



POTENCIAL TOXICOLÓGICO E ETOLÓGICO DE ANSIEDADE DA CHALCONA N-4'-[(2E)-3-(3-NITROFENIL)-1-(FENIL)PROP-2-EN-1- ONA] ACETAMIDA FRENTE A ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

Maria Kueirislene Amâncio Ferreira (PG)^{1,a*}, Joyce Dos Reis Lima (IC)^a, Carlos Leone Alves Holanda (IC)^a, Paulo Nogueira Bandeira (PQ)^b, Hécio Silva dos Santos (PQ)^b; Sonia Maria Costa Siqueira (PQ)^a, Adriana Rolim Campos (PQ)^c, Francisco Ernani Alves Magalhães (PQ)^d, Jane Eire Silva Alencar de Menezes (PQ)^{a*}.

¹Mestrado em Recursos Naturais (MARENA), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, [*kueirislene@hotmail.com](mailto:kueirislene@hotmail.com);

^aLaboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-S), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, [*jane.menezes@uece.br](mailto:jane.menezes@uece.br); sonia.costa@uece.br; carlos.leone@aluno.uece.br; joycereis@hotmail.co;

^bCentro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, Ceará, bandeirapn@yahoo.com.br, helciodossantos@gmail.com;

^cNúcleo de Biologia Experimental da Universidade Estadual do Ceará (NUBEX), Fortaleza, Ceará, adrirolim@unifor.br;

^dLaboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, Tauá, Ceará, fernanimagalhaes@yahoo.com.br;

Resumo

Uma nova chalcona N-4'-[(2E)-3-(3-nitrofenil)-1-(fenil)prop-2-en-1-ona] acetamida foi sintetizada e caracterizada pelo uso das técnicas de RMN de ¹H e ¹³C, Infravermelho e espectrometria de massas. Assim, foi avaliado o potencial tóxico e etológico de ansiedade desta chalcona, frente à zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Soluções desta substância foram preparadas com DMSO 3% (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL; 20 µL *i.p*) e submetidas ao teste de toxicidade aguda frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa). Foi calculada a concentração letal para matar 50% (CL₅₀) dos ZFa em até 96h. As mesmas soluções foram investigadas quanto ao possível potencial ansiolítico frente a ZFa, através do teste de campo aberto. Como resultado, a chalcona não foi tóxica para ZFa. As três concentrações testadas diminuíram atividade locomotora (AL) dos ZFa (AL = 26,5% a 45,8%, porém as concentrações de 0,3 e 1,0 mg/mL (20 µL *i.p*) foram significativamente semelhante (p>0,05) ao controle da droga ansiolítica, Diazepam (AL_{DZP}=5,3%).

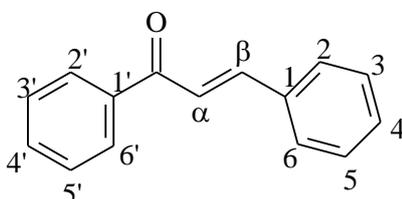
Palavras-chave: Chalconas, Potencial ansiolítico, Zebrafish (*Danio rerio*) adulto



Introdução

Chalconas são cetonas α,β -insaturadas, que apresentam em sua estrutura simples o núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona (ÁVILA et al., 2008) (Figura 1). Seus dois estereoisômeros, *Z* e *E*, são precursores comuns na biossíntese de flavonóides e isoflavonóides. Chalconas e seus derivados são substâncias de grande interesse químico-farmacológico e tem recebido uma grande atenção devido sobretudo a sua estrutura relativamente simples e a diversidade de atividade farmacológica que apresentam (DIMMOCK et al., 1999; NI et al., 2004; NOWAKOWSKA, 2007).

Figura1: Estrutura fundamental das chalconas



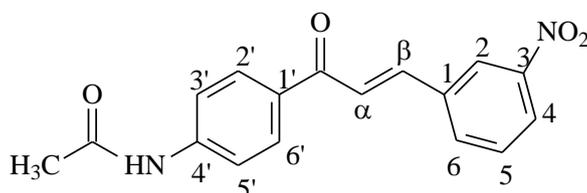
Fonte: Elaborada pelo autor

Esta vasta gama de atividades é em grande parte atribuída às inúmeras possibilidades de substituições nos anéis aromáticos das chalconas, pois a metodologia de síntese das mesmas, baseada na condensação de Claisen-Schmidt, possibilita a obtenção de uma grande variedade de compostos, fornecendo a variedade estrutural pretendida (DUCKI et al., 1998).

Para a avaliação da toxicidade e investigação de potencial terapêutico de determinadas drogas, o uso de Zebrafish (*Danio rerio*) é considerado modelo promissor (RESENDE e SOCCOL, 2015), além de apresentar algumas vantagens em relação aos modelos mamíferos como manutenção de baixo custo, prática e experimentação executável em espaços reduzidos (DE CAMPOS, 2016).

Portanto, o presente trabalho reporta o potencial tóxico e etológico de ansiedade de uma nova chalcona (Figura 2) frente à zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Figura 2: N-4'- [(2*E*) -3- (3-nitrofenil) -1- (fenil) prop-2-en-1-ona] acetamida





Fonte: Elaborada pelo autor

Materiais e Métodos

A chalcona N-4'-[(2E)-3-(3-nitrofenil)-1-(fenil)prop-2-en-1-ona]acetamida foi sintetizada através da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico, utilizando *p*-aminoacetofenona e *m*-nitrobenzaldeído (GASSUL et al., 2004), seguida da reação de acetilação com anidrido acético em meio tamponado (ácido acético/acetato de sódio) em pH =5, sob agitação magnética. Foi caracterizada pelo uso das técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , Infravermelho e espectrometria de massas.

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa)

Animais com 60 a 90 dias ($0,4 \pm 0,1\text{g}$), selvagens, de ambos os sexos, foram obtidos de um fornecedor comercial (Fortaleza, CE). O manejo e aclimatização dos animais foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-S) da Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Fortaleza - CE. Os animais foram mantidos em aquário de vidro ($n=5/\text{L}$), à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclos de claro-escuro de 14/10 horas por 24 h. Foi utilizada água da torneira previamente tratada com anticloro (ProtecPlus[®]) e bombas de ar com filtros submerso. Os animais receberam ração *ad libitum*. Os bioensaios realizados estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (#7210149/2016).

Toxicidade aguda frente ao zebrafish (*Danio rerio*) adulto

O ensaio foi realizado baseando-se em metodologia proposta por Ekambaram, Perumal e Pavadai (2017), com adaptações. Como adaptação do método, ZFa ($n=7/\text{grupo}$) foram tratados via intraperitoneal (*i.p*) com 20 μL do composto diluído em DMSO 3% (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/mL). Como controle negativo foi utilizado o veículo (DMSO 3%; 20 μL *i.p*). Após 24, 48, 72 e 96 horas, os valores obtidos com o número de ZFa mortos foram submetidos à análise estatística, estimando-se a concentração letal para matar 50% (CL_{50}) de ZFa através do método matemático *Trimmed Spearman-Kärber*, com intervalos de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR et al., 2015).

Teste etológico de ansiedade (Teste de Campo Aberto)

O teste foi realizado conforme metodologia proposta por Magalhães et al. (2017). Os ZFa ($n=6/\text{grupo}$) foram tratados com soluções nas concentrações (0,1; 0,3 ou 1,0 mg/mL; 20 μL *i.p*).



Como controle positivo, um grupo de animais foi tratado com Diazepam (DZP; 2,5 mg/Kg; 20 μ L *i.p*), preparado com DMSO 3%. Após 1 hora dos tratamentos via intraperitoneal, os animais foram adicionados em placas de *Petri*, contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas, durante 5 minutos. A possível atividade ansiolítica foi caracterizada pela diminuição da atividade locomotora (AL ou Cruzamentos de Linhas) dos ZFa, comparando-se com o controle (DZP). Os animais que não receberam tratamentos foram considerados como baseline ou naive (100 % de atividade locomotora) e calculado o percentual de atividade locomotora (%AL).

Análise estatística

Os dados do teste de campo aberto foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). A comparação entre as médias foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de *Tukey*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

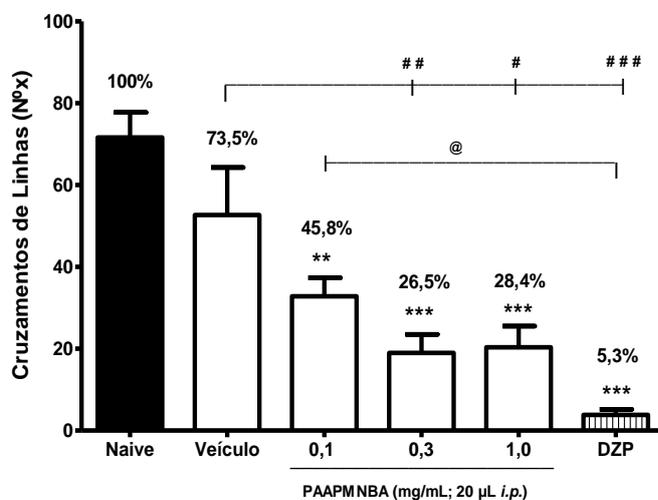
Resultados e Discussão

Nesse trabalho foi utilizado o zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa) como modelo animal vertebrado alternativo ao uso de animais de laboratório na investigação da toxicidade da chalcona N-4'-[(2E)-3-(3-nitrofenil)-1-(fenil) prop-2-en-1-ona] acetamida. Como resultado, a droga aplicada via intraperitoneal em ZFa não se mostrou tóxica durante 96 horas de análise ($CL_{50} > 1.0$ mg/mL).

Para investigar o possível efeito ansiolítico da chalcona, empregamos o teste etológico de ansiedade, ou Teste de Campo Aberto, o qual é bastante empregado em roedores para detectar o possível efeito ansiolítico de drogas (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Recentemente, Magalhães et al. (2017) adaptaram o método para Zebrafish (*Danio rerio*) adulto para fazer avaliações locomotoras e comportamentais abrangentes dos efeitos de drogas analgésicas. Assim, foi realizado o mesmo método para avaliar o possível efeito ansiolítico de soluções da chalcona, empregando-se o Diazepam como padrão de drogas ansiolíticas. Como resultado, foi observado que todas as doses utilizadas causaram comprometimento motor dos ZFa, semelhantes ao controle (Diazepam), como mostrado na Figura 3.



Figura 3: Atividade locomotora de zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min).



Fonte: Elaborado pelo autor

Naive – animais não tratados; Veículo – DMSO 3%; PAAPMNBA – chalcona biossintetizada [*N*-(4'(2*E*)-3-(3-nitrofenil)-1-(fenil)prop-2-en-1-ona) acetamida]; DZP – Diazepam (2,5 mg/Kg; 20 µL *i.p.*). Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo; ANOVA seguida de Tukey. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs Naive; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs Veículo; @ $p < 0,05$ vs DZP. Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de atividade locomotora (%AL) ou cruzamentos de linha (%CL).

De acordo com a Figura 3, podemos observar que os animais tratados com as concentrações de 0,3 e 1,0 mg/mL diminuíram atividade locomotora dos ZFa significativamente, semelhante ($p > 0,05$) ao controle ($AL_{DZP} = 5,3\%$). De acordo com esses dados estatísticos, pode-se sugerir possível ação ansiolítica da chalcona, pois segundo Gebauer et al. (2011), os compostos ansiolíticos, assim como os benzodiazepínicos, diminuem atividade locomotora de Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Esses resultados são considerados importantes e corroboram com relatos descritos por Jamal, Ansari e Rizvi (2008), os quais reportam derivados de chalconas com ação ansiolítica em ratos. Dessa forma, os resultados nos direcionam para análises mais específicas, a fim de confirmar e caracterizar os possíveis mecanismos de atividade ansiolítica da chalcona testada.

Conclusão

Conclui-se que a chalcona *N*-4'-[(2*E*)-3-(3-nitrofenil)-1-(fenil)prop-2-en-1-ona] acetamida não é tóxica e apresentou possível efeito ansiolítico frente à Zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Dessa forma, novos estudos serão realizados para a confirmação e caracterização dos possíveis mecanismos de atividade ansiolítica.



Agradecimentos

Aos colaboradores do Laboratório de Química de Produtos Naturais-(LQPN-S) da UECE. Ao Mestrado em Recursos Naturais (MARENA) da UECE. A FUNCAP, CNPq e UECE.

Referências

- ARELLANO-AGUIAR, O. et al.; Use of the Zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences.com** 9 (4):052-062, 2015.
- ÁVILA, H.P.; SMÂNIA, E.F.; MONACHE, F.D.; JUNIOR, A.S. Structure-activity relationship of antibacterial chalconas. **Bioorganic. & Medicinal Chemistry**. 16, 9790 – 9794, 2008.
- CRUZ, A. P. M., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Em: J. landeira-Fernandez e Sérgio Fukusima (org), **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, 192-217, 2012.
- DE CAMPOS, E. G. (2016). Zebrafish como organismo modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada. 72p. *Dissertação: Mestrado em Ciências: Área Química*. Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- DIMMOCK, J.R.; ELIAS, D.W.; BENAZELY, M.A.; KANDEPU, N.M. Bioactivities of chalconas. **Current Medicinal Chemistry**, 6 (12), 1125 – 11249, 1999.
- EKAMBARAM, S. P.; PERUMA, S. S.; PAVADA, S.; Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal o edema in zebrafish model. **Inflammopharmacol** Doi:10.1007/s10787-016-0303-2.
- DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J.A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N.J.; MCGOWN, A.T.; RENNISON, D. Potent antimittotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorg Med Chem let** 8, 1051 – 1056, 1998.
- JAMAL, H.; ANSARI, W. H.; RIZVI, S. J.; Evaluation of chalcones – a flavonoid subclass, for, their anxiolytic effects in rats using elevated plus maze and open field behaviour tests. **Fundamental & Clinical Pharmacology** 22:673-681, 2008.
- MAGALHÃES, F.E.A et al.; Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**. DOI. 10.1089/zeb.2017.1436, 2017.
- NI, L.; MENG, C.Q.; SIKOKSKI, J.A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 14(12), p. 1669 – 1691, 2004.
- NOWAKOWSKA, Z.A. A review of anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Chemistry**, v. 42, p. 125 – 137, 2007.
- RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. Vol. 1, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2015.
- VOGEL`S Textbook of practical organic Chemistry, fifth edition, by Funiss B. S., Handford A. J., Smith P. W. G., Tatchell A. R., (2004), 1032 – 1035.