingomielinasa destruye por si sola aproximadamente la mitad de células vivas, dañando sus membranas.

Con los gráficos de la figura 5 se resume que entre los siete compuestos estudiados solo dos son los que destacan por su efecto inhibitorio, estos compuestos son Fe-G-NO₂ y Fe-G-F, son los únicos que al pasar los 30 minutos no tienen la tendencia de disminuir en gran porcentaje el número de eritrocitos vivos, de cierta manera logran mantener la cantidad de células vivas hasta el minuto 120, siendo los compuestos más atractivos para nuestro estudio.

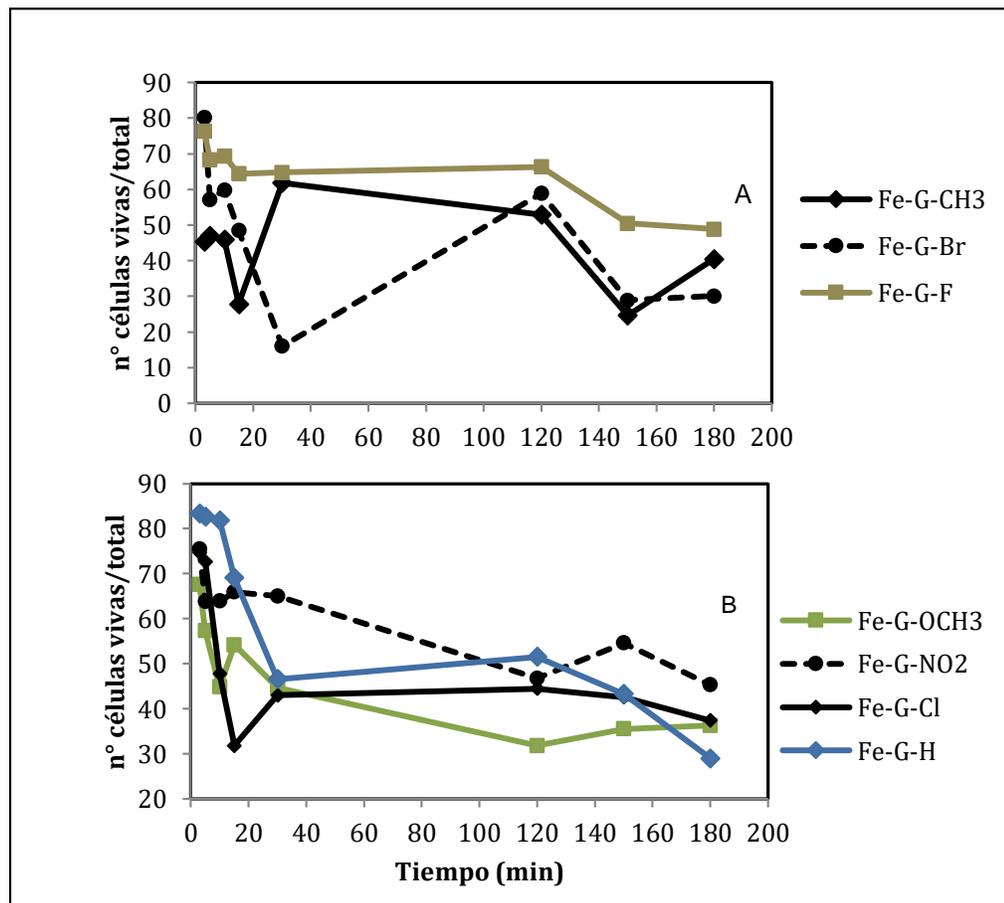


Figura 5. Comparación de número de células vivas en el tiempo 3, 5, 10, 15, 30, 120,150 y 180 minutos de los compuestos A: -CH₃; B: -Br; C: -OCH₃; D: -NO₂; E: -F; F: -H; G: -Cl, en presencia de esfingomielinasa a temperatura ambiente en una solución de suero fisiológico.

8-. CONCLUSIONES

El análisis del estudio de glucosaminas de hierro nos permitió contribuir en el aumento del conocimiento fundamental sobre la interacción de la esfingomielinasa C y complejos metálicos de glucosamina y actividad inhibitoria. Estudios anteriores analizaron la actividad inhibitoria de un complejo de Fe (II) de quitosano, que lamentablemente es prácticamente insoluble. Para nuestro estudio utilizamos mediadores del quitosano como es la glucosamina con grupos atractores y dadores de electrones en el ligado salicilaldehído.

Los complejos estudiados no presentaron una disminución considerable de células vivas entre el minuto 15 y 30, observándose en ese tiempo que el complejo que provocó menos daños fueron los complejos de hierro con R=- CH₃, Br, OCH₃, y Cl con una muerte celular de un 9.8, 7.5, 8 y 10% en el minuto 15 mientras que los otros aumentan la muerte celular entre un 13 y un 44% aunque nunca tan alta como la que provoca la SMASE por si sola. Estos últimos no son completamente inocuos frente a la membrana celular. En presencia de la esfingomielinasa los complejos Fe-G-NO₂ y Fe-G-F son los presentaron una actividad inhibitoria frente a la SMASE, entonces podrían ser posibles protectores de la membrana celular de los eritrocitos humanos.

9-. BIBLIOGRAFIA

- [1] Saraco S., De Roodt., Loxoscelismo. ATA., 67 (2005) 9-45.
- [2] Pauli I., Minozzo J.C., da Silva P.H., Chaim M.O. and SanchesVeiga S., Toxicon, 53 (2009) 660-671.
- [3] Goldman L., Ausiello D. Cecil Textbook of Medicine. 22nd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 2004.
- [4] Barbaro K.C., Lira M.S., Araújo C.A., Pareja-Santos A., Távora B.C.L.F., Prezotto-Neto J.P., Kimura L.F., Lima C., Lopes-Ferreira M. and Santoro M.L., Toxicon, 56 (2010) 972-979.
- [5] Bucarechi F., Mello De Capitani E., Hyslop S., Sutti R., Rocha-e-Silva T.A.A., Bertani R., Clin. Toxicol., 48 (2010) 764-765.
- [6] Lucato R.V. Jr., Abdulkader R.C.R.M., Barbaro K.C., Mendes G.E., Castro I., Baptista M.A.S.F., Cury P.M., Malheiros D.M.C, Schor N., Yu L., Burdmann E.A., PLoSNegl. Trop. Dis., 5 (2011) e1182.
- [7] Guimarães G., Dias-Lopes C., Duarte C.G., Felicori L., Machado de Avila R.A., Figueiredo L.F., de Moura J., Faleiro B.T., Barro J., Flores K., Silva W., Tintaya B., Yarleque A., Bonilla C., Kalapothakis E., Salas C.E., Chávez-Olortegui C., Toxicon., 70C (2013) 90-97.
- [8] Caro C.A., Lillo L., Valenzuela F.J., Cabello G., Chem. Biol. Interact., 263 (2016) 81-87.
- [9] Pigman W.W., Horton D., Wander J.D., The Carbohydrates., Vol. IB, New York Academic Press. 1980, pp. 727-728.
- [10] Kawcak C.E., McIlwraith C.W.J., Equine Vet Sci, 31 (4) (2011) 155-159.
- [11] Wang X., Liu B., Li X., Sun R., Nanotechnology, 23 (49) (2012) 495706.

- [12] Xu W., Jiang C., Kong X., Liang Y., Rong M., Liu W., *Mol. Med. Rep.*, 2 (2012) 385-390.
- [13] Stokes S.S., Albert R., Buurman E.T., Andrews B., Shapiro A.B., Green O.M., McKenzie A.R., Otterbein L.R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22(23) (2012) 7019-7023.
- [14] Pigman W.W., Horton D., Wander J.D., *The Carbohydrates*, New York: Academic Press, IB (1980) 727–728.
- [15] Diéguez M., Pàmies O., Ruiz A., Díaz Y., Castellón S., Claver C., *Coord. Chem. Rev.*, 248 (2004) 2165-2192.
- [16] Borriello C., Del Litto R., Panunzi A., Ruffo F., *Tetrahedron: Asymmet.*, 15(4) (2004) 681-686.
- [17] Chatterjee D., Basak S., Mitra A., Sengupta A., Le Bras J., Muzart J., *Inorg. Chim. Acta*, 359 (2006) 1325-1328.
- [18] Chatterjee D., Basak S., Riahi A., Muzart J., *J. Mol. Catal. A. Chem.*, 255 (2006) 283-289.
- [19] Ying F., Yi L., Changli X., Songsheg Q., Zhifeng L., Haoyu S., Maosheng D., Xiangcai Z., *Thermochim. Acta*, 285 (1996) 181.
- [20] Bayly S.R., Fisher C.L., Storr T., Adam M.J., Orvig C., *Bioconjug. Chem.*, 15 (2004) 923-926.
- [21] Terashima M., Tanaka S., Fukushima M., *Chemosphere*, 69(2) (2007) 240-246.
- [22] Bottegoni C., Muzzarelli R.A.A., Giovannini F., Busilacchi A., Gigante A., *Carbohydr. Polym.*, 109 (2014) 126-138.
- [23] Shahine E.M., Elhadidi A.S., *Alex. J. Med.*, 50(2) (2014) 159-163.
- [24] Henrotin Y., Marty M., Mobasher A., *Maturitas*, 78(3) (2014) 184–187.
- [25] Su N., Yang X., Liu Y., Huang Y., Shi Z., *J. Cranio-Maxillofac. Surg.*, 42(6) (2014) 846–851.
- [26] Lopes Júnior O.V., Inácio A.M., *Rev. Bras. Ortop.*, 48 (4) (2013) 300-306.

- [27] Onigbinde A.T., Talabi A.E., Shehu R.A., Hong Kong Physiother. J., 29(2) (2011) 79-85.
- [28] Yang J., Li J-R., Yang J-X., Li L-L., Ouyang W-J., Wu S-W., Zhang F., Chin. Chem. Lett., 25(7) (2014) 1052–1056.
- [29] Hong P.K., Gottardi D., Ndagijimana M., Betti M., Food Chem., 142(2014) 285-293.
- [30] Shin J-A., Hwang J-S., Kim S-Y., Oh S-K., Nam G., Han I-O., Neurosci. Lett., 550 (2013) 162-167.
- [31] Wu Y-L., Lin A-H., Chen C-H., Huang W-C., Wang H-Y., Liu M-H., Lee T-S., Kou Y.R., Free Radical Biol. Med., 69 (2014) 208-218.
- [32] Jamialahmadi K., Arasteh O., MatbouRiahi M., Mehri S., Riahi-Zanjani B., Karimi G., Environ. Toxicol.Pharmacol., 38(1) (2014) 212–219.
- [33] Gottardi D., Hong P.K., Ndagijimana M., Betti M., Food Sci. Technol.-LEB ,57(1) (2014) 181-187.
- [34] Zhong Z., Xing R., Liu S., Wang L., Cai S., Li P., Carbohydr. Res., 343 (2008) 566-570.
- [35] Parada J., Bunel S., Ibarra C., Larrazabal G., Moraga E., Gillitt N.D., Bunton C.A., Carbohydr. Res., 333 (2001) 185–195.
- [36] Burkhardt A, Spielberg E.T., Simon S., Görls H., Buchholz A., Plass W., Chemistry. (2008) 1910-1969.
- [37] Yano S., Inoue S., Nouchi R., Mogami K., Shinohara Y., Yasuda Y., Kato M., Tanase T., Kakuchi T., Mikata Y., Suzuki T., Yamamoto Y., J. Inorg. Biochem., 69(1-2) (1998) 15-23.
- [38] Tanase T., Tamakoshi S., Doi M., Mikuriya M., Sakurai H., Yano S., Inorg. Chem., 39(4) (2000) 692- 704.
- [39] Sathisha M.P., SrinivasaBudagumpi, Kulkarni N.V., Kurdekar G.S., Revankar V.K., Pai K.S.R., Eur. J. Med. Chem., 45(1) (2010) 106-113.

- [40] Mikata Y., Shinohara Y., Yoneda K., Nakamura Y., Brudzińska I., Tanase T., Kitayama T., Takagi R., Okamoto T., Kinoshita I., Doe M., Orvig C., Yano S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11(23) (2001) 3045-3047.
- [41] Adam M.J., Hall L.D, *Can. J. Chem.*, 60 (1982) 2229–2237.
- [42] Holland D., Laidler D.A., Milner D.J., *J. Mol. Catal.*, 11 (1981) 119–127.
- [43] Korobov M.S., Minkin V.I., Nivorozhkin L.E., *Zh. Org. Khim.*, 11 (1975) 836–842.
- [44] Matsuhira B., Costamagna J., Villagrán M., *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 39 (1994) 23–2