

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANSOLÍTICO DO COMPLEXO Fe (II)- ÁCIDO TARTÁRICO EM ZEBRAFISH ADULTO (*DANIO RERIO*)

Marcos V. N. Celestino¹; Jordana L. Braga¹; Sabrina S. da silva¹; Luzia D. S. Marques²; Daniela B. de sousa²; Francisco E. A. Magalhães²; Wildson M. B. da Silva³; Solange de O. Pinheiro¹

¹ Centro de ciências e tecnologia, Universidade Estadual do Ceará (UECE)

² Centro de ciências da saúde, Universidade Estadual do Ceará (UECE)

³Centro de Tecnologia, Universidade Vale do Acaraí (UVA)

e-mail: marcos.celestino@aluno.uece.br

Palavras-Chave: Bioinorgânica, Ansiedade, Complexo metálico

Introdução

Os transtornos de ansiedade representam um dos grupos mais prevalentes de doenças mentais no mundo, afetando significativamente a qualidade de vida dos indivíduos e gerando grande impacto socioeconômico. Os fármacos ansiolíticos atualmente disponíveis, como as benzodiazepinas e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), são eficazes em muitos casos, mas apresentam limitações importantes, incluindo efeitos colaterais indesejáveis, risco de dependência, desenvolvimento de tolerância e início de ação tardio (JAYALAKSHMI *et al.* 2023).

Nesse contexto, a busca por novos compostos com atividade ansiolítica, mais seguros e eficazes, tem se tornado uma prioridade na pesquisa farmacológica. A investigação de complexos metálicos, por exemplo, tem ganhado destaque devido à sua versatilidade estrutural e potencial de interação com biomoléculas, o que pode resultar em mecanismos de ação inovadores. Compostos com atividade em receptores GABAérgicos, serotoninérgicos ou em vias de sinalização alternativas representam oportunidades promissoras para o desenvolvimento de novos tratamentos para a ansiedade (SIES *et al.* 2022).

Além disso, o uso de modelos experimentais alternativos, como o zebrafish (*Danio rerio*) (ZFa), tem se consolidado como uma ferramenta eficiente para a triagem comportamental de novos candidatos a fármacos. Este modelo oferece vantagens como baixo custo, fácil manipulação, resposta neurocomportamental bem caracterizada e elevada homologia genética com mamíferos, possibilitando a avaliação rápida e ética de potenciais efeitos ansiolíticos (LI *et al.* 2024). Portanto, a identificação e caracterização de novos compostos com propriedades ansiolíticas são fundamentais não apenas para expandir o arsenal terapêutico disponível, mas também para oferecer alternativas mais seguras, específicas e eficazes no manejo dos transtornos de ansiedade.

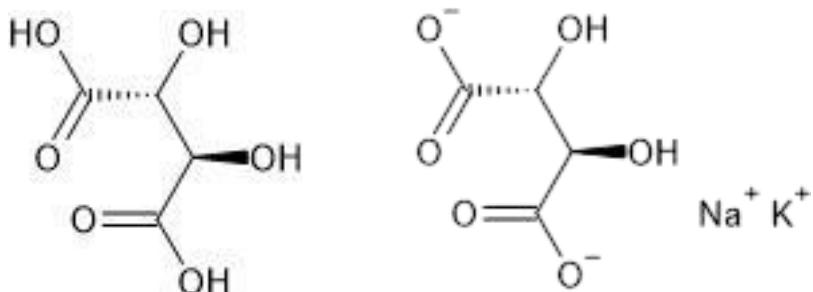
O estudo de complexos metálicos, principalmente com metais de transição e não tóxicos, apresentam uma grande variedade de comportamentos químicos. Possuem agentes redutores fortes e podem formar complexos com uma variância elevada (COSTA, 2020). Estes complexos interagem com organismos vivos, influenciando funções como a atividade enzimática (NASCIMENTO, 2019).

O ferro é um elemento essencial à vida, atuando como cofator em uma ampla variedade de processos biológicos fundamentais. Em especial, o íon ferro na forma reduzida (Fe^{2+}) desempenha um papel crítico em sistemas biológicos devido à sua capacidade de participar de reações de oxirredução, essencial para o metabolismo celular. Em aplicações farmacológicas e biomédicas, o ferro (II) tem sido estudado em complexos metálicos com potencial atividade biológica, incluindo propriedades antimicrobianas, antitumorais e ansiolíticas. A coordenação do Fe^{2+} com ligantes específicos pode modular sua reatividade, biodisponibilidade e

seletividade, tornando-o um centro metálico promissor no desenvolvimento de novos fármacos (AMARAL, 2023).

O ácido tartárico (ATR) é um composto orgânico presente em frutas como uva e tamarindo. É um sólido cristalino, solúvel em água e sem odor, com fórmula C₄H₆O₆. Possui dois carbonos assimétricos e quatro estereoisômeros. Pode ser obtido pela reação entre anidrido maleico e peróxido de hidrogênio (LEIROSE *et al.*, 2020). É altamente solúvel em água e álcool, inodoro, de sabor ácido e estável no ar (NASCIMENTO, 2019). Atua como antioxidante e tem boa capacidade de formar complexos com metais devido aos pares de elétrons livres em seus grupos carbonílicos, funcionando como base de Lewis (AQUINO, 2022). A Figura 01 apresenta a estrutura do ácido tartárico. O tartarato de sódio e potássio conhecido como sal de seignette ou sal de rochelle é um sal duplo de ácido tartárico formado pela combinação de íons de sódio e potássio com ácido tartárico (SARAY, 2022). Isso ocorre devido à disponibilidade de pares de elétrons livres, o que converte o sal em ácido tartárico.

Figura 01: Estrutura do ácido tartárico e do tartarato de sódio e potássio.



Fonte: Elaborado pelos autores.

A combinação do íon ferro (II) com o ácido tartárico na formação do complexo [Fe(ATR)₂(H₂O)₄](SO₄)₂ representa uma abordagem promissora no desenvolvimento de novos compostos com potencial ansiolítico. O Fe²⁺ participa de processos neuromodulatórios, enquanto o ácido tartárico atua como ligante biocompatível, conferindo estabilidade e propriedades favoráveis ao complexo. A estrutura formada pode modular vias neuroquímicas associadas à ansiedade, com potencial terapêutico e menor risco de efeitos adversos. Este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar o complexo [Fe(ATR)₂(H₂O)₄](SO₄)₂, por espectroscopias UV-Vis, IV e fluorescência e avaliar seu efeito ansiolítico-símile e sua segurança, bem como dos precursores, utilizando o modelo animal ZFa.

Material e Métodos

Síntese do complexo [Fe(ATR)₂(H₂O)₄](SO₄)₂

A síntese do complexo foi realizada conforme procedimento de Nascimento (2019) com modificações. Em uma proporção molar 1:2 (íon metálico:ligante), utilizando 0,6 g de sulfato de ferro (II) heptahidratado e 1,2 g de tartarato de sódio e potássio dissolvidos em 20 ml de água. Após mistura e agitação das soluções por 20 min, adicionaram-se três gotas de trietilamina e a reação ocorreu por 2 h. A precipitação do composto foi forçada com etanol gelado, seguida de 48 h sob refrigeração. O produto final foi filtrado e armazenado em dessecador sob vácuo.

Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

O espectro eletrônico na região do UV-Vis do complexo foi obtido utilizando-se um espectrofotômetro SHIMADZU UV-1800 e uma cubeta de quartzo. As soluções dos compostos foram obtidas em concentrações de 1×10^{-3} mol/L.

Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram obtidos entre 4000 e 400 cm^{-1} , em espectrofotômetro Nicolet iS5, com amostras em pastilhas de KBr, usando 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} , para leitura do percentual de transmitância.

Espectroscopia de Fluorescência

A fluorescência do complexo foi analisada em espectrofluorímetro Shimadzu RF-6000, utilizando solução metanólica a 4 mg/mL. Uma alíquota de 2 mL foi colocada em cubeta de quartzo (1 cm) e os espectros foram registrados entre 380–600 nm, com excitação em 360, 370, 380, 390, 400 e 410 nm.

Avaliação da Segurança Não Clínica do Complexo Metálico $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ em zebrafish adulto

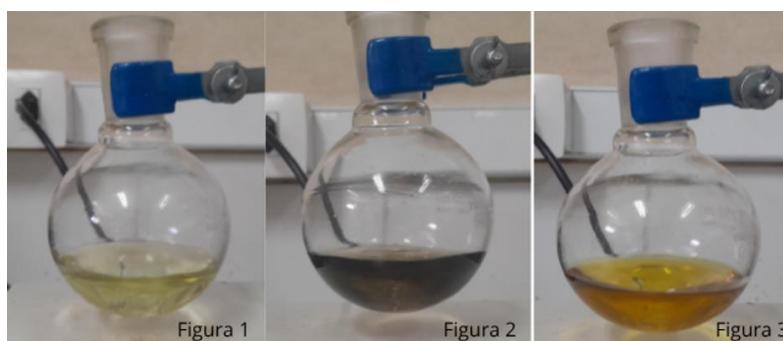
O complexo $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ e seus precursores (sulfato de ferro (II) e o tartarato de sódio e potássio) foram preparadas em DMSO 3% (0,01; 0,1; 1,0 mg/mL). Foram utilizados zebrafish adultos (*Danio rerio*), aclimatados por 24 h. Os animais foram tratados via oral (20 μL) com as amostras, veículo (DMSO 3%), diazepam (10 mg/mL) ou não tratados (Naive). A toxicidade aguda (96 h) foi avaliada pela mortalidade e cálculo da CL_{50} . A atividade locomotora foi analisada pelo número de cruzamentos em campo aberto (5 min). O efeito ansiolítico-símile foi avaliado no teste Claro & Escuro, medindo-se o tempo de permanência na zona clara (5 min). Os dados foram expressos como média \pm EPM ($n=6$), analisados por ANOVA seguida de Tukey ($p<0,05$), usando GraphPad Prism v.8.4.3. O estudo foi aprovado pelo CEUA-UECE (04009489/2023). Os testes com zebrafish foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães et al. (2017).

Resultados e Discussão

Síntese do complexo $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$

Durante a síntese do complexo, a solução apresentou três mudanças de coloração: iniciou em amarelo claro, passou para verde musgo com a adição de trietilamina e finalizou em âmbar translúcido (Figura 02: Figuras 1–3). Essas alterações indicam a ocorrência da coordenação entre o íon metálico e o ligante.

Figura 02: Síntese do complexo $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ mostrando as três etapas da reação.

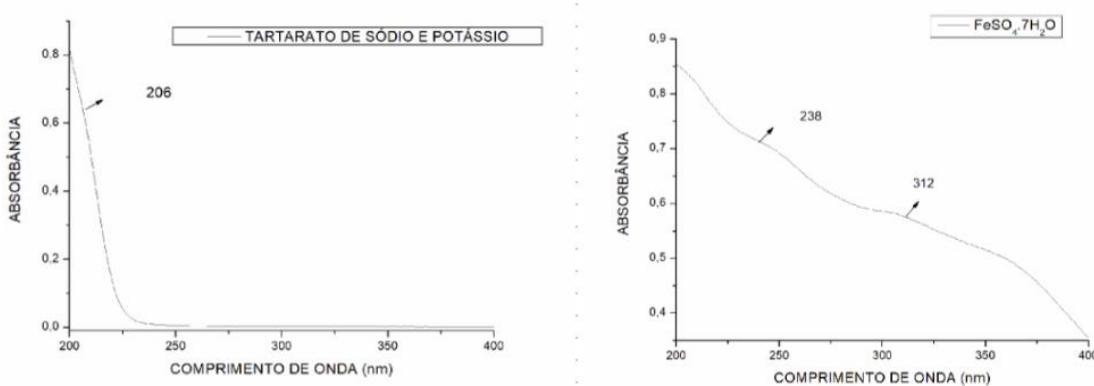


Fonte: Elaborado pelos autores.

Espectroscopia Eletrônica na Região do Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

A Figura 03 apresenta os espectros eletrônicos na região do UV-Vis para os precursores $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e tartarato de sódio e potássio, ambos em água.

Figura 03: Espectros eletrônicos na região do UV-VIS do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e do tartarato de sódio e potássio.

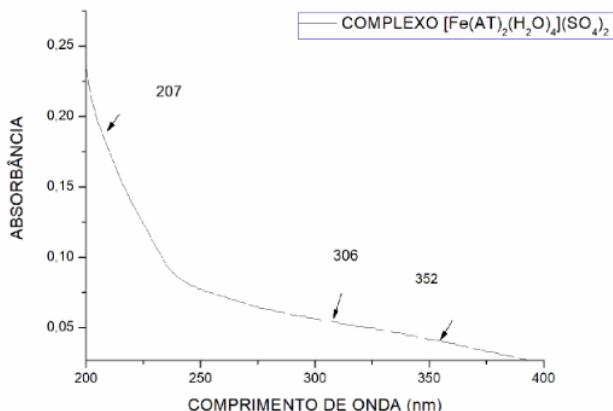


Fonte: Elaborado pelos autores.

A espectroscopia UV-Vis mostrou que o ligante tartarato de sódio e potássio, convertido em ácido tartárico em solução, apresentou uma banda em 206 nm, atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ (Figura 03) (ARAÚJO, 2016). O sulfato de ferro (II) exibiu bandas em 238 e 312 nm, relacionadas às transições $d-d$ do sal metálico.

A Figura 04 apresenta o espectro eletrônico na região do UV-Vis do complexo $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ em água.

Figura 04: Espectro eletrônico na região do UV-Vis do $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ em água.



Fonte: Elaborados pelos autores.

O espectro UV-Vis do complexo $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ apresentou bandas em 207, 306 e 352 nm (Figura 04). A banda em 207 nm é atribuída a transições intraligantes, e as demais a transferência de carga metal-ligante ($\text{Fe} \rightarrow \text{ATR}$) (NASCIMENTO, 2019). Os dados estão resumidos na Tabela 01.

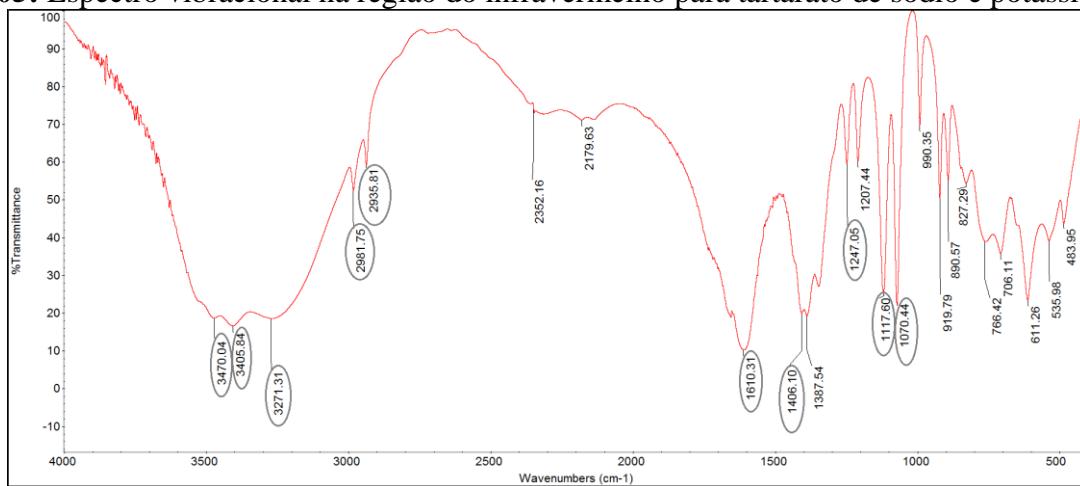
Tabela 01: Dados espectroscópicos de UV-vis dos compostos.

COMPOSTO	BANDAS (nm)
Ácido tartárico	206
FeSO ₄ .7H ₂ O	238, 312
[Fe(ATR) ₂ (H ₂ O) ₄](SO ₄) ₂	207, 306, 352

Fonte: Elaborado pelos autores.

Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

O espectro IV do tartarato de sódio e potássio (Figura 05) apresentou os principais modos vibracionais: C=O assimétrico em 1610 cm⁻¹, bandas intensas de OH em 3271, 2981 e 2935 cm⁻¹, e C–O em 1247 cm⁻¹. As bandas em 3470 e 3405 cm⁻¹ indicam o ânion carboxilato, com banda larga característica (SHYJU; ANANDHI; GOPALAKRISHNAN, 2012).

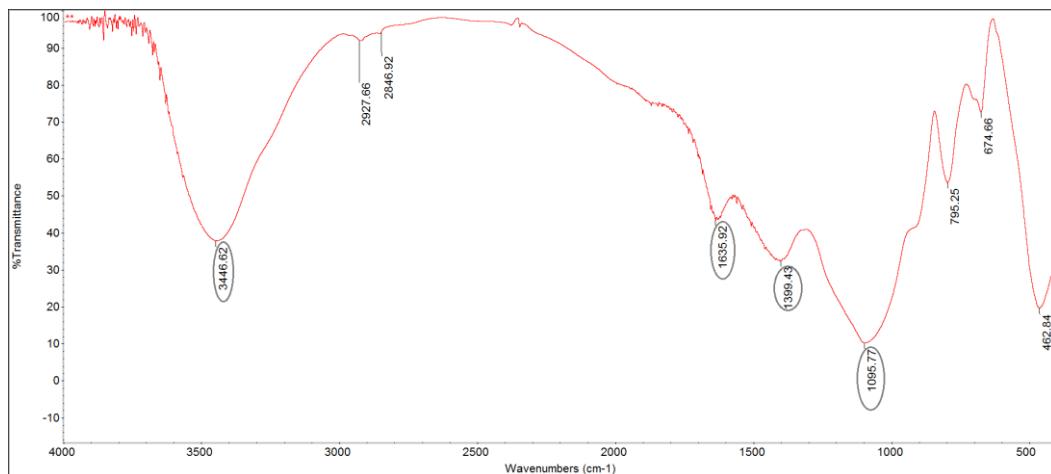
Figura 05: Espectro vibracional na região do infravermelho para tartarato de sódio e potássio


Fonte: Elaborado pelos autores.

A Figura 06 apresenta o espectro vibracional do complexo [Fe(ATR)₂(H₂O)₄](SO₄)₂. No espectro de IV observou-se um deslocamento da banda referente ao grupamento carbonila de 1610 cm⁻¹ (ligante livre) para 1635 cm⁻¹, indicando possível coordenação do ligante ao íon metálico pelo oxigênio carbonílico do tartarato (MATHIVANAN *et al.*, 2014). A banda em 3446 cm⁻¹ foi atribuída ao grupamento –OH da água de coordenação (LACHTER, 2009). O estiramento assimétrico do grupo carboxilato coordenado ao metal apareceu em 1635 cm⁻¹, enquanto o estiramento simétrico foi identificado em 1399 cm⁻¹; tais bandas não foram observadas no ligante livre, reforçando a coordenação pelo oxigênio carbonílico.

A análise da diferença entre os modos vibracionais do carboxilato [$\Delta v = v_{ass}(COO^-) - v_{s}(COO^-)$] permitiu identificar o tipo de coordenação. Como o valor obtido foi $\Delta v = 236$ cm⁻¹, maior que 200 cm⁻¹, conclui-se que o grupo carboxilato coordenou-se de forma monodentada (LACHTER, 2009). Além disso, a banda em 462 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento metal oxigênio (MATHIVANAN *et al.*, 2014; NASCIMENTO, 2019).

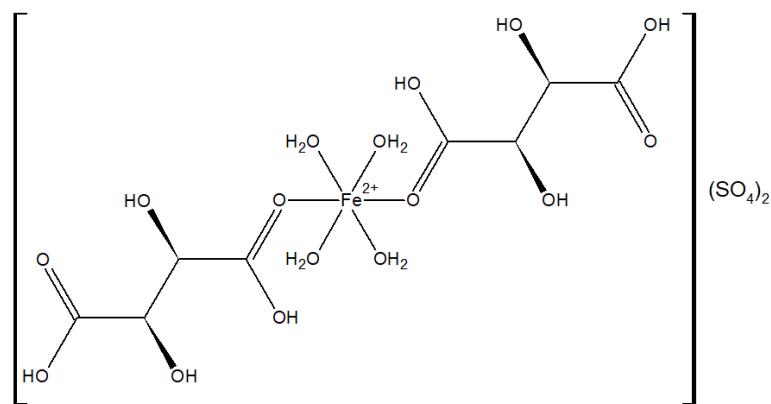
Figura 06: Espectro vibracional na região do infravermelho para o complexo $[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Resultados observados no espectro de IV sugerem que a coordenação do ligante ao íon metálico foi feita de forma monodentada e pelo oxigênio carbonílico. Na Figura 07 encontra-se a representação estrutural do complexo $[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$.

Figura 07: Estrutura proposta para o complexo $[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$.



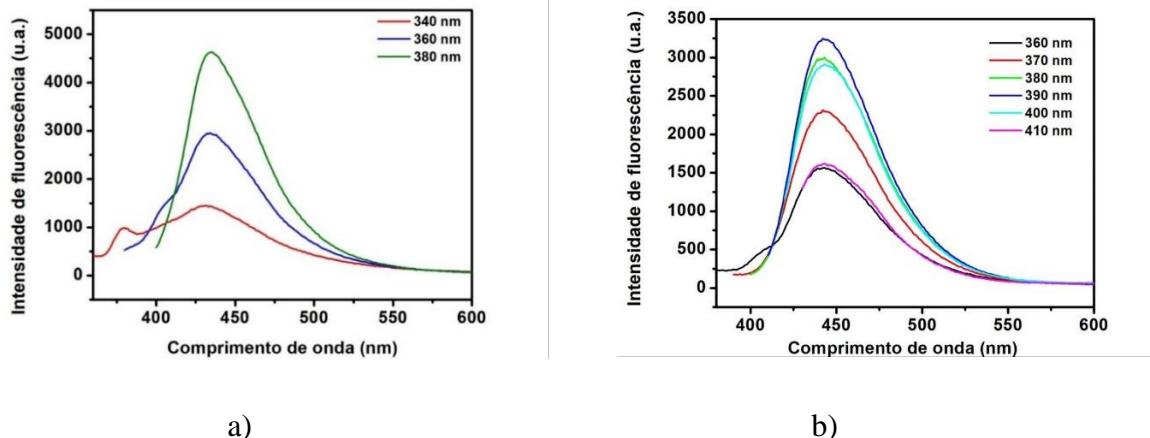
Fonte: Elaborado pelos autores.

Espectroscopia de Fluorescência do complexo $[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$

Foi obtida a espectroscopia de fluorescência para o metanol (Figura 08), que foi utilizado como comparativo, e então o espectro para o complexo $[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$ em solução metanólica. Na análise dos espectros do complexo, observa-se o surgimento de bandas não encontradas no espectro do metanol.

As bandas em 360 nm e 380 nm, aparecem no espectro do complexo e são características do metanol, porém, as bandas em 370 nm, 390 nm, 400 nm e 410 nm, não aparecem no espectro do etanol, portanto podem ser atribuídas ao complexo.

Figura 08: Espectro de Fluorescência do solvente metanol (a) e do complexo $[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$ na concentração de 4 mg.mL^{-1} (b).



Fonte: Elaborado pelos autores.

Além disso, verificou-se que, independentemente do comprimento de onda incidente, o complexo apresentou emissão sempre na mesma faixa, variando apenas a intensidade da fluorescência. Esse comportamento demonstra que a emissão de fluorescência é invariável quanto à energia de excitação, característica relevante para aplicações em sensoriamento, uma vez que possibilita a detecção de diferentes substâncias.

Avaliação da segurança não clínica Toxicidade 96 h

Para todas as concentrações dos compostos testados, sugere-se que a CL₅₀ pode ser superior a 1,0 mg/mL (Tabela 02).

Tabela 02. Resultados dos testes de toxicidade aguda da amostra teste frente ao zebrafish adulto.

Amostra Teste	Mortalidades do zebrafish Adulto				96 h de Análise CL ₅₀ (mg/mL) / IV
	V	C1	C2	C3	
Ácido Tartárico	0	0	0	0	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0	0	0	0	> 1,0
$[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$	0	0	0	0	

V - Veículo – DMSO 3% (Controle; 20 µL; v.o.). C1 - 0,01 mg/mL (20 µL; v.o.); C2 - 0,1 mg/mL (20 µL; v.o.); C3 - 1,0 mg/mL (20 µL; v.o.). CL₅₀-concentração letal para matar 50% dos zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança.

Nesse trabalho, os compostos demonstraram ser seguras frente ao ZFa, pois não apresentou toxicidade.

Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

No teste de campo aberto com zebrafish adultos (ZFa), os compostos ácido tartárico, FeSO₄.7H₂O e o complexo metálico $[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$ demonstraram efeito sedativo em todas as concentrações testadas (0,01; 0,1; 1,0 mg/mL, por via oral), promovendo redução

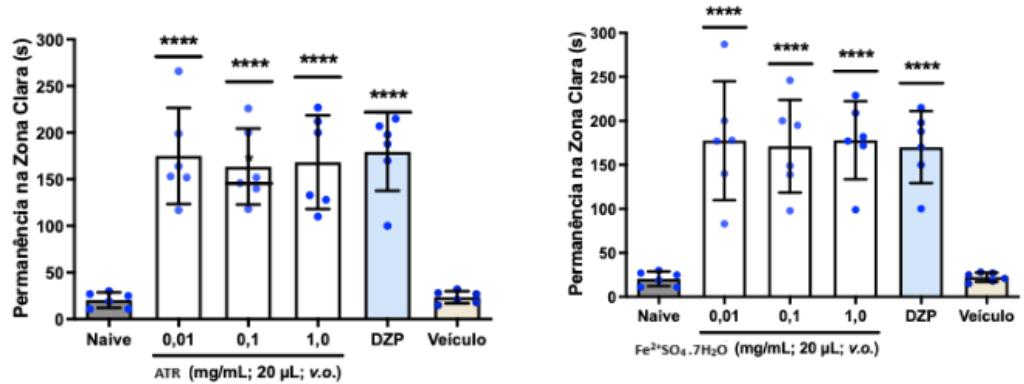
significativa da atividade locomotora. Esse efeito foi semelhante ao observado com o controle positivo diazepam (DZP, 10 mg/mL), indicando possível ação ansiolítica/sedativa dos compostos. Os dados estatísticos confirmam diferenças significativas em relação aos grupos Naive e Veículo, reforçando a eficácia dos tratamentos testados.

O tratamento do *zebrafish* com fármacos ansiolíticos, como benzodiazepínicos, pode causar efeito sedativo e diminuir atividade locomotora (Gupta *et al.*, 2014; Benneh *et al.* 2017, Chen *et. al.*, 2021). Nesse trabalho, todas as concentrações dos compostos estudados diminuíram a atividade locomotora do ZFa, sugerindo-se, assim, um efeito sedativo das mesmas.

Efeito ansiolítico-símile

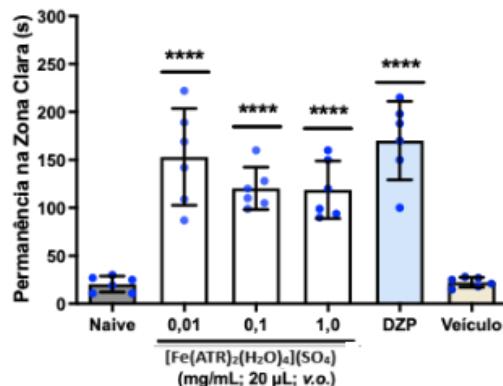
O complexo $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ demonstrou efeito ansiolítico-símile em *zebrafish* adultos no Teste Claro & Escuro. Todos os tratamentos (0,01; 0,1; 1,0 mg/mL; 20 μL ; v.o.) aumentaram significativamente o tempo de permanência na zona clara em comparação aos grupos Naive e Veículo ($p<0,0001$), com efeito semelhante ao do diazepam ($p>0,05$). Esses resultados indicam que o complexo em estudo possui atividade ansiolítica comparável ao fármaco de referência, sugerindo seu potencial em distúrbios de ansiedade (Figura 09).

Figura 09: Efeito ansiolítico-símile do ácido tartárico a), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ b) e $[\text{Fe}(\text{ATR})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{SO}_4)_2$ c) em *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto no Teste do Claro & Escuro (0-5 min).



a)

b)



c)

Naive - animais não tratados. *v.o.* – administração via oral. Veículo – DMSO 3% (20 µL; *v.o.*). DZP – diazepam (Controle ansiolítico; 10 mg/mL; 20 µL; *v.o.*). Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (*****p*<0,0001 vs. Naive ou Veículo).

Fonte: Elaborado pelo autores.

Conclusões

A síntese e caracterização do complexo $[Fe(ATR)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$ confirmaram sua formação e estabilidade. O composto apresentou fluorescência, segurança toxicológica e eficácia farmacológica no modelo *zebrafish*. Tanto o complexo quanto seus precursores exibiram efeito ansiolítico-símile e sedativo, com resposta comparável ao diazepam, porém sem sinais de toxicidade significativa.

Esses achados reforçam o potencial do complexo como candidato promissor ao desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos, unindo atividade terapêutica eficaz, perfil de segurança favorável e a possibilidade de monitoramento por fluorescência, o que pode contribuir para abordagens inovadoras no tratamento de transtornos de ansiedade.

Agradecimentos

Agradecimentos à Universidade Estadual do Ceará (UECE), ao Laboratório de Química Inorgânica (LQUIN), ao Núcleo de biologia experimental (NUBEX), ao Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e ao Grupo de pesquisa Genfisher.

Referências

- AMARAL, E. M. F. Síntese, caracterização, reatividade e ensaios biológicos de complexos de ferro com ligantes macrocíclicos cyclam mono-N-funcionalizados com grupos fluoróforos. Dissertação. UFMT, 2023.
- AQUINO, R.R; A Bioinorgânica e a Doença do Alzheimer (DA): Estudo do Complexo $[Fe(AT)_2(H_2O)_4](SO_4)_2$, onde AT= Ácido Tartárico, Semana Universitária, Universidade Estadual do Ceará, 2022.
- BENNEH, C. K. *et al.* *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, 207, 129-145, 2017.
- CHEN, K. *et al.* Impacts of chronic exposure to sublethal diazepam on behavioral traits of female and male zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 208, 111747, 2021.
- COSTA, W. R. P. Síntese e caracterização de complexos de zinco (II) com tiossemicarbazonas com potencial biológico. 2020. 81 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.
- GUPTA, P. *et al.* Assessment of locomotion behavior in adult zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. **Drug Development and Therapeutics**, 5(2), 127-133, 2014.
- JAYALAKSHMI, S. *et al.* Anxiety, depression, and psychosocial adjustment in people with epilepsy. **Journal of Neurosciences in Rural Practice**, 14(1), 111–118, 2023.
- LACHTER, D. R. Novos complexos de Mn(II), Co(II) e Au(III) com ligantes do grupo das fluorquinolonas: estudos espectroscópicos. Relatório Técnico. PUC-RJ, 2009.
- LEIROSE, G .D.; LOUSTALOT, M. F. G.; OLIVEIRA, A. H.; The application of multi-isotopes for quality control: tartaric acid. **Braz. Ap. Sci. Rev**, Curitiba, 4(6), 3837-3844, .2020.
- LI, C. *et al.* Role of α 1-GABAA receptors in the serotonergic dorsal raphe nucleus in models of opioid reward, anxiety, and depression. **Journal of Psychopharmacology**, 38(2), 188–199, 2024.



MAGALHÃES, F. E. A. *et al.* Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish, New Rochelle*, 14(5), 422-429, 2017.

MATHIVANAN, V. *et al.* Synthesis and characterization of gel-grown cobalt tartrate crystals. *Pramana – Journal of Physics*, 82(3), 537-548, 2014.

NASCIMENTO, M. C. do. Síntese e caracterização do complexo $\text{Fe}(\text{AT})_2(\text{H}_2\text{O})_{42}$, onde AT = ácido tartárico. 2019. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD guideline for testing of chemicals: fish, acute toxicity test. Test no. 203. Paris: OECD, 1992. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>

SHYJU, T. S.; ANANDHI, S.; GOPALAKRISHNAN, R. Comparative studies on conventional solution and Sankaranarayanan-Ramasamy (SR) methods grown potassium sodium tartrate tetrahydrate single crystals. *Cryst. Eng. Comm*, 14(4), 1387–1396, 2012.

SIES, H. *et al.* Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2022 23:7, 23(7), 99–515, 2022.