



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

CECÍLIA GUIMARÃES LEMOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSÍOLÍTICA DA ROBININA EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO**

FORTALEZA – CEARÁ

2022

CECÍLIA GUIMARÃES LEMOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DA ROBININA EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Química, do Centro de Ciências e Tecnologia, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do licenciado em Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jane Eire Silva Alencar de Menezes

FORTALEZA – CEARÁ

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Lemos, Cecilia Guimaraes.

Avaliação da Atividade Ansiolítica da
Robininaem Zebrafish (*Danio rerio*) Adulto
[recurso eletrônico] / Cecilia Guimaraes Lemos. -
2022.

40 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (GRADUAÇÃO) -
Universidade Estadual do Ceará, Centro de
Ciências e Tecnologia, Curso de Química,
Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof.e Dra. Jane Eire Silva
Alencar de Menezes.

1. Flavonóides. 2. Ansiedade. 3. Zebrafish.
I. Título

CECÍLIA GUIMARÃES LEMOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DA
ROBININA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

Monografia apresentada ao Curso de
Licenciatura em Química, do Centro de
Ciências e Tecnologia, da Universidade
Estadual do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do licenciado em Química.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Jane Eire Silva Alencar de Menezes (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof^a. Dr^a. Emanuela de Lima Rebouças
Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU

Ms. Maria Kueirislene Amâncio Ferreira
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Eu quero dedicar este trabalho e toda a pesquisa envolvida para todos os que me acompanharam nesta trajetória, família, amigos, colegas de trabalho e em especial a mim mesma, sem vocês este trabalho não seria uma conquista atingida.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Evânia Maria Guimarães Lemos, por sempre estar presente e não me permitir desistir, pelo amor e carinho.

Ao meu pai, Jorge dos Santos Lemos, por sempre me aconselhar a buscar conhecimento e ser uma excelente profissional.

A minhas irmãs, Carolina Guimarães Lemos e Clarissa Guimarães Lemos por sempre me fazer acreditarem que eu sou especial, inteligente e capaz.

A minha família, todo o amor que tenho por vocês não é capaz de agradecer por tudo o que fizeram por mim e por minha educação.

As minhas melhores amigas e colegas de trabalho, Vitória Ellen Lima Bantim, Milena Lira Rocha e Camile Rabelo de Medeiros, por sempre estarem comigo em todas as disciplinas, sempre serem a melhor dupla, trio e quarteto que qualquer um poderia querer.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Jane Eire Alencar de Menezes, por ser uma professora que valoriza o aluno e o trata com humanidade e respeito, por incentivar e acolher, por toda paciência, por todo o conhecimento que pude absorver, por toda alegria que traz ao ambiente.

A Prof^a. Dr^a. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, pela amostra fornecida, sem esta substância não seria possível realizar este trabalho.

A Maria Kueirislene Amâncio Ferreira, que por todos esses anos me ensinou muito do conhecimento empregado na realização desse trabalho, por toda paciência e dedicação que teve comigo, por me mostrar todo o mundo do zebrafish.

A todos os colegas que estiveram comigo nesses anos maravilhosos no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Antônio Wlisses, Larissa Santos, Italo Moura, Joyce Martins, Yanna Silva e Atilano Lucas. Muito obrigada por cada dia de experimento, cada falha, cada recomeço, cada contagem, cada vitória. Obrigado por todo o acolhimento e companheirismo.

Que Deus abençoe a todos a quem dedico este trabalho, e que conceda em suas vidas prosperidade e felicidade.

“Os jovens, especialmente as mulheres jovens, muitas vezes me pedem conselhos. Aqui está, *valeat quantum*. Não construa uma carreira científica em busca de fama ou dinheiro. Existem maneiras mais fáceis e melhores de alcançá-los. Empreenda-a apenas se nada mais o satisfizer; pois nada mais é provavelmente o que você receberá. Sua recompensa será o engrandecimento do horizonte enquanto você sobe. E se você conseguir essa recompensa, não pedirá outra.”

(Cecilia Payne-Gaposchkin)

RESUMO

Os flavonóides são metabólitos secundários que possuem atuação no sistema protetor da planta, são formados por dois anéis aromáticos ligados por um anel de pirano heterocíclico, as substituições realizadas nos anéis resultam em diversas classes, funções e propriedades de flavonóides. Presentes de forma abundante em diversos alimentos do cotidiano, em especial, vegetais, chás, frutas e até mesmo no vinho tinto. O potencial terapêutico dos flavonóides já é comprovado em diversos estudos, em destaque, sua propriedade antioxidante, deste modo há um grande interesse da indústria farmacêutica em suas atividades farmacológicas. Este trabalho tem como o objetivo avaliar o efeito ansiolítico do flavonóide robinina com sua ação através da via de neurotransmissão GABAérgica, utilizando como animal modelo o zebrafish (*Danio rerio*). Esse modelo é grande vantagem em termos econômicos, uma vez que, devido sua alta taxa de reprodução, bem como o zebrafish possui uma homologia genética com humanos de 70%, tornando-o um excelente modelo alternativo para avaliar a ação da droga através do seu comportamento. Foram realizados os testes de toxicidade aguda 96 horas, análise da atividade locomotora através do teste de campo aberto, análise do possível efeito ansiolítico utilizando o teste de claro escuro e o mecanismo com a finalidade de identificar a via de ação da droga também utilizando o teste claro escuro. A robinina demonstrou um promissor resultado ansiolítico, nas doses analisadas de (4; 20 e 40 mg/kg; 20 µL; *i.p*) frente ao zebrafish adulto, evidenciado pela alteração na locomoção dos animais, que sofreu diminuição, bem como por uma alta taxa de tempo de permanência na zona clara. Os resultados atestaram um comportamento semelhante a benzodiazepínicos, sugerindo a atuação pela via GABAérgica. Os resultados obtidos neste trabalho, deve contribuir para futuras pesquisas no ramo farmacológico envolvendo o flavonóide robinina.

Palavras-chave: Flavonóide, Ansiedade, Zebrafish

ABSTRAC

Flavonoids are secondary metabolites that act in the plant's protective system, they are formed by two aromatic rings connected by a heterocyclic pyran ring, the substitutions carried out in the rings result in different classes, functions and properties of flavonoids. They are abundantly present in various everyday foods, especially vegetables, teas, fruits and even red wine. The therapeutic potential of flavonoids is already proven in several studies, highlighting their antioxidant property, so there is great interest from the pharmaceutical industry in their pharmacological activities. This work aims to evaluate the anxiolytic effect of the flavonoid robinin with its action through the GABAergic neurotransmission pathway, using the zebrafish (*Danio rerio*) as a model animal. This model is a great advantage in economic terms, since, due to its high reproduction rate, the zebrafish has a genetic homology with humans of 70%, making it an excellent alternative model to evaluate the action of the drug through its behavior. The acute toxicity tests were performed at 96 hours, analysis of locomotor activity through the open field test, analysis of the possible anxiolytic effect using the light dark test and the mechanism in order to identify the drug's route of action also using the test Bright dark. Robinin showed a promising anxiolytic result, at the analyzed doses of (4; 20 and 40 mg/kg; 20 μ L; i.p) against the adult zebrafish, evidenced by the alteration in the locomotion of the animals, which suffered a decrease, as well as by a high-rate length of stay in the bright zone. The results attested to a behavior similar to benzodiazepines, suggesting the action by the GABAergic pathway. The results obtained in this work should contribute to future research in the pharmacological field involving the flavonoid robinin.

Keywords: Flavonoids, Anxiety, Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Planta arbustiva <i>Solanum asperum</i> , folhas.....	15
Figura 2 – Planta arbustiva <i>Solanum asperum</i> , flores.....	16
Figura 3 – Componentes Químicos presentes na <i>Solanum asperum</i>	17
Figura 4 – Estrutura Base para Flavonóides.....	19
Figura 5 – Estrutura de Classificação de Flavonóides.....	19
Figura 6 – Flavonóide Robinina.....	20
Figura 7 – Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	23
Figura 8 – Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	23
Figura 9 – Ependorf contendo 20,5 gramas de Robinina.....	25
Figura 10 – Teste de Campo Aberto da Robinina na dose de 40 mg/Kg.....	27
Figura 11 – Aplicação Intraperitoneal em Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	28
Figura 12 – Teste de Campo Aberto com Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	30
Figura 13 – Teste de Claro Escuro com Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	32
Figura 14 – Mecanismo GABAérgico com Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	<i>Solanum asperum</i>.....	15
3.2	Componentes Químicos e Atividades Biofarmacológicas.....	17
3.3	Flavonóides e o Potencial Terapêutico.....	19
3.4	Transtorno de Ansiedade.....	21
3.5	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	23
4	METODOLOGIA.....	25
4.1	Amostra.....	25
4.2	Zebrafish.....	26
4.3	Toxicidade Aguda 96h.....	26
4.4	Atividade Locomotora (Teste de Campo Aberto).....	26
4.5	Avaliação do Efeito Ansiolítico.....	27
4.6	Mecanismo de Ação pela via GABAérgica.....	28
4.7	Análise Estatística.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1	Toxicidade Aguda 96h.....	29
5.2	Atividade Locomotora (Teste de Campo Aberto).....	29
5.3	Avaliação do Efeito Ansiolítico.....	31
5.4	Mecanismo de Ação pela via GABAérgica.....	33
6	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO A – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E TESTE DE TOXICIDADE DO EUGENOL UTILIZANDO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) ADULTO.....	38
	ANEXO B – PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO EFEITO ANSIOLÍTICO DA CHALCONA (E) -3- (4- (DIMETILAMINO) FENIL) -1- (2- HIDROXIFENIL) PROP-2-EN-1-ONA EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO) ADULTO).....	39
	ANEXO C – CERTIFICADO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade aos tempos atuais os produtos naturais são utilizados em diversas funções, mas principalmente na medicina, iniciando como um paleativo caseiro, até o princípio ativo resultante de anos de pesquisa, sendo de modo popular, ensinado de geração para geração, ou de modo analisado, comprovado, a Química de Produtos Naturais vem cada vez mais crescendo exponencialmente (ATANASOV *et al.*, 2021).

Original de climas tropicais a família Solnacea é dividida em mais de 2000 espécies pelo mundo, sendo 1500 destas espécies do gênero *Solanum*, que por sua vez possui mais de 5000 epítetos (PINTO *et al.*, 2011). Atingindo a grande maioria dos locais onde se prolifera, a planta recebe muitas vezes denominações comuns a todas as contidas nesta categoria, em diversas línguas diferentes, que resgatam a linguagem utilizada por nativos ancestrais (SILVA *et al.*, 2008) Sendo uma planta arbustiva de pequeno porte, com uma bela coloração de verde, é comumente utilizada para decorar pequenos espaços de casas simples ou apenas existente em uma densa floresta com diversas outras espécies e gêneros.

O promissor gênero *Solanum*, não foge ao uso de produtos naturais como medicamentos caseiros, já possuindo registros em diversas populações para combater ou amenizar doenças associadas a fígado, pele e baço (MATOS, 1999). Ao serem realizadas investigações de seus potenciais na medicina familiar de produtos naturais é possível evidenciar um embasamento científico posterior à fama já existente, visto que este gênero detém o destaque da síntese natural de diversos e muitas vezes complexos metabólitos secundários que são rotineiramente associados à diversas atividades biológicas e farmacológicas comprovadas (PINTO *et al.*, 2011).

Segundo Pinto *et al.* (2011), os flavonóides são um dos metabólitos frequentemente isolados de plantas deste gênero. Neste trabalho iremos abordar sobre a Robinina, um flavonóide extraído de uma espécie do gênero *Solanum*, a *Solanum asperum*.

Os flavonóides são conhecidos por sua ação antioxidante e sua abundância, pois milhares deles estão presentes em diversos alimentos, como chás e vegetais comuns do dia a dia (MOURA, 2021).

De acordo com Sánchez (2018) estão associados à estes compostos químicos ações farmacológicas que podem ser utilizadas para combater doenças como diabetes, hipertensão e diversas enfermidades cardiovasculares. Possuindo um vasto potencial farmacológico a ser explorado, as atuais funções atribuídas aos flavonóides nos possibilitam a investigação em outros ramos.

Acometendo pessoas de todas as idades, principalmente adultos e adolescentes os transtornos mentais, em especial os diversos tipos de transtornos de ansiedade se tornaram um problema de saúde pública não só no Brasil mas sim no mundo (COSTA *et al.*, 2019). A partir de quanto a comum sensação de preocupação, medo e estresse natural do ser humano passa a atingir níveis anormais que impede o indivíduo de exercer seu cotidiano é classificado como um transtorno (SANTOS; SILVA; VASCONCELOS, 2021).

Ao atingir o nível de problema mundial e crescente de forma exponencial, a busca por tratamentos alternativos e de fontes abundantes cresce também, focando os olhares em uma classe de matéria prima que já possui comprovação e vai adquirindo cada vez mais espaço na indústria farmacêutica, a Química de Produtos Naturais, sendo ela como medicamentos fitoterápicos ou como substâncias isoladas de plantas e utilizadas como princípio ativo (SANTOS; SILVA; VASCONCELOS, 2021).

Não somente matéria prima, mas a aplicação de testes para a atestar a viabilidade de um fármaco são muitos e muitas vezes complexos e repetitivos. Apoiando-se no princípio dos 3 'R', Reduzir (do inglês *Reduce*), Refinamento (do inglês *Refinement*) e Substituição (do inglês *Replacement*), a busca por testes iniciais acessíveis e que possibilitem uma diminuição nos custos futuros também é uma problemática crescente (CASSAR, *et al.*, 2020).

Um modelo alternativo que vem ganhando espaço e credibilidade é o peixe Zebrafish (*Danio rerio*), possuindo alta homologia com o sistema nervoso humano, possuindo baixo custo de obtenção e manutenção, e apresentando resultados com completos e bem explorados (CASSAR *et al.*, 2020).

Desse modo, o presente trabalho pretende avaliar o potencial toxicológico e ansiolítico do metabolito secundário Robinina, isolado de *S. asperum*, frente à zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito ansiolítico do flavonóide robinina e a possível ação pela via GABAérgica

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão sobre a planta *Solanum asperum*;
- Verificar a toxicidade da robinina frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto;
- Analisar o efeito ansiolítico da amostra;
- Avaliar a possível ação via neurotransmissão GABAérgica.

3 REFERENCIAL TEÓRICA

3.1 *Solanum asperum*

Distribuída em áreas com zonas climáticas tropicais e subtropicais, centralizada na América do Sul, a família Solnaceae, se organiza em cerca de 2000 espécies que se subdividem em 95 gêneros, destes, a unidade taxômica que abrange boa parte das espécies e epítetos é a *Solanum* (PINTO *et al.*, 2011). As terras brasileiras contém cerca de 350 espécies com ocorrências catalogadas de *Solanum*, a população comum atribuí a palavra advinda do Tupi Guaraní, “Yubeba”, à todas as plantas que se encaixam no padrão físico, sem realizar destinação de espécies (SILVA *et al.*, 2008).

Atribuindo uma diferenciação de espécies, podemos chegar à *Solanum asperum* que pode ser comumente chamada de “coça-coça” ou “russara” devido ser uma planta repleta de pelos urticantes que em contato com a pele causam coceira (PINTO *et al.*, 2011). Contém características arbustivas, de pequeno porte, que possui longas folhas de coloração verde levemente escuras como observa-se na Figura 1, suas flores com formato rotado possuem cor branca com uma pequena concentração de amarelo ao meio demonstrado na Figura 2, sua floração ocorre durante o mês de dezembro, o ato de abertura da flor ocorre em ciclo diurno e sua polinização ocorre através de abelhas (REDE DE CATÁLOGOS POLÍNICOS, 2022).

Figura 1 – Planta arbustiva *Solanum asperum*, folhas.



Fonte: Rede de Catálogos Polínicos, 2022.

Figura 2 – Planta arbustiva *Solanum asperum*, flores.



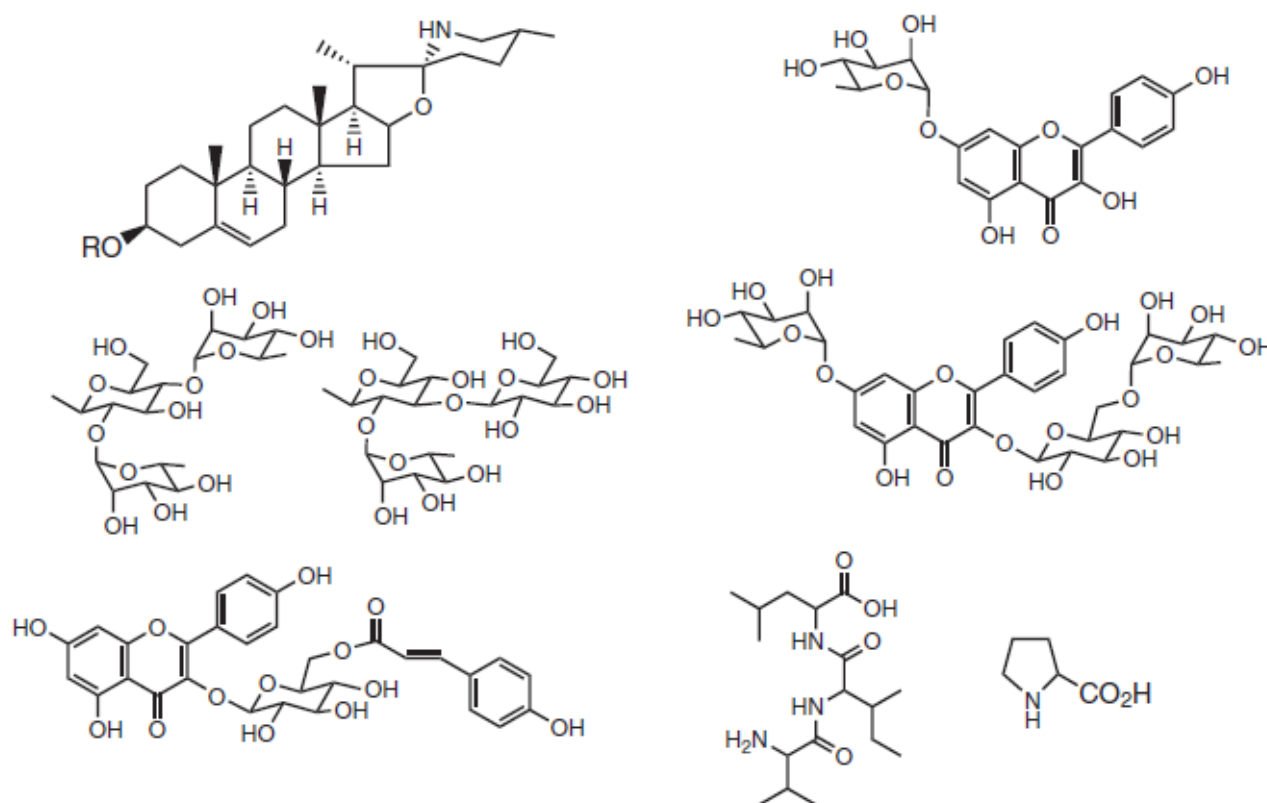
Fonte: Rede de Catálogos Polínicos, 2022.

As plantas presentes neste gênero possuem registros literários do seu uso abrangente na medicina popular como, por exemplo, um paleativo para doenças associadas ao fígado, baço e pele (MATOS, 1999). Estes usos caseiros podem receber embazamento visto que a capacidade de produzir metabólitos secundários complexos é um diferencial pelo qual o gênero *Solanum* é conhecido e estes compostos são comumente associados a atividades biofarmacológicas diversas (PINTO *et al.*, 2011).

3.2 Componentes Químicos e Atividades Biofarmacológicas

Possuindo a larga capacidade de biossintetizar esteroides, alcaloides e alguns compostos fenólicos como flavonas e flavonóis, tanto em sua forma livres ou em forma de heterosídeos, as plantas do gênero *Solanum* são de alto interesse farmacológico devido seu potencial terapêutico por sua atividade abrangente, podendo ser utilizado em diversos tratamentos desempenhando função citotóxica, anticâncer, anti-inflamatória, antiulcerogênica e moluscicida (PINTO *et al.*, 2011). Alguns dos componentes isolados da *S. asperum* são mostrados na Figura 3.

Figura 3 – Componentes Químicos presentes na *Solanum asperum*.



Fonte: PINTO *et al.*, 2011

Os compostos presentes na Figura 3 foram obtidos utilizando o fruto e as folhas de *S. Asperum*, por meio técnica de maceração com álcool etílico para a obtenção do extrato etanólico do material que foi submetido aos testes fitoquímicos e também à sucessivas cromatografias em coluna, cromatografia em gel de sílica, cromatografia de exclusão molecular entre outros tipos de cromatografias.

A prospecção fitoquímica realizada por Pinto *et al.* (2011) teve como resultado o isolamento dos glicoalcaloides, solamargina e solasonina, presentes no fruto da *S. asperum*, e também dos flavonoides tilirosídeo, 7-O- α -L-ramnopiranosil-kanferol e 3-O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosil-kanferol, um tripeptídeo e o aminoácido prolina que estavam contidos nas folhas da planta em estudo. Além destes também foi isolado o ácido eicosanoico.

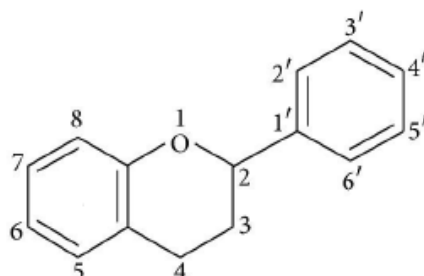
É notória a presença de diversas classes de compostos químicos que são abundantes na *S. asperum*, devido seu conhecido alto potencial antioxidante e largo uso na indústria farmacéutica, os flavonóides isolados por Pinto *et al.* (2011). são substâncias inéticas.

3.3 Flavonóides e o Potencial Terapêutico

Presentes em diversos tipos de chás, vegetais, sementes, caules, flores, frutas, especiarias e nozes, assim como no vinho tinto, os flavonóides são metabólitos secundários, muitas vezes complexos, que possuem inúmeras funções e grande abundância no reino plantae, sendo mais de 9000 flavonóides identificados em espécies vegetais (MOURA, 2021). Sua distribuição se concentra em angiospermas, em principal pertencentes as famílias Rutaceae, Polygonaceae, Compositae e Umbelliferae, porém sendo massivamente presente em outras famílias e espécies (ROCHA, 2022).

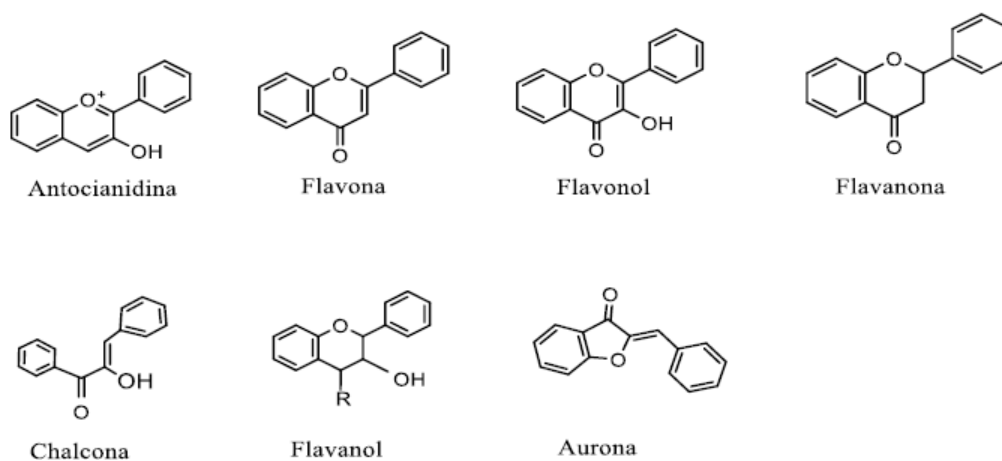
A base estrutural dos flavonóides consiste em um esqueleto contendo 15 átomos de carbono, sendo estes dois anéis benzenicos ligados por um anel de pirano heterocíclico, podendo ser observado na Figura 4 (MOURA, 2021). Suas classificações variam de acordo com a posição dos anéis e as substituições empregadas nos mesmos, sendo organizadas em Flavonas, Isoflavonas, Flavonóis, Flavanonas, Flavanóis e Antocianidinas (MOURA, 2021), como visto na Figura 5.

Figura 4 – Estrutura Base para Flavonóides.



Fonte: MOURA, 2021.

Figura 5 – Estrutura de Classificação de Flavonóides.



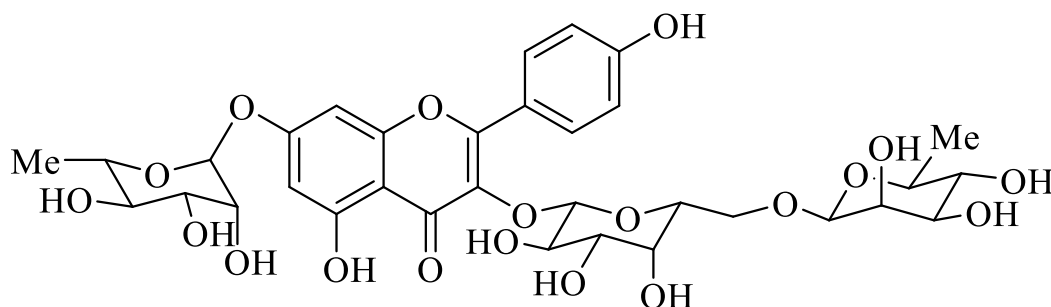
Fonte: ROCHA, 2022.

A necessidade de caracterização e subdivisão de flavonóides se observa ao ser mais efetivo no estudo e aprofundamento sobre suas estruturas e atividades antioxidantes que possui um vasto leque de utilização, sendo aplicado desde a conservação de alimentos como na nutrição animal e humana, assim como em larga escala pela indústria farmacéutica (SANCHÉZ, 2018).

A propriedade antioxidante presente em flavonóides tem diversos usos no uso direto durante o tratamento e na profilaxia de patologias cardíacas, vasculares, câncer, arterioesclerose, diabetes, hipertensão, gastrointestinais entre outras diversas, devido a necessidade do corpo humano de manter equilibrado o nível de oxidantes e antioxidantes (SANCHÉZ, 2018).

Neste trabalho iremos utilizar o flavonóide Robinina (Figura 6), extraído da *S. asperum*, possuindo 33 átomos de carbono, 40 átomos de hidrogênio e 3 átomos de oxigênio, contabilizando uma massa molecular de 740,22 gramas/mol. Sua estrutura se assemelha fortemente à categoria das flavonas.

Figura 6 – Flavonóide Robinina.



Fonte: Próprio Autor, 2022.

3.4 Transtorno de Ansiedade

O termo ansiedade se refere ao conjunto de sensações de preocupação, nervosismo, estresse e medo, de forma moderada é uma resposta do nosso corpo a situações de perigo ou possível perigo, porém ao observar que estas sensações abalam a vida do indivíduo, impedindo a realização de tarefas cotidianas ou a impossibilidade de desenvolvimento, passa-se a considerar um transtorno de ansiedade, visto que etimologicamente, a palavra transtorno se remete a incômodos e contratempos (SANTOS; SILVA; VASCONCELOS, 2021).

O transtorno de ansiedade, segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) não é apenas um único transtorno, na realidade engloba diversos outros como: agorafobia, transtorno de pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, fobia social, transtorno de estresse pós-traumático e transtorno de ansiedade generalizada (COSTA *et al.*, 2019). Atingindo milhares de brasileiros todos os anos, o diagnóstico de algum tipo de transtorno mental, em especial relacionados a ansiedade e depressão apresentam crescente alta, tornando-se uma mal de alta frequência entre adultos, adolescentes e até mesmo idosos e crianças, evidenciando que não há idade para o acometimento desta enfermidade (LEMOS, *et al.*, 2021).

A problemática da ansiedade não atinge somente o Brasil, tomando proporções mundiais, cerca de 87 estudos feitos em 44 países no ano de 2013 expõem a prevalência dos transtornos de ansiedade em 7,3%, estimando-se que mais de 450 milhões de pessoas são abaladas emocionalmente com algum tipo de transtorno mental (COSTA *et al.*, 2019). Ainda concordando com o autor, tendo em mente que são mais de um tipo de transtorno, diferem nos contextos, objetos e pessoas que engatilham os sintomas como medo, comportamento de esquiva, suor excessivo, tremor, boca seca, pânico generalizado entre outros.

Aprofundando-se mais na problemática no Brasil, é observado que 9% da população possui os sintomas de transtornos de ansiedade, prevalecendo em mulheres cerca de duas vezes mais que em homens, atingindo o patamar de problema de saúde pública (SANTOS; SILVA; VASCONCELOS, 2021).

De acordo com Mangolini, Andrade e Wang (2019), estudos recentes demonstram o impacto destes transtornos na sociedade, sendo cada vez mais frequente e precoce na vida de muitos indivíduos, gerando o questionamento de causas comuns e casos isolados, apontando para o contrário, o impacto da sociedade nos transtornos mentais.

A implicação de que a rotina acelerada, aumenta cada vez mais sua velocidade com o passar dos anos e séculos, seja um principal fator para desencadear transtornos de ansiedade (COSTA *et al.*, 2019).

Com o aumento de diagnósticos, uma consequência natural é o aumento de prescrições e do uso de medicamentos ansiolíticos, que combatem o efeito da ansiedade excessiva, e com isto, não somente a busca por novas substâncias com esta propriedade, mas substâncias que possam ser matérias primas seguras e com abundância, o que engloba o uso de plantas medicinais como fitoterapicos e também como princípio ativo para um fármaco (SANTOS; SILVA; VASCONCELOS, 2021).

Além da busca por nova matéria prima, temos também a problemática da realização de testes, pois além da química computacional, é necessário realizar também testes *in vivo* para atestar a segurança necessária para prosseguir para outras etapas dos testes clínicos até estar disponível para consumo. Para estes teste é clássico o uso de roedores como etapa inicial, porém, pode ser realizado o teste com um novo animal modelo, o zebrafish (*Danio rerio*), deixando claro que este teste não substitui o teste em roedor mas visa diminuir os custos atestando primariamente a segurança não clínica da amostra e a eficácia do fármaco em doses padronizadas.

3.5 Zebrafish (*Danio rerio*)

Nativo das regiões asiáticas, o Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe original do sudeste do Himalaia, pertencente à infraclasse Teleostei (LOPES, 2021). Popularmente conhecido como “paulistinha”, o zebrafish pode atingir um tamanho de médio 3 a 4 cm quando adulto, sua aparência se concentra em suas vistosas listras contínuas azul escuro em contraste com o amarelo em tons mais fechados como pode-se observar na Figuras 7 e 8, apresentando um claro dimorfismo sexual, onde os animais machos da espécie possuem uma estatura menor e mais delgada em comparação a fêmea, que por sua vez possui um corpo maior e uma barriga mais avantajada (CASSAR, 2020). A espécie recebe um destaque por sua satisfatória taxa reprodutiva, onde cada fêmea pode chegar a expelir 200 ovos/postura (KIMMEL *et al.*, 1995).

Figura 7 – Zebrafish (*Danio rerio*).



Fonte: Próprio Autor, 2022.

Figura 8 – Zebrafish (*Danio rerio*).



Fonte: Próprio Autor, 2018.

As pesquisas utilizando Zebrafish foram iniciadas na década de 1980, onde o peixe ainda atendia por *Brachidanio rerio*, não demorou até que fosse observado os resultados promissores e as diversas vantagens atreladas à este modelo alternativo (LOPES, 2021). O ramo de maior destaque utilizando zebrafish se concentra na embriologia, onde esclare-se que há sete estágios bem definidos, sendo eles as etapas do zigoto, clivagem, blástula, segmentação, faríngulas e a aparecimento da larva (GRUNWAL; EISEN, 2002). Além das promissoras pesquisas utilizando a embriologia do zebrafish, o animal em sua fase adulta também é largamente utilizado em diversos testes *in vivo* envolvendo a toxicologia e biologia da espécie (LOPES, 2021).

Peixes pertencentes a espécie teleóstea demonstraram, em diversos estudos neuroanatômicos e neurofisiológicos, estruturas homólogas a estruturas presentes em mamíferos (LOPES, 2021). O genoma já sequenciado do zebrafish apresentou uma homologia de 70% genética nos seus receptores de neurotransmissores com a espécie humana, podendo ser considerado um modelo significativo (LEMOS, 2021).

Juntamente com sua alta porcentagem de homologia, outras vantagens da utilização do zebrafish em um teste preliminar é o seu baixo custo de obtenção e manutenção, chegando a ser 10 vezes menor que o do roedor, seu rápido e numeroso ciclo de reprodução, seu tamanho pequeno e de fácil manuseio e seu desenvolvimento embrionário transparente (FERREIRA, *et al.*, 2021). Deste modo é notório a asceção do zebrafish como modelo alternativo para o uso de animais em pesquisas envolvendo a neurociência, em principal, modelos de avaliação comportamental.

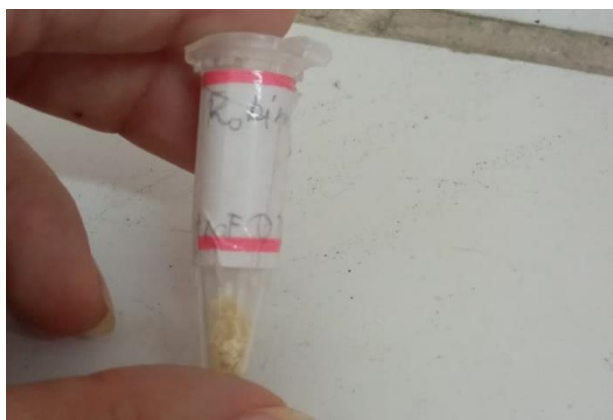
4 METODOLOGIA

Para a realização dos testes, utilizou-se a amostra de Robinina que foi extraída da espécie *S. asperum*, esta foi fornecida pela profa. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, coordenadora do Laboratório de produtos Naturais e Marinhos, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizada em Fortaleza, Ceará, Brasil.

4.1 Amostra

A Robinina (Figura 9) recebida pesava 20,5 gramas e apresentava uma coloração bege, de tons amarelados. A preparação da amostra procedeu-se pesando 2 gramas do total, solubilizou-se em 60 μ L DMSO 3% e posteriormente diluiu em 1940 μ L de água destilada, obtendo a solução mãe da amostra com a concentração de 1,0 mg/mL. Para a obter as concentrações padrão de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL, diluiu-se 100 μ L de amostra mãe em 900 μ L de DMSO 3% para obter a concentração de 01 mg/mL, 500 μ L foram diluídos utilizando 500 μ L de DMSO 3% obtendo a concentração de 0,5 mg/mL. Para melhor assimilação de resultados e de doses caso seja utilizado em função de fármaco, adota-se as doses padrão de 4; 20 e 40 mg/kg para as respectivas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL.

Figura 9 – Ependorf contendo 20,5 gramas de Robinina.



Fonte: Próprio Autor, 2022

4.2 Zebrafish

Utilizou-se Zebrafish (*D. rerio*) adulto, selvagens de ambos os sexos com idades aproximadas de 60-90 dias, com um peso de cerca de 0,4 gramas de um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil), os peixes foram preservados em aquários de vidro (n=5/L), com água tratada com anti-cloro em uma temperatura média de 25 °C.

Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará, sob o protocolo nº 04983945/2021. Ao finalizar os experimentos, os animais receberam a eutanásia por meio de congelamento, imersos em água com a temperatura variando de 2 a 4 °C, durante 10 minutos até a perda dos movimentos operculares.

4.3 Toxicidade Aguda 96h

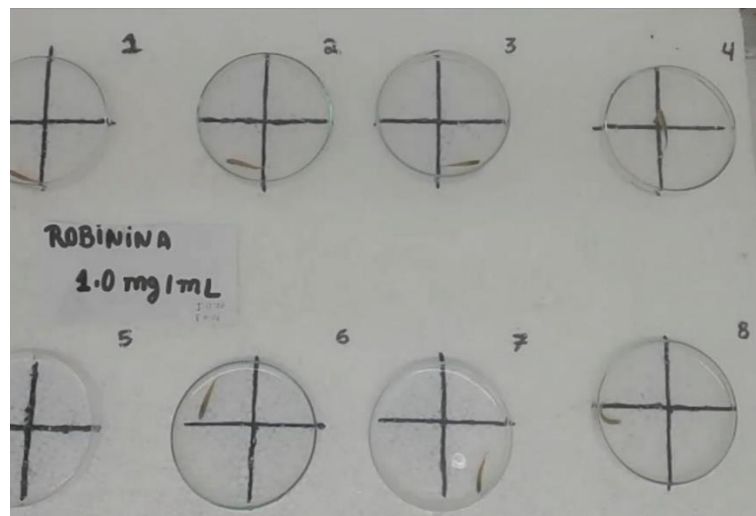
o teste de toxicidade aguda de 96 horas, padronizado pela Organização de Cooperação Econômica e Método Padrão de Desenvolvimento (OECD, 1992), a fim de determinar a LC₅₀-96h. Foram utilizados os animais em grupos (n=6/grupo) para cada dose e tratados via intraperitoneal, com 20 µL da amostra Robinina nas doses padronizadas de (4; 20 e 40 mg/Kg; 20 µL; *i.p*) e veículo (DMSO 3%). Verificando a mortalidade a cada 12 horas, após 96 horas de análise, o número de Zebrafish mortos foram submetidos à análise estatística, estimando-se a Dose Letal para matar 50% (DL₅₀).

4.4 Atividade Locomotora (Teste de Campo Aberto)

A importância do teste de campo aberto se materializa para avaliar se ocorreu alteração no sistema locomotor, seja esta por sedação ou relaxamento muscular dos animais que receberam o tratamento (MAGALHÃES *et al.*, 2017). O grupo de zebrafish (n=6/grupo) receberam aplicação via intraperitoneal, com a amostra robinina (4; 20 e 40 mg/kg; 20 µL, *i.p*), outro grupo recebeu a mesma quantidade de 20 µL com o veículo (DMSO 3%) utilizado.

Após 30 minutos da administração da amostra, os animais foram posicionados em placas de petri medindo 10 x 15 cm marcadas com quadrantes (Figura 10), para que possa ser analisado a atividade locomotora admitindo como fator principal a quantidade de cruzamentos de linha (CL), que é o ato do animal de atravessar de um quadrante para outro. O cálculo da porcentagem de cruzamentos de linha (CL%) é realizada analisando individualmente cada animal em um período de 5 minutos, utilizando o cruzamento de linha do grupo veículo como 100%.

Figura 10 – Teste de Campo Aberto da Robinina na dose de 40 mg/Kg



Fonte: Próprio Autor, 2022

4.5 Avaliação do Efeito Ansiolítico

Para a avaliação do efeito ansiolítico realizou-se o teste de claro escuro, onde os animais (n=6/grupo) receberam o tratamento de 20 μ L da amostra, via intraperitoneal (Figura 11), nas doses padrozinadas de (4; 20 e 40mg/Kg; 20 μ L; *i.p*) , veículo (DMSO 3%) ou diazepam (DPZ; 4mg/Kg; 20 μ L; *i.p*) atuando como controle positivo, ou seja, o resultado esperado aproximado. Após 30 minutos da administração dos tratamentos, os animais são colocados em aquários de vidro medindo 30 x 15 x 20 cm, contendo cerca de 3 cm de água tratada com anti cloro, que possuem um lado escuro e um lado claro. O nível baixo da água é intencional para induzir ao animal um certo nível de ansiedade além do natural à espécie (GEBAUER *et al.*, 2011).

Os parâmetros são contabilizados na avaliação durante 5 minutos, sendo observados: a latência, os cruzamentos e o tempo de permanência na zona clara. Animais do grupo veículo foram considerados como 100% para o cálculo de percentual de permanência na zona clara.

Figura 11 – Aplicação intraperitoneal em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto



Fonte: Próprio Autor, 2022

4.6 Mecanismo de Ação pela via GABAérgica

Para a realização da investigação da via pela qual irá ser realizada a ação da amostra em estudo, utilizou-se a menor dose efetiva, sendo esta a de 4 mg/Kg. O antagonista utilizado para bloquear as vias do sistema GABAérgico foi o flumazenil (FMZ). Os grupos de zebrafish ($n=6/\text{grupo}$), receberam o tratamento, via intraperitoneal, de 20 μL do antagonista utilizado para bloquear a via do mecanismo flumazenil (FMZ; 4 mg/Kg; 20 μL ; *i.p*). Após 15 minutos da primeira aplicação, os animais receberam a segunda aplicação contendo 20 μL da amostra (4 mg/Kg; 20 μL ; *i.p*) e após 30 minutos foram levados para análise individual no teste claro escuro durante 5 minutos sendo contabilizado os mesmos fatores de latência, cruzamentos e tempo de permanência na zona clara. Os fatores do efeito ansiolítico, permanência na zona clara em segundos foram mensurados utilizando o grupo veículo como 100%

4.7 Análise Estatística

As análises são realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism v. 5.01., atingindo o nível de significância estatística de 95% ($p<0,05$). A metodologia de análise utilizada para a comparação entre os parâmetros de avaliação para cada teste e suas respectivas doses é a análise de variância (ANOVA unidirecional). Mensura-se os resultados através dos valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo ($n=6/\text{grupo}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Toxicidade Aguda 96h

A toxicidade Aguda de 96 horas atesta a segurança não clínica da amostra possibilitando a continuidade de testes em animais para aprofundar o conhecimento do objeto de estudo, visto que não foi primariamente tóxica em 96 horas de análise, utilizando um modelo alternativo. Após o período de 96 horas, a finalização do teste demonstrou que o flavonóide robinina não foi tóxico frente ao zebrafish até 96h, visto que a quantidade de animais mortos foi inferior a Dose Letal estimada para matar 50% (DL₅₀).

5.2 Atividade Locomotora (Teste de Campo Aberto)

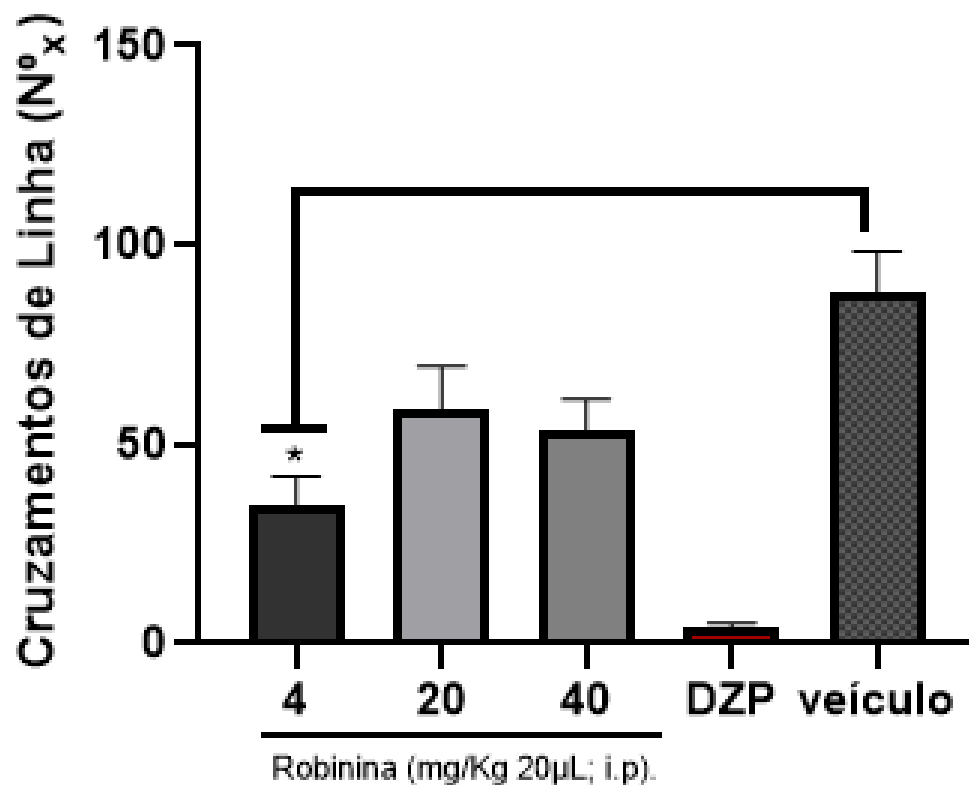
A atividade locomotora tem o princípio de avaliar a intensidade da ação da droga que possui possibilidade de atuar sob o sistema nervoso central causando o comprometimento do sistema locomotor ou não do animal utilizado para teste, no caso o zebrafish (*D. rerio*) adulto, podendo ser investigada durante o Teste de Campo Aberto tanto em placas de Petri como em aquários modestos (MILDENBERGER; TAYLOR; WOLF, 2017).

Apesar do comprometimento da locomoção no animal, é necessário a realização de mais testes de maior especificidade para investigação da ação que está ocorrendo e por qual via de neuroreceptores está ocorrendo o efeito causado pela droga administrada.

Após o tratamento com as 3 doses da amostra robinina (4; 20 e 40 mg/Kg) é possível observar a diminuição da atividade locomotora dos animais. A dose que demonstrou maior significância foi a menor dose de 4 mg/Kg como pode-se observar na Figura 12, apesar de que ambas as outras doses 20 e 40 mg/Kg também causaram certa diminuição na colomoção dos animais, em comparação com o veículo onde é notório um maior número de cruzamentos. A evidente baixa na locomoção dos animais indica um possível efeito no sistema nervoso central como observado em Guedes, et al., 2022, onde foi atestado através do comprometimento do sistema locomotor, o efeito ansiolítico da droga em estudo.

A possível ação da robinina no sistema nervoso central do zebrafish carece de mais testes que apenas o Teste de Campo Aberto, por este motivo é necessário realizar o Teste Claro Escuro, a fim de investigar o possível efeito ansiolítico.

Figura 12 – Teste de Campo Aberto com Zebrafish (*Danio rerio*) adulto



Fonte: Próprio Autor, 2022

5.3 Avaliação Efeito Ansiolítico

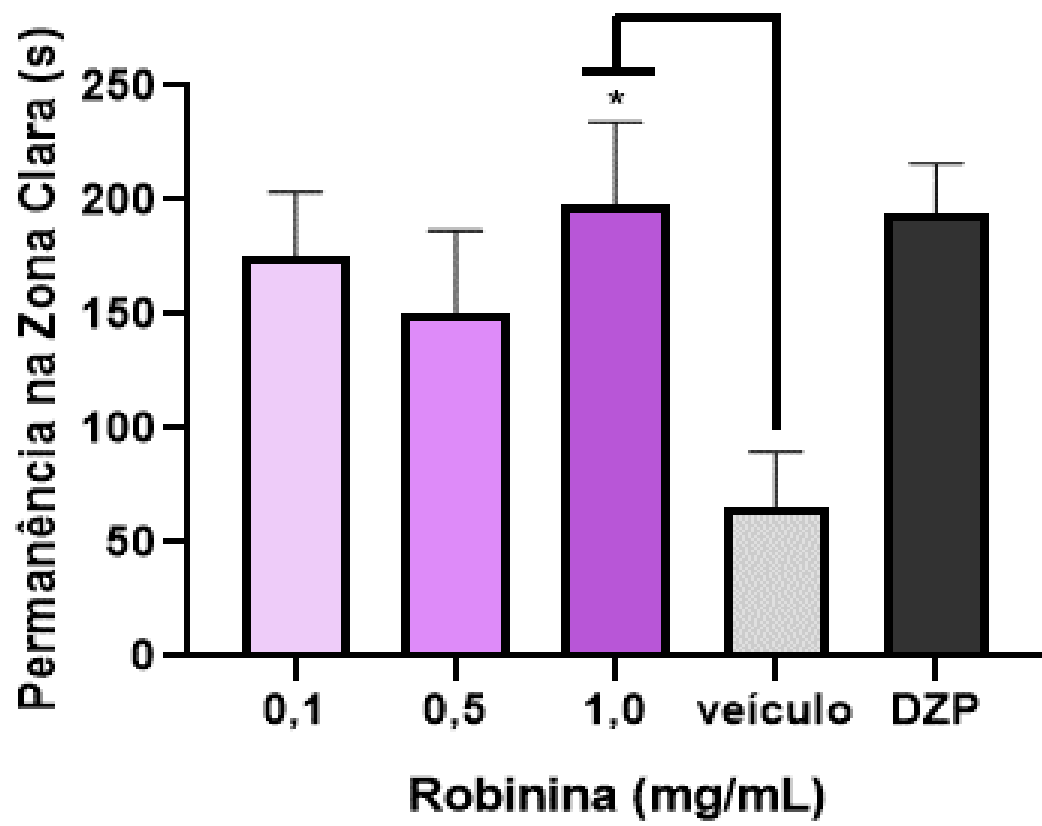
A realização do Teste de Claro Escuro torna-se necessária frente a predileção da espécie do zebrafish (*D. rerio*) adulto por zonas escuras, visto que é um peixe de comportamento ansioso natural, a possível predileção por uma zona clara indicaria um estado de entorpecimento ou relaxamento maior do que o comum, logo, induzido, causado (GEBAUER *et al.*, 2011).

Deste modo ao realizar um experimento de claro escuro espera-se que o animal naturalmente ansioso e adepto de uma zona escura, se sinta relaxado ou dopado, após a aplicação da amostra, o suficiente para ter afeição pelo claro, passando grande parte do seu tempo na zona clara do aquário. Do contrário estaria exibindo seu comportamento ansioso natural com aversão à zonas mais luminosas.

Ao analisar o gráfico que expõe os resultados estatísticos do teste (Figura 13), é possível observar o ínfimo tempo de zona clara que os animais do grupo veículo possuem, visto que não possuem nenhum tratamento além do material no qual a amostra é veiculada (DMSO 3%). Deve-se também fazer a comparação entre as 3 doses (4; 20 e 40 mg/Kg) com o controle positivo, o diazepam (DZP) devido seu semelhante comportamento, o que pode agir como confirmação da ação ansiolítica da robinina em comparação a Silva, *et al.*, 2020, onde o objeto de estudo também obteve comportamento semelhante ao controle positivo frente ao zebrafish.

Apesar do evidente efeito ansiolítico da amostra utilizada é necessário a investigação da via pela qual a robinina irá atuar nos neuroreceptores do zebrafish, com a finalidade de assimilar como a droga atua no sistema nervoso central. Vale citar que mesmo após estes testes é necessário a bateria comum de testes em roedores entre outros parâmetros. Mesmo que todas as doses possibilitaram este comportamento de maior tempo de permanência na zona clara, para a continuação dos testes é necessário somente a menor dose efetiva, visto que utiliza menos matéria prima e possui o mesmo efeito para atestar sua eficácia, deste modo utilizou-se a dose de 4 mg/Kg.

Figura 13 – Teste de Claro Escuro com Zebrafish (*Danio rerio*) adulto



Fonte: Próprio Autor, 2022

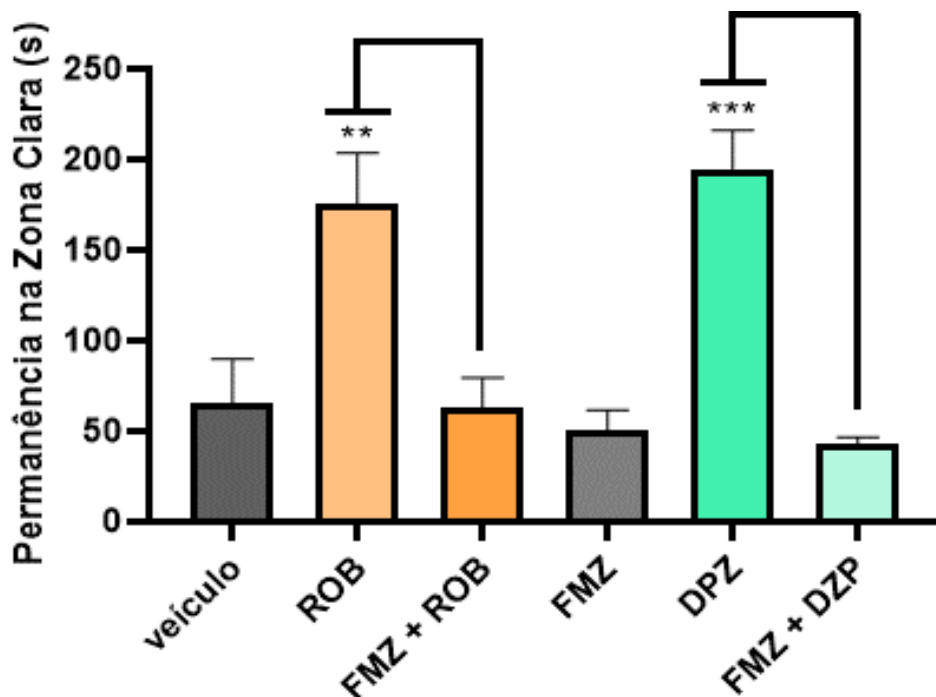
5.4 Mecanismo pela via GABAérgica

Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) esta presente na associação do principal neurotransmissor ao complexo receptor do tipo A, por esta via, denominada GABAérgica agem muitos benzodiazepínicos como o diazepam, que provocam efeitos sedativos, hipnóticos e principalmente ansiolíticos (SEELHAMMER *et al.*, 2018).

Para investigar se esta é a via que a droga veicula seu efeito ansiolítico é necessário utilizar um antagonista, uma substância que ira se ligar aos receptores impedindo que a amostra se ligue aos mesmo, impendendo assim, seu efeito. O antagonista utilizado foi o flumazenil (FMZ; 4 mg/Kg; 20 μ L; *i.p.*).

Observando a Figura 14 com a representação dos resultados obitdos, torna-se evidente a semelhança de comportamentos da robinina com o controle positivo, diazepam. Quando utilizados sozinhos tanto a amostra quando o DZP possuem alto tempo de permanência na zona clara, porém ao serem associados com o antagonista seu efeito diminuí de forma brusca e se assemelha ao veículo, que atua como controle negativo, em suma, o antagonista FMZ bloqueia a ação da amostra do mesmo modo como bloqueia a ação do DZP, impedindo o seu efeito ansiolítico, atestando propagação da amostra através da via GABAérgica.

Figura 14 – Mecanismo GABAérgico com Zebrafish (*Danio rerio*) adulto



Em comparação ao trabalho de Silva, *et al.*, 2020, observa-se a semelhança do comportamento da amostra em estudo e do controle positivo, onde ambos agem da mesma maneira tendo sua ação bloqueada pelo antagonista (FMZ), evidenciado através do tempo de permanência na zona clara.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos e analisados apresentam dados, que atestam mais uma vez a eficácia do zebrafish (*D. rerio*) como um modelo alternativo para testes em animais, evidenciam também que o flavonóide extraído da planta *Solanum asperum*, a robinina não ofereceu riscos aos animais, não sendo tóxica até 96h de análise frente a zebrafisha adulto. Pode-se afirmar também que, a amostra causa alterações no sistema locomotor do animal em suas 3 doses utilizadas, 4, 20 e 40 mg/Kg, diminuindo a locomoção dos animais. Os resultados obtidos evidenciam que, há um possível efeito ansiolítico comparável ao efeito de benzodiazepínicos.

Visto o efeito ansiolítico apresentado pela robinina torna-se interessante a realização de futuras investigações aprofundando-se na ação GABAérgica promissora para a formulação de futuros fármacos. Este trabalho contribui para um esclarecimento a cerca de propriedades sobre o uso de zebrafish como animal modelo e sobre o efeito ansiolítico e o mecanismo da Robinina.

REFERÊNCIAS

- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 28 mar. 2021.
- CASSAR, S., *et al.* Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 33, p. 95-118, 2020.
- COSTA, C. O. Da, *et al.* Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*. Rio de Janeiro, 2019. **Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro**. abr-jun 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0047-2085000000232> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpsiq/a/PSrDy4ZFSGDCzNgJfJwVRxz/?lang=pt&format=html> Acesso em: 10 mai. 2022.
- FERREIRA, M. K., *et al.* Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of adult zebrafish. **Epilepsy and n**, v. 117, p. 107881, 2021.
- GEBAUER, D., *et al.* Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 99 p. 480-486, 2011.
- GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. *Nature reviews*. **Genetics**, v.3, p. 717-724, 2002.
- GUEDES, J. M., *et al.* Anxiolytic-like Effect in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) through GABAergic System and Molecular Docking Study of Chalcone (E)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one. **Biointerface Research in Applied Chemistry: open-access journal**, v.13, n. 1, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.33263/BRIAC131.015> Disponível em: <https://biointerfaceresearch.com/wp-content/uploads/2022/01/BRIAC131.015.pdf> Acesso em: 20 jun. 2022.
- KIMMEL, C., *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn**, v. 203, n.3, p. 253-310, 1995.
- LEMOES, C. G., *et al.* Avaliação da atividade locomotora e teste de toxicidade do eugenol utilizando zebrafish (*Danio rerio*) adulto. **Ambiente: gestão e desenvolvimento**, 2021, p. 67-70, ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.24979/ambiente.v11i1.931> Disponível em: <https://periodicos.uerr.edu.br/index.php/ambiente/article/view/931> Acesso em: 3 jun. 2022.
- LOPES, F. F. **O Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo translacional para estudos comportamentais: uma revisão sistemática integrativa**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.
- MANGOLINI, V. I.; ANDRADE L. H.; WANG, Y-P. Epidemiologia dos transtornos de ansiedade em regiões do Brasil: uma revisão de literatura. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 98, n. 6, p. 415-422, nov./dez. 2019.
- Matos, F. J. A.; *Plantas da Medicina Popular do Nordeste*, **Edições UFC**, Fortaleza, 1999.
- MILDENBERGER, T. K.; TAYLOR, M. H.; WOLFF, M.. TROPFISHR: an R package for fisheries analysis with length-frequency data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n.1, p.1520-1527, 2017.
- MOURA, E. P. de. **Estudo *in silico* de flavonóides e compostos análogos pertencentes à família asteraceae contra a doença de alzheimer**. 2021. Tese

(Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

PINTO, F. Das C. L., *et al.* GLICOALCALOIDES ANTIFÚNGICOS, FLAVONOIDES E OUTROS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Solanum asperum*. **Química Nova**, São Paulo, v.34, n. 2, p. 284-288, nov. 2011.

REDE DE CATÁLOGOS POLÍNICOS ONLINE. São Paulo, 2022. Disponível em: <http://chaves.rcpol.org.br/profile/species/eco/eco:pt-BR:Solanum%20asperum> Acesso em: 3 jun. 2022.

ROCHA, D. M. S. **Relación de la estructura química de los flavonoides con la actividad antioxidante**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Farmacêutica) – Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central Del Ecuador, Quito, 2022.

SANCHEZ, M. J. A. **Determinación de la actividad antioxidante de los flavonoides mediante análisis QSAR**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Escuela de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencia y Tecnología, Cuenca, 2018.

SANTOS, R. da S.; SILVA, S. de S.; VASCONCELOS, T. C. L. de. Aplicação de plantas medicinais no tratamento da ansiedade: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 5, p. 52060-52074, mai. 2021.

SEELHAMMER, T., *et al.* O uso de flumazenil para depressão respiratória associada ao benzodiazepínico na recuperação pós-anestésica: riscos e resultados. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 68, n. 2, p. 329-335, 2018

SILVA, A. W. da., *et al.* Anxiolytic-like effect of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem, Meliaceae) bark on adult zebrafish (*Danio rerio*): participation of the Serotonergic and GABAergic systems. **MedCrave: step into the world of research**, Budapeste, v. 8, n. 4, ago. 2020, DOI: [10.15406/ppij.2020.08.00303](https://doi.org/10.15406/ppij.2020.08.00303) Disponível em: <https://medcraveonline.com/PPIJ/anxiolytic-like-effect-of-azadirachta-indica-a-juss-neem-meliaceae-bark-on-adult-zebrafish-danio-rerio-participation-of-the-serotonergic-and-gabaergic-systems.html> Acesso em: 20 jun. 2022.

SILVA, T. M. S., *et al.* Steroidal Glycoalkaloids and Molluscicidal Activity of *Solanum asperum* Rich. Fruits. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 1048-1052, 2008.

ANEXO A – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E TESTE DE TOXICIDADE DO EUGENOL UTILIZANDO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) ADULTO.



Ambiente: Gestão e Desenvolvimento - ISSN 1981-4121
Dossiê: I Simpósio de Meio Ambiente e Energia (SiMAE)

Avaliação da atividade locomotora e teste de toxicidade do eugenol utilizando zebrafish (danio rerio) adulto.

Evaluation of locomotor activity and eugenol toxicity test using adult zebrafish (danio rerio).

DOI: <https://doi.org/10.24979/ambiente.v1i1.931>

Cecília Guimarães Lemos - Universidade Estadual do Ceará <https://orcid.org/0000-0002-6663-049X>

Jean Parcell Costa do Vale - Universidade Estadual Vale do Acaraú <https://orcid.org/0000-0001-5598-8886>

Maria Kueirislene Amâncio Femeira - Universidade Estadual do Ceará <https://orcid.org/0000-0002-4270-8109>

Antônio Wlisses da Silva - Universidade Estadual do Ceará <https://orcid.org/0000-0002-1686-1644>

Jane Eire Silva Alencar de Menezes - Universidade Estadual do Ceará <https://orcid.org/0000-0001-9632-5464>

Helcio Silva dos Santos - Universidade Estadual Vale do Acaraú <https://orcid.org/0000-0001-5527-164X>

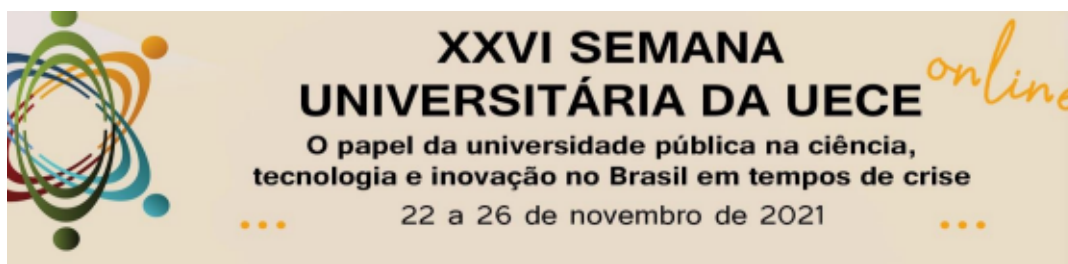
RESUMO: Eugenol é o componente majoritário do óleo essencial do cravo (*Syzygium aromaticum*). Possui efeito no sistema nervoso central em camundongos e ratos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade locomotora e toxicidade aguda do eugenol utilizando zebrafish adulto. Para o teste de campo aberto, os zebrafish receberam doses do eugenol (4, 20 e 40 mg/kg); DMSO 3% e DZP 40mg/kg. Após 30 min, os animais foram adicionados em placas de Petri, e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de CL (5 min). Para avaliação da toxicidade, os animais receberam os mesmos tratamentos e após 96h de análise, os valores obtidos com o número de ZFa mortos foram submetidos à análise estatística para estimar DL para matar 50%. O eugenol alterou o sistema locomotor do zebrafish e não foi tóxico até 96h de análise. A ausência de toxicidade e a alteração no sistema locomotor do zebrafish mostra a segurança não clínica do eugenol e nos permite dar continuidade nos testes e investigar possível efeito ansiolítico e anticonvulsivante.

Palavras-chave: Eugenol, sistema locomotor, zebrafish, Locomoção.

ABSTRACT: Eugenol is the major component of the essential oil of cloves (*Syzygium aromaticum*). It has an effect on the central nervous system in mice and rats. The present study aimed to evaluate the locomotor activity and acute toxicity of eugenol using adult zebrafish. For the open field test, zebrafish received doses of eugenol (4, 20 and 40 mg / kg); DMSO 3% and DZP 40mg / kg. After 30 min, the animals were added to Petri dishes, and locomotor activity was analyzed by counting the number of CL (5 min). For toxicity assessment, the animals received the same treatments and after 96 hours of analysis, the values obtained with the number of ZFa killed were subjected to statistical analysis to estimate DL to kill 50%. Eugenol altered the zebrafish's locomotor system and was not toxic until 96 hours of analysis. The absence of toxicity and the alteration in the zebrafish locomotor system shows the non-clinical safety of eugenol and allows us to continue testing and investigate possible anxiolytic and anticonvulsant effects.

Keywords: Eugenol, locomotor system, zebrafish, locomotion.

ANEXO B – PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO EFEITO ANSIOLÍTICO DA CHALCONA (E) -3- (4- (DIMETILAMINO) FENIL) -1- (2-HIDROXIFENIL) PROP-2-EN-1-ONA EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO) ADULTO



Participação do sistema serotoninérgico no efeito ansiolítico da chalcona (E) -3- (4- (dimetilamino) fenil) -1- (2-hidroxifenil) prop-2-en-1-ona em zebrafish (*Danio rerio*) adulto

Cecília Guimarães Lemos¹, Oliveira Larissa Santos Oliveira², Maria Kueirislene Amâncio Ferreira², Antônio Wlisses da Silva⁴, Helcio Silva dos Santos⁵, Menezes Jane Eire Silva Alencar de Menezes⁶

¹Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciência e Tecnologia/UECE, cecilia.lemos@aluno.uece.br.

²Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciência e Tecnologia/PPGCN-UECE, kueirislene.ferreira@aluno.uece.br; Larissa_as10@hotmail.com

³Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciência e Tecnologia/RENORBIO-UECE, wlissesdasilva@hotmail.com

⁴Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciência e Tecnologia/Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA, helciodossantos@gmail.com

⁵Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciência e Tecnologia/UECE, jane.menezes@uece.br

RESUMO: O presente trabalho busca avaliar a existência do efeito ansiolítico, a possível ação pelo mecanismo serotoninérgico e a toxicidade aguda da chalcona para-dimetilamino em zebrafish adulto. Para os testes de claro-escuro do efeito ansiolítico os animais receberam as doses da amostra (4;20 e 40 mg/kg); DMSO 3% e DZP 40mg/kg. Após 30 min, os animais foram colocados em aquários e analisou-se o tempo de permanência no claro, o mesmo procedimento foi utilizado para a identificação do mecanismo serotoninérgico com os antagonistas ciproheptadina, granisetron e pizotifeno e como controle positivo utilizou-se FLX 40mg/kg. Para teste da toxicidade, as mesmas doses foram aplicadas aos animais e após 96h de análise, os valores obtidos com o número de ZFa mortos foram analisados estatística para estimar DL₅₀. Observou-se que o efeito ansiolítico, atua via ciproheptadina e granisetron e não foi tóxico até 96h de análise. A ausência de toxicidade mostra a segurança não clínica e o efeito ansiolítico com mecanismos nos direcionam para o entendimento dos possíveis receptores onde a chalcona atua no SNC do zebrafish.



Palavras-chave: Ansiedade. Sistema nervoso. Mecanismo de ação.

1. INTRODUÇÃO

Apresentando crescente alta em diagnósticos, o transtorno de ansiedade se tornou uma enfermidade comum entre adultos e adolescentes (COSTA, *et al.*, 2019)

De acordo com Costa, *et al.*, 2019, este aumento de diagnósticos ocasiona a alta demanda por tratamentos e por consequência a procura por novos fármacos que possuem o efeito ansiolítico. As chalconas são uma classe de compostos químicos pertencentes aos flavonoides, sua estrutura química pode ser definida como cetonas α,β -insaturadas (enonas), com o esqueleto estrutural 1,3-diáril-prop-2-en-1-ona (BITENCOURT, *et al.*, 2020)

ANEXO C – CERTIFICADO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

 UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ	Comissão de Ética para o Uso de Animais Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi CEP 60740-903 – fone 3101-9890 ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua	 GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ <small>Secretaria de Ciência, Tecnologia e Educação Superior</small>
--	--	--

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **“Uso do Zebrafish (Danio rerio) como modelo alternativo para Investigação do potencial farmacológico de produtos naturais e sintéticos”** registrado sob o número **04983945/2021**, tendo como pesquisador principal Jane Eire Silva Alencar de Menezes, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela **Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE)**. Este certificado expira-se em 31 de Julho de 2023.


CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled **“Use of Zebrafish (Danio rerio) as an alternative model for Investigation of the pharmacological potential of natural and synthetic products”** registered with the protocol **04983945/2021**, under the supervision of Jane Eire Silva Alencar de Menezes, is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE)**. This certificate will expire on July 31st, 2023.

RESUMO

Vigência do projeto	Início	Agosto/2021	Fim	31 de julho de 2023
Espécie/Linhagem	Danio rerio Zebrafish (paulistinha)			
Número de animais	6000	Peso	0,5 g	Idade
Sexo	3000	Feminino	3000	Masculino
Origem	Aquário certificado			
Metodologia	X	Adequada		Não adequada
Cronograma	X	Adequado		Ausente/ Não adequado
Ofício de encaminhamento	X	Presente		Ausente/ Não adequado
Orçamento	X	Adequado		Ausente/ Não adequado
Financiamento	Órgão de fomento	Recursos de Pesquisa e Parcerias		
	Edital ou N. processo	-		

Fortaleza, 05 de agosto de 2021.


 Vania Marilande Ceccatto
 Presidente CEUA-UECE