

IV SIMPÓSIO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS MÉDICAS 30 DE NOVEMBRO DE 2018

Síntese e avaliação da segurança não clínica da chalcona (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona em zebrafish adulto

Priscila Teixeira da Silva¹(PG), José Ismael Feitosa de Aaraújo² (IC); Herbert de Sousa magalhães³ (PG); Francisco Ernani Alves Magalhães² (PQ), Paulo Nogueira Bandeira¹ (PQ), Hércio Silva dos Santos^{1*} (PQ).

¹Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral-CE, Brasil;

²Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, Tauá, Ceará, Brasil;

³Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, Brasil

*helci dossantos@gmail.com

Resumo

Chalconas e seus derivados tem despertado grande interesse dos pesquisadores na área de química medicinal, por ampla diversidade de atividade farmacológica. Nos últimos anos, o zebrafish adulto vem sendo empregado como modelo substitutivo ao uso de roedores em testes toxicológicos. Desta forma, esse trabalho reporta a síntese e avaliação da segurança não-clínica da chalcona (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (C-Benzal) em zebrafish adulto. Como resultado, a C-Benzal causou um efeito sedativo em zebrafish adulto, porém não se mostrou tóxica. Assim, utilizaremos tal chalcona sintética para avaliar o potencial farmacológico, tal como possível efeito ansiolítico.

Palavras-chave: Chalcona; Zebrafish adulto; Toxicidade.

Introdução

Chalconas constituem uma família de pequenas moléculas com abundância natural em plantas. Seus representantes são cetonas , -insaturadas que apresentam em sua estrutura o núcleo 1,3-diarilprop-2-en-1-ona (ÁVILA et al., 2008) (Figura 1) e o esqueleto C₆-C₃-C₆. Seus dois estereoisômeros, Z e E, são precursores comuns na biossíntese de flavonóides e isoflavonóides. Chalconas e seus derivados tem despertado grande interesse dos pesquisadores na área de química medicinal, sobretudo, por possuírem estrutura química relativamente simples e ampla diversidade de atividade farmacológica (NI et al., 2004; NOWAKOWSKA, 2007).

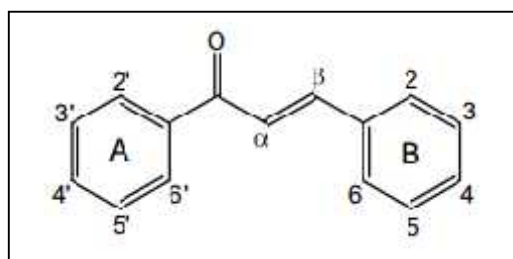


Figura 1. Estrutura fundamental das chalconas.

Desde muito tempo o zebrafish adulto vem sendo empregado em testes de toxicidade no monitoramento de contaminantes ambientais (Huang et al., 2014), compostos farmacêuticos (HILL, 2005), bem como biomonitoramento toxicológico no desenvolvimento de medicamentos (CABALLERO e CANDIRACI, 2018).

Assim, nesse trabalho reportamos a síntese e avaliação a segurança não-clínica da chalcona (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona (Figura 2) em zebrafish adulto.

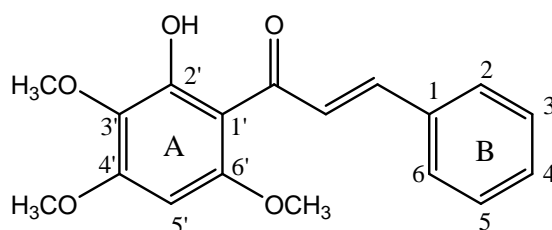
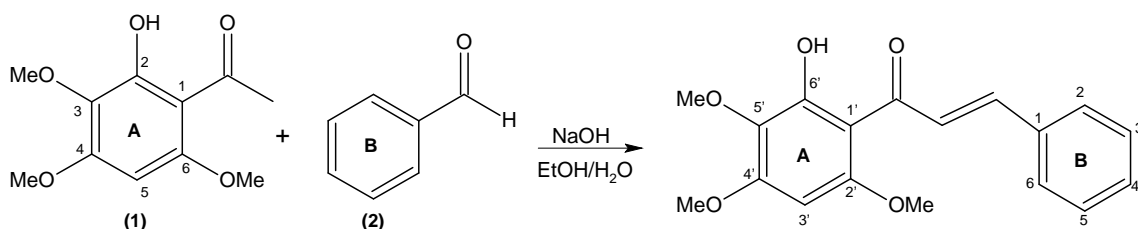


Figura 2. Representação Estrutural da chalcona (*E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona.

Metodologia

Síntese da chalcona

A chalcona foi sintetizada por reações de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico, utilizando a 4-hidroxi-3,4,6-trimetoxiacetofenona (1) com o benzaldeído (2). Foi tomado 2 mmol dos derivados de benzaldeído, dissolvidos em 5 mL de etanol. Acrescentou-se 10 gotas de uma solução de hidróxido de sódio 50% deixando-se sob agitação por 2 minutos. Acrescentou-se a esta mistura 2 mmol da dissolvidos em 5 mL de etanol sob agitação magnética a temperatura ambiente por um período que variou de 48 horas e monitorada em CCD. Após terminada a reação o precipitado foi filtrado e lavado com H₂O gelada até pH neutro. O produto formado (C-Benzal) foi avaliado por cromatografia em camada delgada (CCD) e purificado por recristalização em etanol (Esquema 1).



Esquema 1. Síntese da Chalcona (*2E*)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona.

Zebrafish

Foram utilizados zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de 3.5 ± 0.5 cm e peso 0.4 ± 0.1 g, obtidos da Agroquímica:

Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (40 x 20 x 25 cm), contendo água desclorada (anticloro *ProtecPlus*[®]) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo circadiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração (*Spirulina*[®]) ad libitum 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares (CONCEA, 2018). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 3344801/2017.

Protocolo geral

Os testes com zebrafish foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães et al. (2017). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou controle, via oral (v.o.) (COLLYMORE, RASMUSSEN e TOLWANI, 2013). Em seguida, os animais foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via oral foi usada pipeta automática variável de 20 µL com ponteiros estéreis.

Avaliação da segurança não clínica

Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Foi realizado o teste de campo aberto (AHMAD e RICHARDSON, 2013) para avaliar alteração ou não da coordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Inicialmente, os animais (n=6/gupo) foram tratados, via oral (v.o.), com C-Benzal (1,0 ou 3,0 ou 10 mg/kg) ou Diazepam (DZP; 40 mg/kg), ou veículo (DMSO 3%; 20 µL). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 1 hora dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). Usando o valor de CL do grupo Naive como linha de base (100%), foi calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores da média ± erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 5.0. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Para avaliar a segurança não clínica da C-Benzal empregamos o zebrafish adulto como modelo substitutivo ao uso de roedores. Inicialmente, avaliamos o seu efeito sob a atividade locomotora dos animais, pois é dos parâmetros de análise comportamental que vem sendo utilizado para avaliar ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central do zebrafish (*Danio rerio*) adulto e causar comprometimento locomotor ou não (GEBAUER et al., 2011; TAYLOR et al., 2017). Como resultado, C-Benzal (1 ou 3 ou 10 mg/kg) causou comprometimento locomotor dos animais, significativamente ($p > 0,05$) semelhante ao efeito do diazepam (DZP; 10 mg/kg; $p < 0,001$ vs. naive e veículo), Fig. 3.

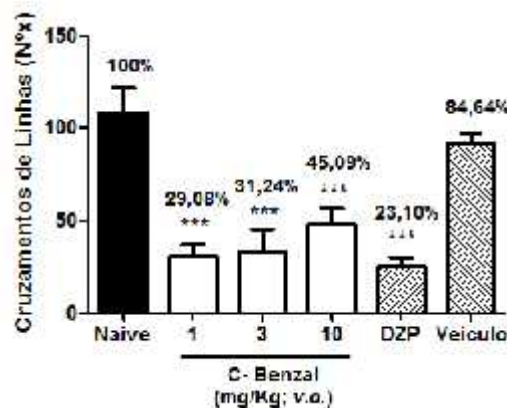


Figura 3. Efeito da C-Benzal sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min). Naive - animais não tratados. DZP – Diazepam (10 mg/kg). Veículo (DMSO 3%; 20 μ L). v.o. – administração via oral. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey. Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de atividade locomotora (%AL).

Tal diminuição da atividade locomotora em zebrafish adulto causada pela C-Benzal sugere uma possível ação sedativa, tais como os benzodiazepínicos (drogas ansiolíticas), os quais diminuem atividade locomotora (mobilidade) de zebrafish (*Danio rerio*) adulto em campo aberto, conforme destacam Gupta et al. (2014) e Benneh et al. (2017). Nesse contexto, investigaremos posteriormente possível efeito ansiolítico-símile dessa chalcona.

Em nossos trabalhos anteriores, empregamos também o zebrafish adulto para avaliar a toxicidade aguda de chalconas sintéticas (Ferreira et al., 2017). Dando continuidade as nossas pesquisas, utilizamos também o zebrafish adulto para avaliar a toxicidade aguda (96 h) da C-Benzal. Como resultado, constatou-se que a C-Benzal não foi tóxica, pois nenhum animal morreu ($DL_{50} > 10$ mg/kg).

Conclusão

A C-Benzal [(E)-1-(2-hidroxi-3,4,6-trimetoxifenil)-3-fenilprop-2-en-1-ona] sintetizada causou um efeito sedativo em zebrafish adulto, porém não se mostrou tóxica. Assim, utilizaremos tal chalcona sintética para avaliar o potencial farmacológico, tal como possível efeito ansiolítico.

Referências

- Ávila, H.P.; Smânia, E.F.; Monache, F.D.; Junior, A.S. 2008. Structure-activity relationship of antibacterial chalconas. *Bioorganic. & Medicinal Chemistry*. v. 16, p. 9790 – 9794.
- Ahmad, F., Richardson, M.K., 2013. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. *Behav Processes* 92, 88-98.
- Benneh, C.K., Biney, R.P., Mante, P.K., Tandoh, A., Adongo, D.W., Woode, E., 2017. *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. *Journal of Ethnopharmacology* 207:129-145.
- Caballero, M.V., Candiracci, M., 2018. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. *Journal of Unexplored Medical Data* 3(4):1-14.
- Cachat J, Stewart A, Utterback E, Hart P, Gaikwad S, Wong K, et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS One*. 2011;6(3):e17597.
- Collymore, C., Rasmussen, S., Tolwani, R.J. 2013. Gavaging adult zebrafish. *J Vis Exp*. 78(e50691), 1-5.
- CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia. Disponível em www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf . Acesso em 22/4/18.
- Gebauer, D.L., Pagnussat, N., Piato, A.L., Schaefer, I.C., Bonan, C.D., Lara, D.R., 2011. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 99, 480-486.
- Gupta, P., Khobragade, S.B., Shingatgeri, V.M, Rajaram, S.M., 2014. Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. *Drug Development and Therapeutics* 5(2): 127-133.
- Huang, Y., Zhang, J., Han, X., Huang, T., 2014. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11:3650-3660.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences* 86(1): 6-19.
- Magalhães, F.E.A., de Sousa, C.A.P.B., Santos, S.A.A.R., Menezes, R.B., Batista, F.L.A., Abreu, A.O., de Oliveira, M.V., Moura, L.F.W.G., Raposo, R.S., Campos, A.R., 2017. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish* 4 (5), 422-429.
- Ni, L.; Meng, C.Q.; Sikokski, J.A. 2004. Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 14(12), p. 1669 – 1691.
- Nowakowska, Z.A. A review of anti-inflammatory chalcones. 2007. *European Journal of Chemistry*, v. 42, p. 125 – 137.

Resende, R.R., Soccol, C.R., 2015. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. Vol. 1, : Blucher, São Paulo, p. 22.

Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Mussulini, B.H., Piato, A.L., Calcagnotto, M.E., Bonan, C.D., Dias, R.D., Blaser, R.E., Souza, D.O., de Oliveira, D.L., 2011. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. PLoS One. 2011;6(5):e19397.

Taylor, J.C., Dewberry, L.S., Totsch, S.K., Yessick, L.R, DeBerry, J.J., Watts, S.A., Sorge, R.E., 2017. A novel zebrafish-based model of nociception. Physiology & Behavior 174, 83-88.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CENAUREM pela obtenção dos espectros de RMN. A todos os colaboradores do Grupo de Pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais, da Universidade Estadual do Ceará (UECE-CECITEC), Tauá-Ce. A UECE, CNPq e FUNCAP pelo apoio e suporte financeiro