

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANSIOLÍTICA DA MANGIFERINA EM ZEBRAFISH ADULTO

Francisco F. S. Lopes¹, Kaylane P. Nascimento², Vitória A. O. Nobre², Maria V. S. Tavares², Marcus V. F. Silva³, Victor B. Fernandes¹, Amanda M. B. Alves⁴, Maria K. A. Ferreira⁴, Jane E. S. A. Menezes⁴, Emmanuel S. Marinho³, Selene M. Morais^{1,2}

¹Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectroscópicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Laboratório de Química de Produtos Naturais, Curso de Química, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Laboratório de Bioprospecção e Monitoramento de Recursos Naturais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁴Laboratório de Bioensaios Químico-farmacológicos e Ambientais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Palavras-Chave: *Mangifera indica*, Neuroproteção, Peixe-zebra.

Introdução

Os distúrbios de ansiedade são condições biopsicossociais ligadas a respostas generalizadas ou específicas diante de situações percebidas como ameaçadoras. Essas condições estão entre os transtornos mentais mais comuns. Geralmente surgem precocemente na vida e, como outros transtornos mentais, apresentam uma evolução crônica deliberada e um impacto funcional significativo. Os distúrbios de ansiedade manifestam-se clinicamente de diversas maneiras (JAVAID et al., 2023).

Na ansiedade patológica, as pessoas interpretam situações cotidianas como ameaçadoras e evitam experiências que causem sentimentos negativos similares. Os transtornos incluem transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico, ansiedade social, estresse pós-traumático e transtorno por uso de álcool, que são acompanhados de efeitos nutricionais e sintomas fisiológicos como taquicardia, dificuldade respiratória, dores musculares e tremores generalizados, além de alterações comportamentais como pensamentos negativos persistentes e preocupações recorrentes. Sintomas que quando não tratados, podem exigir cuidadosa intervenção farmacológica (DE AZEVEDO et al., 2024; MARQUES et al., 2024).

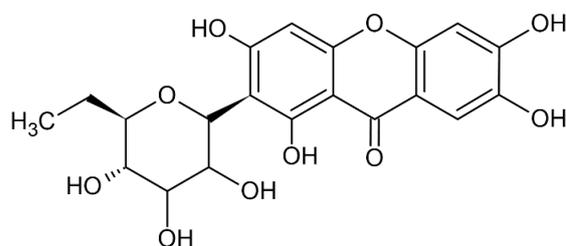
A ansiedade representa um significativo desafio de saúde pública, classificada como a 24ª principal causa de incapacidade entre os afetados pelo transtorno. Nesse sentido, compostos fenólicos provenientes de fontes naturais interagem com receptores do sistema nervoso central (SNC) nos mesmos sítios de ligação dos benzodiazepínicos, os principais medicamentos empregados no tratamento da ansiedade, porém, possuem seus usos clínicos limitados devido a efeitos colaterais como sedação, relaxamento muscular, comprometimento psicomotor, ataxia, amnésia, problemas físicos e dependência psicológica (Camilo et al., 2022; Mendes et al., 2023). Pesquisas estão em curso para identificar produtos naturais ansiolíticos, explorando seus componentes ativos e mecanismos de ação, em busca de alternativas aos medicamentos tradicionais (ALLAMEH; ORSAT, 2022; MUNIANDY, 2018).

A *Mangifera indica* Linnaeus, mais conhecida popularmente como mangueira, é uma árvore da família Anacardiaceae nativa da Malásia e da Índia. Adaptada a climas tropicais e

subtropicais, foi domesticada há cerca de 4.000 anos. Hoje é cultivada em mais de 100 países, ocupando uma área total de 3,7 milhões de hectares (REIS et al., 2021).

A espécie é amplamente utilizada na medicina popular para tratar e prevenir diversos problemas de saúde. Seu uso deve-se muito aos compostos fitoquímicos bioativos presentes na planta. Eles estão localizados em várias partes, como as folhas, cascas, flores, frutos e sementes (MIRZA et al., 2021). Dentre todos bioativos, o principal composto é a mangiferina (Figura 1), uma xantona natural presente em diversas plantas (LOPES et al., 2024). Estudos diversos têm demonstrado sua ampla gama de ações biológicas, como a capacidade antioxidante (ATTIA et al., 2022), anti-inflamatória (MEI et al., 2021), anti-diabetes (LOPES et al., 2024), Cardioprotetora (JIANG et al., 2020), neuroprotetora (LIU et al., 2021) e antimicrobiana (YEHIA; ALTWAIM, 2023), o que a torna um agente promissor para o setor farmacêutico, em especial, ao combate aos transtornos de ansiedade.

Figura 1. Representação química da estrutura da mangiferina.



Fonte: Próprio autor.

Nos estudos de ansiedade, apesar dos roedores serem comumente usados, o zebrafish tem se destacado como um modelo animal promissor para pesquisas, devido ao seu baixo custo, facilidade de manejo e à sua semelhança genética e fisiológica com humanos. Fato que o torna um animal excelente nos estudos *in vivo* (KALUEFF et al., 2014).

Portanto, considerando as propriedades medicinais mencionadas da mangiferina, o presente estudo teve como objetivo extrair, purificar e caracterizar a mangiferina de folhas de *Mangifera indica*, assim como investigar o seu potencial efeito toxicológico e ansiolítico, utilizando o modelo animal do zebrafish.

Material e Métodos

As folhas de *Mangifera indica* foram coletadas no campus do Itaperi da Universidade Estadual do Ceará e levadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais, onde foram secas em estufa a 60°C por 6 horas e trituradas em um moinho de facas. Em seguida, 150 g de folhas foram desengorduradas em extrator Soxhlet com hexano por 12 horas, e posteriormente submetido a uma segunda extração com metanol pelo mesmo período. A fração metanólica foi concentrada em um rotaevaporador e suspensa em acetato de etila. Todo o material foi armazenado na geladeira até precipitação do sólido amarelado que foi filtrado e submetido a sucessivas etapas de recristalização (MURUGANANDAN et al., 2005).

A identificação e a verificação da pureza da mangiferina foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da Shimadzu com coluna C18 Shim-pack (250x4,5 mm, 5 µm). Fase móvel consistiu de acetonitrila (solvente A) e água Milli-Q acidificada com 2% de ácido acético (solvente B). Gradiente de eluição programado para: 0-10

min (10:90 v/v); 10-20 min (20:80 v/v); 20-23 min (95:05 v/v); 23-30 min (10:90 v/v). Vazão de 1,0 mL/min, com volume de injeção de 20 μ L. O pico da mangiferina foi identificado comparando-se o tempo de retenção com o padrão de referência e por meio de espectro UV a 254 nm (RAMÍREZ et al., 2016).

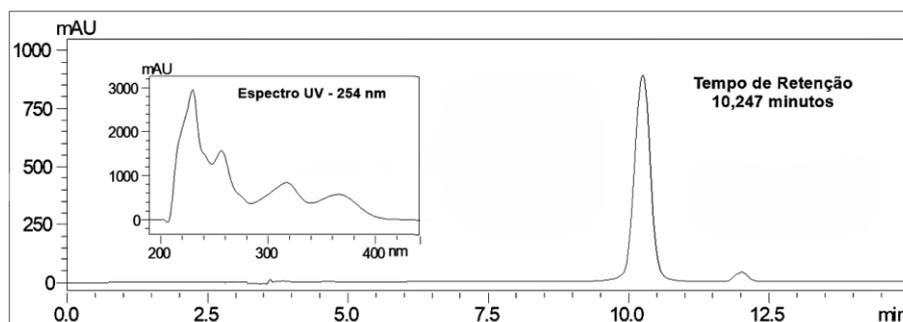
Para avaliar o efeito ansiolítico da mangiferina, foram utilizados zebrafish (*Danio rerio*) adultos, de linhagem selvagem, de ambos os sexos, com idades entre 60 e 90 dias, medindo $3,5 \pm 0,5$ cm e pesando $0,4 \pm 0,1$ g. Os animais foram selecionados aleatoriamente, anestesiados em água gelada e tratados com 20 μ L da amostra (4, 20 e 40 mg/kg) ou Diazepam (4 mg/kg; controle positivo), ou DMSO a 3 % (controle negativo/diluyente das drogas) via intraperitoneal (i.p). Em seguida, foram acondicionados individualmente em béquer de vidro contendo água do aquário e mantidos em repouso (n = 6 por grupo).

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar possíveis alterações na coordenação motora dos animais, relacionadas ao efeito ansiolítico e/ou ao relaxamento muscular (FERREIRA et al., 2021). O comportamento de ansiedade foi avaliado em aquário de vidro (30 cm x 15 cm x 20 cm), dividido em uma clara e outra escura (Teste claro-escuro). Após 30 minutos de adaptação, os peixes foram colocados individualmente na zona clara, e o efeito ansiolítico foi medido com base no tempo que eles permaneceram na zona clara durante 5 minutos de observação (GEBAUER et al., 2011). Após 24, 48, 72 e 96 horas, o número de animais mortos foram submetidos à análise estatística, e a dose letal para matar 50% dos zebrafish (DL_{50}) foi calculada. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 04983945/2021. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A análise estatística usou o método ANOVA seguido do teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

O processo de extração e purificação da mangiferina resultou em 1,34 g de material purificado, com um rendimento de 0,89% (p/p) em relação ao peso inicial das folhas. A pureza do composto, analisada por CLAE-DAD, apresentou um pico majoritário com tempo de retenção de 10,247 minutos e um espectro UV característico da molécula de mangiferina. O teor do composto atingiu 97,8% de pureza (Figura 2). Neste trabalho conseguiu-se um resultado até melhor em termos de pureza que o estudo realizado com folhas adultas do Vietnã, onde os autores obtiveram uma eficiência de extração com um rendimento de 0,82% e uma pureza de 94,2% (LOAN et al., 2021).

Figura 2. Cromatogramas de CLAE-DAD da análise de pureza da mangiferina isolada.



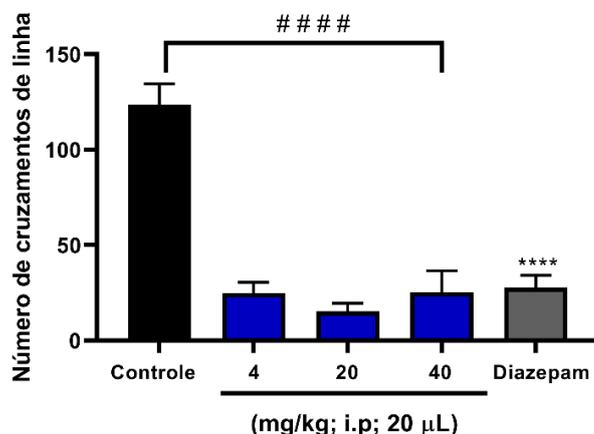
Fonte: Próprio autor.

O teste de toxicidade aguda da mangiferina em zebrafish adulto demonstrou que em nenhuma dose utilizada, o composto foi tóxico até 96 horas de análise. Esse resultado está em concordância com os dados da literatura, onde um estudo de toxicidade subcrônica conduzido em camundongos, com uma dose de 200 mg/kg, demonstrou que, ao longo de 28 dias, todos os animais permaneceram saudáveis, alertas, ágeis e exibiram comportamentos normais de alimentação e defecação, sem mortes registradas em nenhum dos grupos. Isso indica que a mangiferina é segura para uso prolongado (HUYNH et al., 2024).

O zebrafish adulto tem se tornado um modelo animal amplamente utilizado em estudos de toxicidade, devido a diversos fatores que o tornam uma escolha vantajosa em comparação com outros modelos (Ferreira et al., 2021). Como vertebrado, o zebrafish adulto compartilha muitas semelhanças biológicas com os seres humanos, incluindo sistemas nervoso central, cardiovascular e imunológico. Além disso, a transparência das larvas de zebrafish permite a observação direta e em tempo real dos efeitos tóxicos em órgãos e tecidos, o que é uma grande vantagem em relação a outros modelos animais (SILVA et al., 2020). Outra característica relevante é a possibilidade de manipulação genética, permitindo estudos sobre os efeitos de compostos tóxicos em vias específicas. Adicionalmente, o pequeno tamanho do zebrafish adulto possibilita a realização de testes de toxicidade em larga escala, o que é ideal para triagens de compostos tóxicos. Por essas razões, o zebrafish adulto é amplamente empregado tanto na avaliação dos efeitos de substâncias químicas em organismos vivos quanto na investigação das vias de sinalização molecular relacionadas à toxicidade (SILVA et al., 2020).

O teste da atividade locomotora por meio do teste de campo aberto em zebrafish como modelo animal, mostrou que todas as doses de mangiferina alteraram a locomoção dos animais (** $p < 0,0001$ e Diazepam vs controle), reduzindo a atividade locomotora em comparação ao grupo controle (veículo – DMSO a 3%) (Figura 3).

Figura 3. Efeito da mangiferina sob o comportamento locomotor do zebrafish adulto no teste de campo aberto (0–5 min).



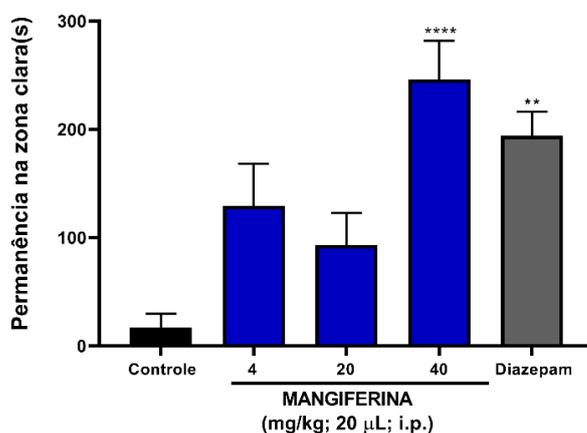
Fonte: Próprio autor.

O resultado obtido neste estudo é semelhante ao encontrado em pesquisas com ratos Wistar, onde o comprometimento da atividade locomotora foi significativamente reduzido após a administração de uma dose de 20 mg/kg de mangiferina (LUM et al., 2023).

A análise da atividade locomotora por meio do teste de campo aberto em zebrafish é uma ferramenta amplamente utilizada em estudos comportamentais e farmacológicos. Isso se deve ao fato de que os movimentos e o comportamento de natação do zebrafish são altamente sensíveis a estímulos externos e internos, incluindo mudanças no ambiente, fatores emocionais e respostas a tratamentos farmacológicos (TAYLOR et al., 2017). Através deste teste, é possível obter informações sobre o impacto de diferentes substâncias químicas no comportamento do peixe. Por exemplo, uma substância tóxica pode diminuir a atividade locomotora do zebrafish, enquanto substâncias que promovem sua saúde podem aumentar essa atividade. Além disso, o teste também pode ser utilizado para avaliar o efeito de tratamentos farmacológicos em transtornos comportamentais, como ansiedade e depressão. Um composto ansiolítico em humanos, por exemplo, pode aumentar a atividade locomotora do zebrafish durante o teste, sugerindo um potencial efeito ansiolítico (GEBAUER et al., 2011). Portanto, a análise da atividade locomotora pelo teste de campo aberto oferece informações valiosas sobre o efeito de diferentes substâncias e condições no comportamento do zebrafish, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicidade e em transtornos comportamentais.

Avaliação da ansiedade por meio do teste claro-escuro em zebrafish adulto mostrou que a mangiferina na maior dosagem (40 mg/kg) teve efeito ansiolítico (**** $p < 0,0001$ vs controle) semelhante ao Diazepam vs controle (** $p < 0,01$) (Figura 4). Esses resultados estão de acordo com pesquisas disponíveis na literatura, nas quais o pré-tratamento com mangiferina melhorou significativamente o comportamento semelhante à ansiedade no teste de caixa claro-escuro, utilizando camundongos induzidos com lipopolissacarídeos (JANGRA et al., 2014).

Figura 4. Efeito da mangiferina na ansiedade do zebrafish no teste claro/escuro (0–5 min).



Fonte: Próprio autor.

O teste claro/escuro em zebrafish adulto é um método comportamental utilizado para avaliar a atividade ansiolítica ou ansiogênica de compostos químicos. Nesse teste, o peixe é colocado em um aquário dividido em duas partes: uma área iluminada e outra escura. Como o zebrafish é naturalmente fotofóbico, ele tende a preferir áreas escuras e menos iluminadas. Assim, quando exposto a um ambiente com áreas claras e escuras, os peixes geralmente passam a maior parte do tempo na área escura. No entanto, ao serem tratados com compostos ansiolíticos, eles tendem a passar mais tempo na área clara, o que indica uma redução nos comportamentos ansiosos e um aumento na atividade exploratória. Esse teste é amplamente utilizado em estudos farmacológicos para identificar compostos com potencial ansiolítico (AIMÊE et al., 2021).

Além disso, o teste claro/escuro também é valioso em estudos de toxicidade, pois a exposição a substâncias tóxicas pode impactar negativamente o comportamento do zebrafish, resultando em um aumento dos comportamentos ansiosos ou de esquivas. Dessa forma, a análise da atividade ansiolítica pelo teste claro/escuro em zebrafish adulto é uma ferramenta eficaz para identificar compostos tóxicos que afetam negativamente o comportamento, fornecendo informações importantes para avaliar o risco potencial desses compostos para a saúde humana e ambiental.

Conclusões

A técnica de isolamento da mangiferina que foi desenvolvida neste trabalho mostrou-se superior aos dados já relatados na purificação deste composto. O peixe zebra adulto tratado com a mangiferina não apresentou efeito tóxico e exibiu atividade ansiolítica. Esses dados reforçam o potencial farmacológico desta substância como possível fármaco para o tratamento da ansiedade em posteriores estudos em humanos.

Agradecimentos

Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de Química de Produtos Naturais, Laboratório de Análises Cromatográficas e Espectroscópica, Laboratório de Bioensaios Químico-farmacológicos e Ambientais, CNPq e FUNCAP.

Referências

- ALLAMEH, M.; ORSAT, V. Herbal Anxiolytics: Sources and their preparation methods. *Food Reviews International*, 39, 4992–5020, 2022.
- ATTIA, S. H.; ELSHAZLY, S. M.; ABDELAAL, M. M.; SOLIMAN, E. Reno-protective effect of mangiferin against methotrexate-induced kidney damage in male rats: PPAR γ -mediated antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30, 1252–1261, 2022.
- DE AZEVEDO, D. V.; SILVA, D. M.; MAGALHÃES, F. E. A.; DE ARAÚJO, J. I. F.; DE ARAUJO, S. M. B.; LOPES, F. F. D. S.; DE MORAES, S. M.; BATISTA, F. L. A.; MOURA, L. F. W. G.; GUEDES, M. I. F. Evaluation of antioxidant, toxicological and anxiolytic-like effect of ethanolic extracts of *Ziziphus cotinifolia* Reissek in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Phytomedicine Plus*, 4, 100504, 2024.
- FERREIRA, M. K. A.; DA SILVA, A. W.; DOS SANTOS MOURA, A. L.; SALES, K. V. B.; MARINHO, E. M.; CARDOSO, J. N. M.; MARINHO, M. M.; BANDEIRA, P. N.; MAGALHÃES, F. E. A.; MARINHO, E. S.; DE MENEZES, J. E. S. A.; DOS SANTOS, H. S. Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of a adult zebrafish. *Epilepsy & Behavior*, 117, 107881, 2021.
- GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, Â. L.; SCHAEFER, I. C.; BONAN, C. D.; LARA, D. R. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99, 480–486, 2011.
- HUYNH, D. T. M.; LE, L. M.; NGUYEN, L. T.; NGUYEN, T. H. N.; NGUYEN, M. H.; NGUYEN, K. T. V.; TRAN, K. Q.; TRAN, T. L. Q.; LE, M-N T.; MAI, H. N. Investigation of acute, sub-chronic toxicity, effects of mangiferin and mangiferin solid dispersion (HPTR) on Triton WR1339-induced hyperlipidemia on Swiss albino mice. *Pharmacia*, 71, 1-14, 2024.
- JAVAID, S. F.; HASHIM, I. J.; HASHIM, M. J.; STIP, E.; SAMAD, M. A.; AHBABI, A. A. Epidemiology of anxiety disorders: Global burden and sociodemographic associations. *Middle East Current Psychiatry*, 30, 44, 2023.
- JIANG, T.; HAN, F.; GAO, G.; LIU, M. Mangiferin exert cardioprotective and anti-apoptotic effects in heart failure induced rats. *Life Sciences*, 249, 117476, 2020.
- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35, 63–75, 2014.

LIU, T.; SONG, Y.; HU, A. Neuroprotective mechanisms of mangiferin in neurodegenerative diseases. *Drug Development Research*, 82, 494–502, 2021.

LOAN, N. T. T.; LONG, D. T.; YEN, P. N. D.; HANH, T. T. M.; PHAM, T. N.; PHAM, D. T. N. Purification process of mangiferin from *Mangifera indica* L. leaves and evaluation of its bioactivities. *Processes*, 9, 852, 2021.

LOPES, F. F. S.; LÚCIO, F. N. M.; ROCHA, M. N.; OLIVEIRA, V. M.; ROBERTO, C. H. A.; MARINHO, M. M.; MARINHO, E. S.; MORAIS, S. M. Structure-based virtual screening of mangiferin derivatives with antidiabetic action: A molecular docking and dynamics study and MPO-based drug-likeness approach. *3 Biotech*, 14, 135, 2024.

LUM, P. T.; SEKAR, M.; SEOW, L. J.; SHAIKH, M. F.; ARULSAM, A.; RETINASAMY, T.; GAN, S. H.; GNANARAJ, C.; ESA, N. M.; RAMACHAWOLRAN, G. Neuroprotective potency of mangiferin against 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease-like symptoms in rats: Possible antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. *Frontiers In Pharmacology*, 14, 1189957, 2023.

MARQUES, L. D. S.; ROCHA, Y. M. D.; NASCIMENTO, G. A. D.; SANTOS, S. A. A. R.; VIEIRA, N. C. G.; MOURA, L. F. W. G.; ALVES, D. R.; SILVA, W. M. B. D.; DE MORAIS, S. M.; OLIVEIRA, K. A.; SILVA, L. M. R.; SOUSA, K. K. O. D.; VIEIRA-NETO, A. E.; COUTINHO, H. D. M.; CAMPOS, A. R.; MAGALHÃES, F. E. A. Potential of the Blue Calm® food supplement in the treatment of alcohol withdrawal-induced anxiety in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurochemistry International*, 175, 105706, 2024.

MIRZA, B.; CROLEY, C. R.; AHMAD, M.; PUMAROL, J.; DAS, N.; SETHI, G.; BISHAYEE, A. Mango (*Mangifera indica* L.): A magnificent plant with cancer preventive and anticancer therapeutic potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61, 2125-2151, 2021.

MUNIANDY, Y. The use of larval zebrafish (*Danio rerio*) model for identifying new anxiolytic drugs from herbal medicine. *Zebrafish*, 15, 321–339, 2018.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, S.; GUPTA, P. K.; LAL, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 497–501, 2005.

RAMÍREZ, N. M.; FARIAS, L. M.; SANTANA, F. A.; LEITE, J. V.; DANTAS, M. S.; TOLEDO, R. L.; QUEIROZ, J.; MARTINO, H. S. D.; RIBEIRO, S. M. R. Extraction of mangiferin and chemical characterization and sensorial analysis of teas from *Mangifera indica* L. leaves of the Ubá variety. *Beverages*, 2, 33, 2016.

REIS, R. C.; VIANA, E. S.; FONSECA, N.; ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES FILHO, J. A. A.; GUEDES, I. S. A. Physical, chemical and sensory attributes of fruits of ten mango varieties grown under organic production system. *Revista Caatinga*, 34, 452-459, 2021.

SILVA, A. W.; FERREIRA, M. K. A.; REBOUÇAS, E. L.; SILVA, C. O.; HOLANDA, C. L. A.; BARROSO, S. M.; REIS, J.; BATISTA, F. L. A.; MENDES, R. S.; CAMPOS, A. R.; EIRE, J.; MENEZES, S. A.; ERNANI, F.; MAGALHÃES, A.; SIQUEIRA, S. M. C. Anxiolytic-like effect of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem, Meliaceae) bark on adult zebrafish (*Danio rerio*): Participation of the serotonergic and GABAergic systems. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 8, 256–263, 2020.

TAYLOR, J. C.; DEWBERRY, L. S.; TOTSCH, S. K.; YESSICK, L. R.; DEBERRY, J. J.; WATTS, S. A.; SORGE, R. E. A novel zebrafish-based model of nociception. *Physiology & Behavior*, 174, 83-88, 2017.

YEHIA, R. S.; ALTWAIM, S. A. An insight into *in vitro* antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, and apoptosis induction potential of mangiferin, a bioactive compound derived from *Mangifera indica*. *Plants*, 12, 1539, 2023.