

Avaliação da Segurança não Clínica da Chalcona n- $\{4'[(2E)-3-(4\text{-clorofenil})-1\text{-fenil}]\text{prop-2-en-1-ona}\}$ Frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto**Non-clinical safety assessment of Chalcona n- $\{4'[(2E)-3-(4\text{-chlorophenyl})-1\text{-phenyl}]\text{prop-2-en-1-one}\}$ in adult zebrafish (*Danio rerio*)**

DOI:10.34117/bjdv6n8-122

Recebimento dos originais: 08/07/2020

Aceitação para publicação: 12/08/2020

Maria Kueirislene Amâncio Ferreira

Doutoranda em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: kueirislene.ferreira@aluno.uece.br

Antônio Wlisses da Silva

Doutorando em Biotecnologia de Recursos Naturais (RENORBIO)

Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: wlissesdasilva@hotmail.com

Joyce dos Reis Lima

Mestranda em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: joycereisl@hotmail.com

Pedro Henrique Ribeiro Lopes

Mestrando em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: hlopes2906@gmail.com

Paulo Nogueira Bandeira

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Instituição: Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Endereço: Av. da Universidade, 850, CEP: 62.040-370

E-mail: bandeirapn@yahoo.com.br

Hélcio Silva dos Santos

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Instituição: Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Endereço: Av. da Universidade, 850, CEP: 62.040-370

E-mail: helciodossantos@gmail.com

Francisco Ernani Alves Magalhães

Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais pelo RENORBIO-UECE

Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903
E-mail: fernanimagalhaes@yahoo.com.br

Jane Eire Silva Alencar de Menezes

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)
Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903
E-mail: jane.menezes@uece.br

RESUMO

Qualquer desequilíbrio no ciclo de vida do neurotransmissor pode alterar respostas comportamentais que levam a doenças psiquiátricas e outros distúrbios cerebrais. Os flavonóides podem desempenhar um papel nos sistemas enzimáticos e receptores do cérebro, exercendo vários efeitos no sistema nervoso central. Zebrafish é considerado modelo promissor em testes de toxicidade e do potencial terapêutico de determinadas drogas. Foi analisado uma resposta comportamental e a toxicidade de uma chalcona, precursores comuns na biossíntese de flavonóides, frente à zebrafish adulto. A chalcona PAAPCLBA foi sintetizada através da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico, utilizando *p*-aminoacetofenona e *m*-nitrobenzaldeído. Foram utilizados animais com 60 a 90 dias ($0,4 \pm 0,1$ g), selvagens, de ambos os sexos. Os animais foram mantidos em aquário de vidro ($n=5/L$), à temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro-escuro de 14/10 horas por 24 h. A chalcona foi dissolvida em DMSO 3% (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL; 20 μ L *i.p*) e submetidas ao teste de campo aberto. Como controle positivo foi incluído um grupo de animais tratados com Diazepam (DZP; 1 mg/mL; 20 μ L *i.p*). Após 30 min dos tratamentos (*i.p*), os animais foram adicionados em placas de *Petri*, contendo água tratada, marcadas com quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (0-5min). O teste de toxicidade aguda foi realizado com as mesmas concentrações e foi calculada a concentração letal para matar 50% (CL_{50}) dos ZFa em até 96h. A chalcona alterou a locomoção do zebrafish e não se mostrou tóxica. As três concentrações (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL) diminuíram a atividade locomotora (AL) dos ZFa. Diante disto, outros testes deverão ser realizados a fim de investigar modelos farmacológicos de doenças que alteram o comportamento do animal.

Palavras-chave: Chalcona, Resposta comportamental, Zebrafish (*Danio reio*) adulto.

ABSTRACT

Any imbalance in the neurotransmitter's life cycle can alter behavioral responses that lead to psychiatric illnesses and other brain disorders. Flavonoids can play a role in the brain's enzyme and receptor systems, exerting several effects on the central nervous system. Zebrafish is considered a promising model in tests of toxicity and therapeutic potential of certain drugs. A behavioral response and the toxicity of a chalcone, which were common precursors in the biosynthesis of flavonoids, against adult zebrafish were analyzed. The PAAPCLBA chalcone was synthesized through the Claisen-Schmidt aldolic condensation reaction in a basic medium, using *p*-aminoacetophenone and *m*-nitrobenzaldehyde. Animals aged 60 to 90 days (0.4 ± 0.1 g), wild, of both sexes were used. The animals were kept in a glass aquarium ($n = 5 / L$), at a temperature of 25 ± 2 °C, in light-dark cycles of 14/10 hours for 24 h. The chalcone was dissolved in 3% DMSO (0.1; 0.3 and 1.0 mg / mL; 20 μ L *i.p*) and subjected to the open field test. As a positive control, a group of animals treated with Diazepam (DZP; 1 mg / mL; 20 μ L *i.p*) was included. After 30 min of the treatments (*ip*), the animals were added in Petri dishes, containing treated water, marked with quadrants and the locomotor

activity was analyzed by counting the number of crossing lines (0-5min). The acute toxicity test it was performed with the same concentrations and the lethal concentration was calculated to kill 50% (LC50) of the ZFa in up to 96h. The chalcone altered the zebrafish's locomotion and was not toxic. The three concentrations (0.1; 0.3 and 1.0 mg / mL) decreased the locomotor activity (AL) of the ZFa. In view of this, other tests should be carried out in order to investigate pharmacological models of diseases that alter the animal's behavior.

Keywords: Chalcona, Behavioral response, Adult Zebrafish (*Danio reio*).

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central de um organismo é afetado por fatores psicossociais adversos, doenças, estresse, drogas e mudanças ambientais que levam à variações comportamentais, ou seja qualquer desequilíbrio no ciclo de vida do neurotransmissor pode alterar respostas comportamentais que levam a doenças psiquiátricas e outros distúrbios cerebrais (CHROUSOS, 2009; JAT, NAHAR, & JAIN, 2018). Diante disso, avanços no campo da pesquisa neurocomportamental fornecem uma contribuição significativa do zebrafish como uma ferramenta para estudar as alterações neurocomportamentais e sua relação com a resposta fisiopatológica. Alguns fenótipos comportamentais de estresse e ansiedade por exemplo podem ser observados por meio dessas alterações (JAT *et al.*, 2018).

Os flavonóides podem desempenhar um papel nos sistemas enzimáticos e receptores do cérebro, exercendo vários efeitos no sistema nervoso central (Estrada *et al.*, 2012). Neste sentido, analisamos um composto da classe chalconas, precursores comuns na biossíntese de flavonoides e isoflavonóides, que consistem em dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de carbonos com dupla ligação em diferentes posições, que confere a elas uma estrutura particularmente singular (Fig 1). Os derivados dessa classe são de grande interesse químico-farmacológico devido sobretudo a sua estrutura simples e a diversidade de atividade medicinal que apresentam (ÁVILA *et al.*, 2008; NOWAKOWSKA, 2007).

O uso de Zebrafish (*Danio rerio*) é considerado modelo promissor em testes de toxicidade e do potencial terapêutico de determinadas drogas. Resende e Soccol (2015) além de apresentar algumas vantagens em relação aos modelos mamíferos como manutenção de baixo custo, prática executável em espaços reduzidos. Diferentes estudos evidenciam a sensibilidade comportamental do zebrafish adulto a manipulações farmacológicas, toxicológicas e ambientais (SPENCE *et al.*, 2008; STEWART *et al.*, 2013).

Neste sentido, o teste de campo aberto é utilizado principalmente quando pretende-se analisar manifestações comportamentais, sensíveis a diferentes fármacos (SIEBEL, 2017).

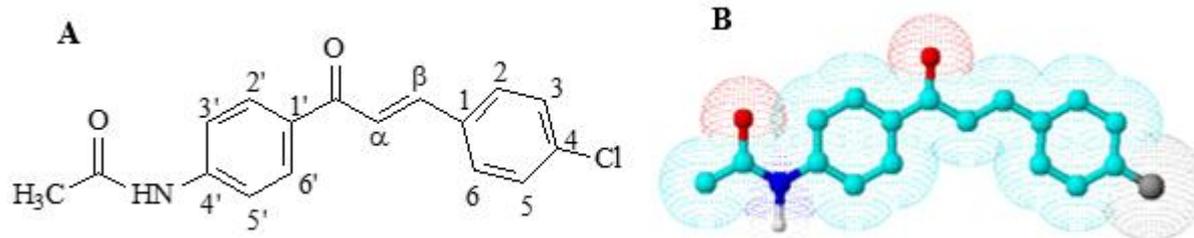
Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar uma resposta comportamental e a toxicidade da chalcona PAAPCLBA frente à zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

A chalcona N-4'[(2E)-3-(4-clorofenil)-1-(fenil) prop-2-en-1-ona] foi sintetizada através da reação de condensação aldólica de Claisen-Schmidt em meio básico, utilizando *p*-aminoacetofenona e *m*-nitrobenzaldeído (Gasull, Silber, Blanco, Tomas, & Ferretti, 2000) 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 H^1 e C^{13} , Infravermelho e espectrometria de massas.

Figura 1: A- Estrutura química da Chalcona chalcona N-4'[(2E)-3-(4-clorofenil)-1-(fenil) prop-2-en-1-ona] B- Estrutura dimensional da chalcona



2.2 ZEBRAFISH (DANIO RERIO) ADULTO (ZFA)

Animais com 60 a 90 dias ($0,4 \pm 0,1g$), selvagens, de ambos os sexos, foram obtidos de um fornecedor comercial (Fortaleza, CE). A acomodação dos animais foi realizada 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 ($n=5/L$), à temperatura de 25 ± 2 °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).

2.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA (TESTE DE CAMPO ABERTO)

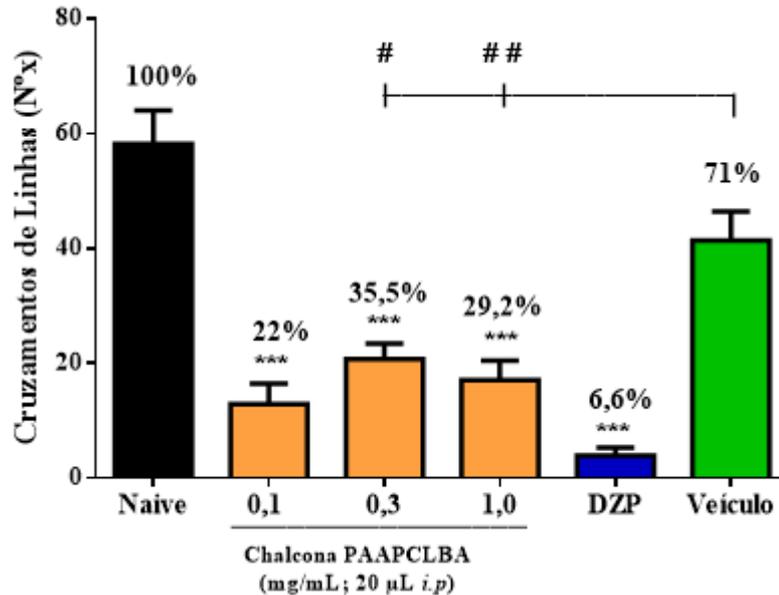
O teste foi realizado conforme metodologia proposta por (Magalhães *et al.*, 2017). Os ZFa (n=6/grupo) foram tratados com soluções nas concentrações (0,1; 0,3 ou 1,0mg/mL; 20 µL *i.p*). Como controle positivo, um grupo de animais foi tratado com Diazepam (DZP; 2,5 mg/Kg; 20 µL *i.p*), preparado com DMSO 3%. Após 30 min dos tratamentos via intraperitoneal, os animais foram adicionados em placas de *Petri*, contendo água tratada, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas, durante 5 minutos. O número de cruzamentos foi contabilizado, e comparados o grupo 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).

2.4 TOXICIDADE AGUDA FRENTE AO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) ADULTO

O ensaio foi realizado baseando-se em metodologia proposta por Ekambaram; Perumal; Pavadai (2017) com adaptações. Os ZFa (n=7/grupo) foram tratados via intraperitoneal (*i.p*) com 20 µL do composto dissolvido 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% (CL₅₀) de ZFa através do método matemático *Trimmed Spearman-Kärber*, com intervalos de confiança de 95% (ARELLANO-AGUIAR *et al.*, 2015).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado uma análise do teste comportamental do zebrafish adulto após administração da chalcona PAAPCLBA em diferentes concentrações empregando o teste de Campo aberto. Como resultado, foi observado que todas as concentrações diminuíram a locomoção dos animais significativamente, semelhante ($p>0,05$) ao controle (DZP=6,6%), como mostra a Figura 2.

Figura 2- Atividade locomotora de zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min).

A Locomoção é considerada um comportamento complexo que requer uma resposta integrada da função cerebral, sistema nervoso, e via visual. Diante disso, esse padrão comportamental foi analisado em muitos estudos por meio de rastreamento automático e vem ganhando atenção por seu uso na triagem de drogas com ação no sistema nervoso central (CASSAR *et al.*, 2020).

Esses resultados são promissores para futuras análises de testes comportamentais como a atividade anticonvulsivante, por exemplo. Ao analisar os efeitos de uma droga antiepiléptica como a difenil-hidantoína na locomoção do peixe-zebra larval, LIU *et al.* (2016) observaram que houve uma diminuição na atividade locomotora e em contrapartida as drogas convulsivantes como o pentilenotetrazol e picrotoxina, causaram um aumento da atividade locomotora.

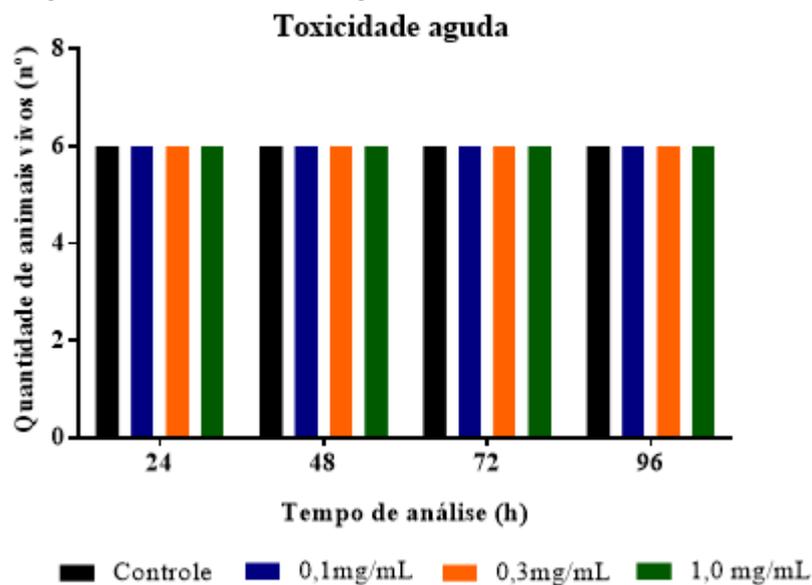
O zebrafish vem sendo utilizado como modelo durante análise de doenças neurológicas e consequentemente na descoberta de novas drogas e testes de toxicidade neste domínio (ESCH *et al.*, 2012; CASSAR *et al.*, 2018). Em decorrente a isto, estudos comportamentais identificaram fortes associações entre as funções do zebrafish e as regiões do cérebro humano. Portanto, foram observados que os sistemas de neurotransmissores, como dopamina, GABA, glutamato, noradrenalina, serotonina, histamina e acetilcolina, estão presentes no zebrafish e pode servir como alvos farmacológicos e toxicológicos (HORZMANN & FREEMAN, 2016; KALUEFF, STEWART, & GERLAI, 2014).

O sistema nervoso central do zebrafish é similarmente organizado quando comparado ao de outros vertebrados e é bem descrito em vários estágios da vida, por isso muitos estudos realizam

testes toxicológicos utilizando o animal na fase embrionária, como foi realizado por Mello *et al.*, (2020) ou na fase adulta, analisado por (LIRA *et al.*, 2020).

O balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto químico é um parâmetro que precisa saber quando se quer verificar a aplicabilidade farmacológica de um determinado composto. Neste trabalho investigamos a toxicidade da chalcona PAAPCLBA utilizando o zebrafish adulto (Fig. 3).

Figura 3- Teste de toxicidade aguda com zebrafish (*Danio rerio*) adulto.



De acordo com a Figura 3, nenhuma das concentrações da chalcona PAAPCLBA não foi tóxica até 96h de análise. Recentemente, Ferreira *et al.* (2020) avaliou a toxicidade de outra chalcona sintetizada (N-{4'[(2E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(phenyl)prop-2-en-1-one]}) utilizando zebrafish adulto e o composto também não mostrou toxicidade aguda.

4 CONCLUSÃO

A chalcona N-4'[(2E)-3-(4-clorofenil)-1-(fenil) prop-2-en-1-ona] alterou a locomoção do zebrafish (*Danio rerio*) adulto e não apresentou toxicidade aguda. Diante disto, outros testes deverão ser realizados a fim de investigar modelos farmacológicos de doenças que alteram o comportamento do animal.

REFERÊNCIAS

Arellano-Aguiar, O., Solis-Angeles, S., Serrano-García, L. ;, Morales-Sierra, E., Mendez-Serrano, A., & Montero-Montoya, R. (2015). Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose: Case Study. *J Fisheriessciences.Com*, 9(4), 052–062.

Ávila, H. P., Smânia, E. de F. A., Monache, F. D., & Smânia, A. (2008). Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(22), 9790–9794.

Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., ... Zon, L. I. (2020). Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*.

Cassar, S., Dunn, C., Olson, A., Buck, W., Fossey, S., Ramos, M. F., ... LeRoy, B. (2018). Inhibitors of nicotinamide phosphoribosyltransferase cause retinal damage in larval Zebrafish. *Toxicological Sciences*.

Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*.

De Esch, C., Slieker, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., & de Groot, D. (2012). Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing. A mini review. *Neurotoxicology and Teratology*.

Ekambaram, S. P., Perumal, S. S., & Pavadai, S. (2017). Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. *Inflammopharmacology*, 25(1), 147–158.

Estrada Reyes, R., Ubaldo Suárez, D., & Araujo Escalona, A. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*.

Ferreira, M. K. A., da Silva, A. W., Silva, F. C. O., Vieira Neto, A. E., Campos, A. R., Alves Rodrigues Santos, S. A., ... dos Santos, H. S. (2020). Anxiolytic-like effect of chalcone N-{4'[(2E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(phenyl)prop-2-en-1-one]} acetamide on adult zebrafish (*Danio rerio*): Involvement of the 5-HT system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(2), 505–511.

Gabriela Godinho Mello, Oliveira, G. A., Ferreira, B. G., Souza, I. F. C., Machado, M. R. F., Oliveira, F. M. de, ... Malaquias, K. da S. (2020). Evaluation of the effect of quantified residual endosulfan toxicity on curly lettuce (*Lactuca sativa* var. Crispa) on the development of Zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Braz. J. of Develop*, 6(7), 4303–4308.

Gasull, E. I., Silber, J. J., Blanco, S. E., Tomas, F., & Ferretti, F. H. (2000). A theoretical and experimental study of the formation mechanism of 4-X- chalcones by the Claisen-Schmidt reaction. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*.

Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2016). Zebrafish get connected: Investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity. *Toxics*.

Jat, D., Nahar, M., & Jain, J. (2018). A Study on Anxiety Related Behavioral Alterations in Zebra fish A Study of Anxiety Related Behavioural Alterations in Zebrafish. (November).

- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*.
- Lira, S. M., Dionísio, A. P., Holanda, M. O., Marques, C. G., Silva, G. S. da, Correa, L. C., ... Zocolo, G. J. (2020). Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. *Food Research International*, 127(May 2019).
- Liu, X., Lin, J., Zhang, Y., Peng, X., Guo, N., & Li, Q. (2016). Effects of diphenylhydantoin on locomotion and thigmotaxis of larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*.
- Magalhães, F. E. A., de Sousa, C. Á. P. B., Santos, S. A. A. R., Menezes, R. B., Batista, F. L. A., Abreu, Â. O., ... Campos, A. R. (2017). Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish*, 00(00), zeb.2017.1436.
- Nowakowska, Z. (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(2), 125–137.
- Resende, R. R; Soccol, C. R. (2015). *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações* (1st ed.). Capítulo 1: zebrafish como modelo para estudos comportamentais.
- Siebel, A. M. (2017). *Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais*.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*.
- Stewart, A. M., Cachat, J., Gaikwad, S., Robinson, K. S. L., Gebhardt, M., & Kalueff, A. V. (2013). Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. *Neurochemistry International*.