



INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE AMIDAS GRAXAS SINTÉTICAS EM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Luani C. M. Oliveira¹; Renan L. D. Arrelias²; Irlon M. Ferreira³

1Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada (BIORG), Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Rodovia Josmar Chaves Pinto, km 02, 68903-419, Macapá – AP, Brasil.

Palavras-Chave: Atividade anti-inflamatória, Compostos Bioativos, Amidas graxas.

Introdução

A inflamação é uma resposta fisiológica complexa e essencial do sistema imunológico a agentes agressores, como patógenos, danos teciduais ou irritantes químicos (Etienne, 2021). Embora seja um mecanismo de defesa crucial, a resposta inflamatória desregulada ou crônica está associada a uma variedade de patologias, incluindo artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Cavalier, 2023). O tratamento convencional frequentemente envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e corticosteroides, que, apesar de sua eficácia, podem acarretar efeitos adversos significativos, como complicações gastrointestinais e renais (Silva, 2019).

Essa limitação impulsiona a busca contínua por novos agentes anti-inflamatórios com perfis de segurança mais favoráveis. Neste contexto, os lipídios bioativos, particularmente os derivados de ácidos graxos, emergem como uma classe promissora de moléculas. Ácidos graxos e seus derivados, como ésteres e amidas, são conhecidos por modular diversas vias de sinalização inflamatória (Jorge, 2009). As amidas de ácidos graxos, em específico, vêm ganhando atenção devido ao seu papel endógeno na resolução da inflamação, como observado com as endocanabinoides e as N-aciletanolaminas (De Sá, 2023).

A funcionalização dessas moléculas com grupos hidroxila, como na N-(2-hidroxietil) substituição, pode potencialmente melhorar sua solubilidade e interação com alvos biológicos, modulando a resposta inflamatória de maneira mais eficaz. Diante desse potencial, torna-se essencial avaliar essas novas moléculas em modelos experimentais adequados. Nesse sentido,



o peixe-zebra (*Danio rerio*) destaca-se como um organismo de grande relevância para estudos farmacológicos e toxicológicos. Além de ser um modelo animal eticamente mais aceitável, apresenta características que favorecem sua aplicação científica, como transparência embrionária, alta fecundidade, aproximadamente 70% de homologia genética com humanos e uma resposta inflamatória bem caracterizada (Simonetti, 2014). Ademais, a possibilidade de induzir inflamação de forma controlada, por exemplo com carragenina, consolida o *D. rerio* como um sistema robusto e eficiente para a triagem pré-clínica de novos compostos bioativos, como as amidas graxas.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar novas amidas graxas e avaliar seu potencial anti-inflamatório *in vivo* utilizando um modelo de edema 7 induzido por carragenina em *D. rerio*. Dessa maneira, a hipótese central é de que essas novas amidas graxas exibirão atividade anti-inflamatória significativa, possivelmente mediada pela modulação de mediadores inflamatórios chave, formando novos candidatos a protótipos farmacológicos.

Material e Métodos

Síntese do intermediário éster

Inicialmente foi realizada a síntese de um intermediário éster para aumentar a eletrofilicidade do carbono carbonílico e tornar a reação de amidação mais viável. A reação de esterificação foi conduzida com a seguinte composição: 5 g de ácido palmítico, 23 ml de etanol P.A., com uma razão molar de 1:20 e 1 g de Oxone (20%) como catalisador, sob temperatura de 50°C e durante um período médio de 48 horas. Para isso, foi utilizado um balão de fundo chato de 50 ml, no qual foram adicionados os reagentes mencionados e o conjunto foi direcionado para uma chapa de aquecimento. Após o tempo estipulado de 48 horas, a mistura reacional foi filtrada e transferida para um rotaevaporador, a fim de eliminar o solvente e posteriormente, submetida à estufa para garantir a evaporação total do solvente residual, o mesmo procedimento foi repetido para os ácidos palmítico, láurico e esteárico.

Síntese das amidas graxas

Foi realizada a síntese de amidas graxas dos derivados de éster palmítico láurico e esteárico. Na sequência, foi realizada a reação de amidação conforme a metodologia Lima *et al.* 2017



com adaptações. Para este processo, 1 ml de hexano foi utilizado como solvente, juntamente com 0,192 g de ácido fenilborônico como catalisador, 3 g do éster gerado anteriormente e 1,93 g de etanolamina, razão molar de 1:3. Todos os reagentes foram pesados com precisão e colocados em um balão de fundo redondo de 50 ml. A mistura foi então submetida a um agitador magnético a uma temperatura de 65°C durante 48 horas. Após o término do período de reação, o composto resultante foi posto em estufa para evaporação do solvente.

Purificação das amidas graxas

A formação de possíveis produtos foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). O produto bruto obtido foi submetido a um processo de purificação utilizando cromatografia em coluna utilizando sílica em gel com granulometria mesh 60 como fase estacionária e como eluente os solventes hexano e acetato de etila na proporção 9:1. A purificação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD) para avaliar o progresso e a eficiência do processo de purificação, garantindo a separação dos compostos desejados.

Caracterização dos produtos obtidos

As análises espectroscópicas foram realizadas em parceria com o instituto de química de são carlos-IQSC. Após a purificação, o composto foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) para confirmar sua identidade e verificar a pureza do material obtido. As análises de GC-MS foram realizadas usando um cromatógrafo a gás Shimadzu GC2010plus acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu MS2010plus, operando com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. O GC-MS foi equipado com uma coluna de cromatografia tipo DB5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, J&W Scientific). Esse método analítico permitiu a caracterização detalhada do produto final, assegurando a qualidade e a conformidade com os objetivos da pesquisa.

Indução da inflamação em *Dario rerio*

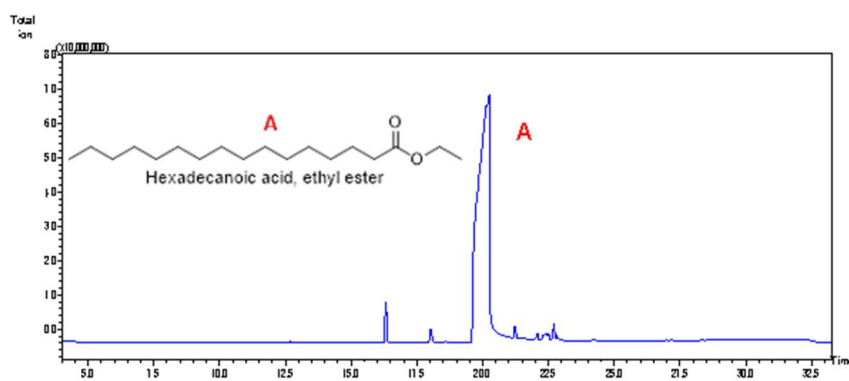
Após a pesagem inicial dos animais (utilizada para calcular o volume a ser administrado de acordo com o peso e análise do edema), cada grupo recebeu o tratamento correspondente via oral. Decorrido o intervalo de 1h, foi realizado a indução de edema abdominal com carragenina, de acordo com metodologia descrita por Borges *et al.* (2018) e Carvalho *et al.* (2018). Os animais foram anestesiados individualmente em água (8-10°C), e a carragenina (300µg),

solubilizada em PBS, foi injetada intraperitonealmente num volume de 20µL. A pesagem final foi realizada 5h após a injeção de carragenina (i.p.) (Borges et al.,2018).

Resultados e Discussão

Reação esterificação

Cromatograma do intermediário éster obtido pela reação de esterificação do ácido palmítico obtido por CG-MS:

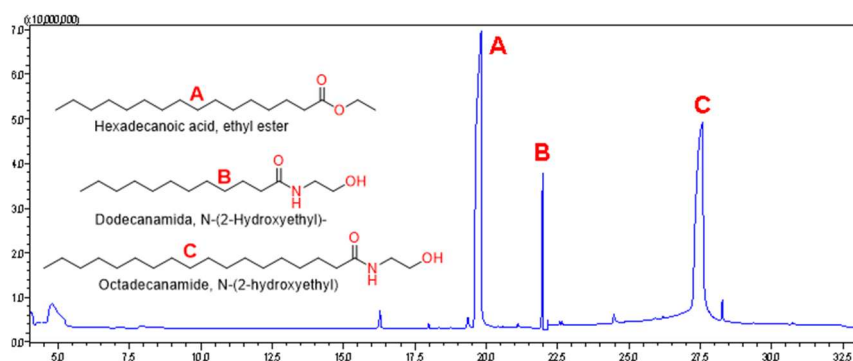


Autor: Autores, 2026.

O pico de maior relevância correspondente ao Hexadecanoic acid, ethyl ester, MM: 284, C₁₈H₃₆O₂, com tempo de retenção de 20 minutos, e com Similaridade: 95% com a biblioteca NIST107.LIB. Essa alta similaridade confirma de forma robusta a identidade do éster sintetizado. A formação deste composto é consistente com a reação entre o ácido palmítico e o etanol, catalisada por condições ácidas, um método clássico e eficiente para a síntese de ésteres. A clareza e intensidade do pico sugerem uma boa conversão da reação e um produto com alta pureza.

Reação de amidação

Abaixo temos o cromatograma da análise por CG-MS da reação de amidação utilizando a etanonalmina:





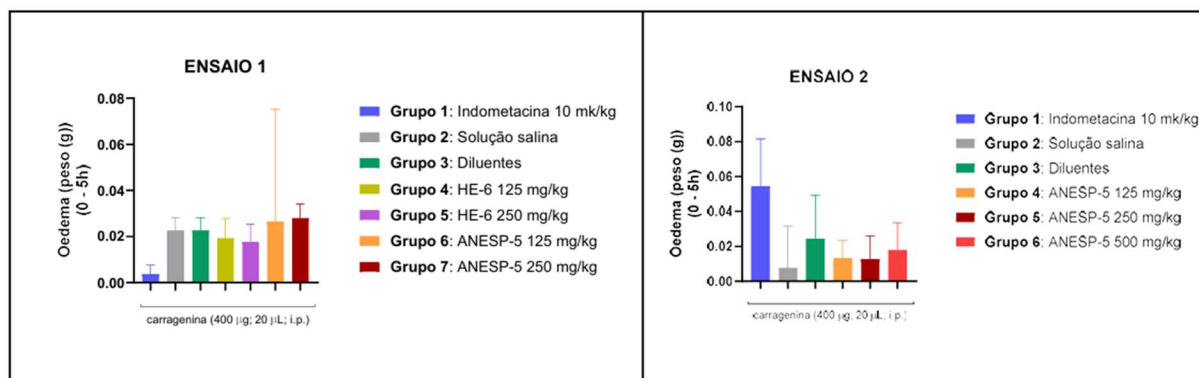
A confirmação da presença de uma amida na análise pode ser observada no segundo pico identificado, correspondente ao composto dodecanamida, N-(2-hidroxietil)- com massa molecular de 243 ($C_{14}H_{29}NO_2$) e similaridade de 93% na biblioteca WILEY8.LIB. Esse pico aparece com um tempo de retenção de aproximadamente 21,98 segundos na análise de etanolamina. A alta similaridade indica uma identificação confiável da amida na amostra. A confirmação da presença de outro tipo de amida também pode ser observada no terceiro pico Octadecanamida, N-(2-hidroxietil) identificado, correspondente ao composto com massa molecular de 327 ($C_{20}H_{41}NO_2$) e similaridade de 85% na biblioteca NIST05s.LIB. Esse pico aparece com um tempo de retenção de aproximadamente de 27,5 minutos. A formação de duas amidas distintas sugere que o precursor de ácido graxo utilizado possuía uma composição mista, contendo cadeias de carbono de diferentes comprimentos (C_{12} e C_{18}). A presença do grupo N-(2-hidroxietil) em ambas as amidas é crucial, pois introduz uma hidrofilicidade na molécula, alterando significativamente suas propriedades físico-químicas comparado às amidas simples. Em suma, as análises por CG-MS validaram não apenas a ocorrência das reações químicas propostas, mas também a identidade e alta pureza dos produtos sintetizados. A formação do éster etílico e das amidas N-(2-hidroxietil) sublinha a seletividade dos métodos utilizados. Estes compostos, particularmente as amidas hidroxiladas, possuem grande relevância industrial e farmacêutica, servindo como intermediários sintéticos valiosos ou ingredientes ativos em diversas formulações.

INFLAMAÇÃO (ZEBRAFISH)

Os ensaios para investigação da atividade anti-inflamatória foram realizados para as amidas graxas denominadas: HE-6, ANESP-5. Os três ensaios realizados avaliaram o potencial anti-inflamatório de diferentes tratamentos em um modelo de edema induzido por carragenina em animais. Em todos os ensaios, a administração de carragenina (400 μ g; 20 μ L; i.p.) foi utilizada para induzir inflamação, e o edema resultante foi quantificado pelo peso do exsudato no período de 0 a 5 horas.



Figura 1. Gráfico de tratamento de anti-inflamatório de amida sintética (ANESP - 5).

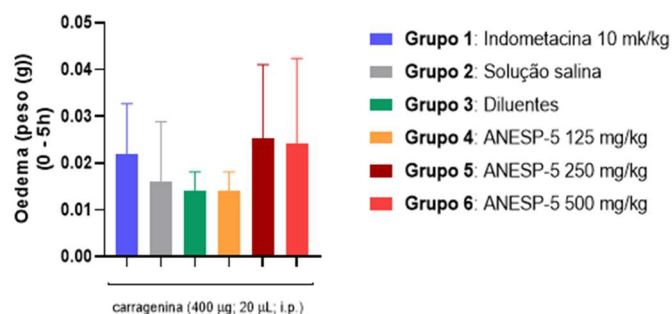


Fonte: Autores, 2026.

No Ensaio 1, os grupos tratados com HE-6 (125 e 250 mg/kg) e ANESP-5 (125 e 250 mg/kg) foram comparados com controles positivos (Indometacina 10 mg/kg), negativos (solução salina) e veículo (diluentes). Os resultados sugerem que tanto HE-6 quanto ANESP-5 nas doses testadas apresentaram atividade anti-inflamatória, com redução do edema em comparação ao grupo salina.

A dose de 250 mg/kg de ANESP-5 mostrou efeito mais pronunciado, aproximando-se da eficácia da indometacina. No Ensaio 2, foram testadas doses crescentes de ANESP-5 (125, 250 e 500 mg/kg). Observou-se uma resposta dose-dependente, com a dose de 500 mg/kg apresentando a maior redução no edema, superando inclusive o efeito da indometacina em alguns parâmetros. Isso indica que ANESP-5 possui potente atividade anti-inflamatória em doses mais elevadas. No Ensaio 3, os resultados corroboraram os achados anteriores, com ANESP-5 nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg demonstrando eficácia significativa na redução do edema induzido por carragenina. A dose de 500 mg/kg novamente se destacou, sugerindo um potencial terapêutico relevante.

Figura 2.



Fonte: Autores, 2026.



A carragenina é um agente pro-inflamatório amplamente utilizado em modelos experimentais de inflamação aguda, e sua inibição por compostos anti-inflamatórios é bem estabelecida. Os resultados aqui obtidos estão em consonância com estudos que demonstram a eficácia de extratos vegetais e derivados no controle da resposta inflamatória. A atividade anti-inflamatória observada para a amida ANESP-5 pode estar relacionada à modulação de vias de sinalização pró-inflamatórias, como a inibição de COX 2 ou a supressão de citocinas inflamatórias, mecanismos comuns a muitos anti inflamatórios não esteroidais (AINEs). Estudos futuros podem investigar os mecanismos moleculares específicos envolvidos.

Conclusões

O presente estudo demonstrou de forma consistente a viabilidade da síntese e caracterização de novas amidas graxas derivadas de ácidos graxos, com a confirmação estrutural por análises de CG-MS. A formação do éster etílico e das amidas N-(2-hidroxietil) evidenciou não apenas a eficiência dos métodos empregados, mas também a introdução de uma modificação estrutural relevante, capaz de alterar significativamente as propriedades físico-químicas dos compostos, conferindo maior versatilidade quanto a potenciais aplicações biológicas e industriais.

Os dados obtidos reforçam que ANESP-5 constitui um candidato promissor para o desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios, ampliando as perspectivas para derivados lipídicos funcionais como alternativas terapêuticas inovadoras. Entretanto, para consolidar seu potencial farmacológico, são necessários estudos complementares, incluindo a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação da resposta inflamatória, além da avaliação detalhada de seu perfil toxicológico, farmacocinético e de segurança em diferentes modelos experimentais. Assim, este trabalho não apenas confirma a aplicabilidade da rota sintética utilizada, mas também abre caminho para futuras investigações que poderão posicionar amidas graxas hidroxiladas, como a ANESP-5, na vanguarda do desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios de origem lipídica.



Agradecimentos

Agradecemos a Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), ao CNPQ (No. 402635/2023-0; 445078/2024-3 e 444009/2024-8) pelo apoio financeiro para a realização da Iniciação Científica concedida pelo Departamento de Pesquisa (DPq) e pelo laboratório de Biocatálise em síntese Orgânica (BIORG).

Referências

- ETIENNE, Rachelle; VIEGAS, Flávia Pereira Dias; VIEGAS JR, Claudio. Aspectos fisiopatológicos da inflamação eo planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. Rev. **Virtual Quim**, v. 13, n. 1, p. 167-191, 2021.
- CAVALIER, Natália Toledo et al. A RELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO CRÔNICA E DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS. Revista Ibero Americana de Humanidades, Ciências e Educação, v. 9, n. 7, p. 1744-1755, 2023.
- SILVA, Mairon Mota et al. O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. Cadernos da **Medicina-UNIFESO**, v. 2, n. 2, 2019.
- JORGE, Neuza. Química e tecnologia de óleos vegetais. São Paulo: **Cultura Acadêmica**, v. 1, p. 165, 2009.
- DE SÁ, Maria Clara Inácio et al. Utilização terapêutica da Palmitoiletanolamida (PEA) como anti-inflamatório e imunomodulador, 2023.
- SIMONETTI, Rajla Bressan. Zebrafish (Danio rerio): futuro do modelo animal em pesquisa biomédica. 2014.