

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NÃO CLÍNICA DO LINALOL EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

Maria Eduarda Xenofonte Carvalho¹, Francisco Lucas Alves Batista², Sandra Maria Barbosa de Araújo³, José Ismael Feitosa de Araújo⁴, Daniela Braga de Sousa⁵, Francisco Ernani Alves Magalhães⁶, Maria Rayane Correia de Oliveira⁷, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins⁸, Irwin Rose Alencar de Menezes⁹

Resumo: Este trabalho reporta a segurança não clínica do linalol em zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa). ZFa (n=6/grupo) foram tratados, via oral (v.o.) com linalol (0,25 ou 1,25 ou 2,5 mg/mL; 20 µL) ou salina 0,9% (veículo; 20 µL) e um grupo de animais sem tratamentos foi incluso (naive). Após 1 hora dos tratamentos, foi analisada atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL) em placas de Petri de vidro durante 0-5 minutos. Em experimento subsequente, ZFa (n=8/grupo) foram tratados novamente com linalol ou veículo. Após 24 h e até 96 h foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a DL50 através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95%. O estudo foi aprovado pela CEUA-UECE (7210149/2016). Não houve comprometimento locomotor dos ZFa tratados com linalol ou veículo. O linalol não se mostrou tóxico para os ZFa (LC₅₀ > 2,5 mg/mL). A partir destes resultados, o linalol pode ser considerado seguro em testes farmacológicos utilizando o Zebrafish (*Danio rerio*) adulto como modelo animal.

Palavras-chave: Linalol. Toxicidade. Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

¹ Universidade Regional do Cariri, email: eduardaxenofonte01@gmail.com

² Universidade Regional do Cariri, email: flucasbatista@outlook.com

³ Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, email: sandra.taua@hotmail.com

⁴ Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, email: joseismael.feitosa@gmail.com

⁵ Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, email: 01danielabraga@gmail.com

⁶ Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, email: fernanimagalhaes@yahoo.com.br

⁷ Universidade Estadual do Ceará, email: rayaneoliveirabio@gmail.com

⁸ Universidade Regional do Cariri, email: anitaoliveira24@yahoo.com.br

⁹ Universidade Regional do Cariri, email: irwinalencar@yahoo.com.br

1. Introdução

O linalol é um monoterpene e é frequentemente encontrado como componente principal em óleos essenciais de várias espécies de plantas aromáticas (SOUTO-MAIOR et al., 2017). Algumas espécies produtoras de linalol são usadas na medicina tradicional como sedativos, analgésicos,

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



ansiolíticos e hipnóticos para aliviar os sintomas e tratar doenças (LINCK et al., 2010). Diante disso, para aumentar nosso conhecimento sobre sua segurança para uso terapêutico, muitos estudos com esse monoterpene foram realizados (ELISABETSKY et al., 1995, 1999; MIYASHITA e SADZUKA 2013).

Recentemente, modelos substitutivos vêm sendo empregados, tais como o zebrafish (*Danio rerio*) (CHALLAL et al., 2014). O zebrafish (*Danio rerio*) é um teleosteo pequeno, de água doce, da família Cyprinidae, e com baixo custo, fácil manipulação e rápido desenvolvimento, além de possuir homologia genética humana em torno de 70 a 80% (CURTRIGHT et al., 2015).

2. Objetivo

Analisar a segurança não clínica do linalol em zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

3. Metodologia

3.1. Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Foi realizado o teste de campo aberto conforme descrito por Magalhães et al. (2017). Inicialmente, os animais (n=6/grupo) foram tratados, com o linalol (0,25 ou 1,25 ou 2,5 mg/mL; 20 µL; v.o.) ou veículo (Salina 0,9%; 20 µL; v.o.). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 1 hora dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro para a análise da atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL) durante 0-5 minutos.

3.2. Toxicidade aguda 96 h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*Danio rerio*) adulto conforme diretrizes da OECD e descrita por Batista et al. (2018). Os animais (n=6/cada) foram tratados, com linalol (0,25 ou 1,25 ou 2,5 mg/mL; 20 µL; v.o.) ou veículo (Controle; Salina 0,9%; 20 µL; v.o.). Posteriormente, os animais ficaram em repouso e após 24 h e até 96 h foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a DL₅₀ através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUIAR et al., 2018).

4. Resultados

4.1. Avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

O linalol (0,25 ou 1,25 ou 2,5 mg/mL; 20 µL; v.o.) não alterou a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto, quando comparado com os controles ($p > 0,05$ vs. Naive ou Veículo), Fig. 1.

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

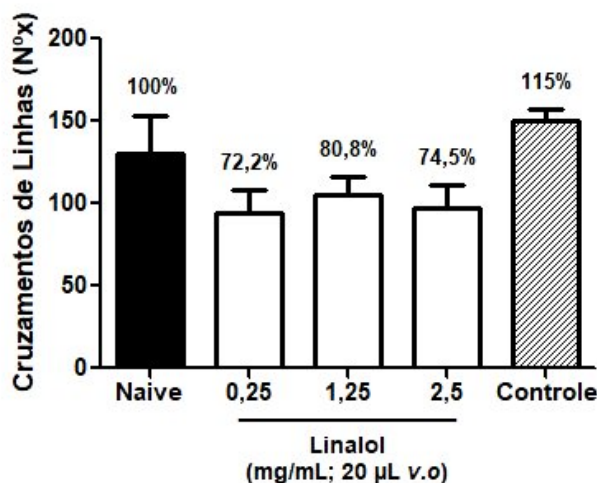
XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



Fig. 1. Efeito do linalol sob a atividade locomotora de zebrafish (*Danio rerio*) adulto, analisados individualmente durante 0-5 min no Teste de campo aberto.



Cada coluna representa a média \pm desvio padrão ($n = 6$ /grupo). Números acima das barras indicam a porcentagem de atividade locomotora. One-way ANOVA com teste post-hoc de Tukey. Controle: veículo (Salina 0,9%). Naive - grupo não tratado.

Esses resultados são considerados importantes, pois segundo Batista et al. (2017) o linalol pode ser relevante no desenvolvimento de novos medicamentos clinicamente relevantes para o tratamento da dor persistente dentre outras ações.

4.2. Toxicidade aguda 96 h

Linalol (0,25 ou 1,25 ou 2,5 mg/mL; 20 μ L; v.o.) não causou mortalidade do zebrafish (*Danio rerio*) adulto até 96 h de análise ($DL_{50} > 2,5$ mg/mL), Tabela 1.

Tabela 1. Resultados do teste de toxicidade aguda para o Linalol frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Amostra	Mortalidade de ZF adulto					CL ₅₀ (μ g/mL) / LC (95%)
	CN	CP	CA1	CA2	CA3	
Linalol	0	8	0	0	1	> 1000 / nd

CN - Grupo controle negativo: DMSO 3%; CP - Grupo controle positivo: NaClO a 2,5%; CA1 – concentração da amostra 1 (0,25 mg/mL); CA2 – concentração da amostra 2 (1,25 mg/mL); CA3 – concentração da amostra 3 (2,5 mg/mL); CL₅₀-concentração letal para matar 50% dos ZF's adultos; LC – limite de confiança; nd – não determinado;

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



Embora os resultados acima já tenham sido encontrados por Singulani et al. (2018) em embriões de zebrafish (*Danio rerio*) adulto, os mesmos são importantes pois foram mais eficientes em doses maiores testadas com adultos de zebrafish, não apresentando efeito tóxico.

5. Conclusão

Conclui-se que, não houve comprometimento locomotor dos ZFs tratados com linalol, em que o mesmo não apresentou efeito tóxico com uma LC_{50} maior que 2,5 mg/mL. Desta forma, o linalol pode ser utilizado de forma segura em testes farmacológicos utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) adulto como modelo animal.

6. Agradecimentos

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). Ao grupo de Pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais (BIOREN) da Universidade Estadual do Ceará (UECE-CECITEC/TAUÁ). Ao Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

7. Referências

ARELLANO-AGUIAR, O.; SOLIS-ANGELES, S.; SERRANO-GARCIA, L.; MORALES-SIERRA, E.; MENDEZ-SERRANO, A.; MONTERO-MONTOYA, R. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **J. Fisheriesciences.com**, 9(4):052–062, 2015.

BATISTA, F. L. A.; LIMA, L.M.G.; ABRANTE, I. A.; ARAÚJO, J. I. F.; BATISTA, F. L. A.; ABRANTE, I. A.; MAGALHÃES, E. A.; LIMA, D. R.; LIMA, M. C. L.; PRADO, B. S.; MOURA, L. F. W. G.; GUEDES, M. I. F.; FERREIRA, M. K. A.; MENEZES, J. E. S. A.; SANTOS, S. A. A. R.; MENDES, F. R. S.; MOREIRA, R. A.; MOREIRA, A. C. O. M.; CAMPOS, A. R.; MAGALHÃES, F. E. A. Antinociceptive activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion pathways in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 108:408-416, 2018.

BATISTA, P.A.; WERNER, M.F.; OLIVEIRA, E.C.; BURGOS, L.; PEREIRA, P.; BRUM, L.F.; STORY, G.M.; SANTOS, A.R. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. **J Pain.**, 11(11):1222-1229, 2010.

CHALLAL, S.; BUENAFE, O.E.; QUEIROZ, E.F.; MALJEVIC, S.; MARCOURT, L.; BOCK, M.; KLOETI, W.; DAYRIT, F.M.; HARVEY, A.L.; LERCHE, H.; ESGUERRA, C.V.; DE WITTE, P.A.; WOLFENDER, J.L.; CRAWFORD, A.D. Zebrafish bioassay-guided microfractionation identifies anticonvulsant steroid

IV SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXII Semana de Iniciação Científica

21 a 25 de outubro de 2019

Tema: "Desmonte da Pesquisa, Ciência e Tecnologia: repercussões e impactos tecnológicos, sociais e culturais"



glycosides from the Philippine medicinal plant *Solanum torvum*. **ACS Chem Neurosci.**, 5(10):993-1004, 2014.

CURTRIGHT, A.; ROSSER, M.; GOH, S.; KEOWN, B.; WAGNER, E.; SHARIFI, J.; RAIBLE, D.W.; DH; AKA, A. Modeling nociception in zebrafish: a way forward for unbiased analgesic discovery. **PLoS One**, 10(1):e0116766, 2015.

ELISABETSKY, E.; MARSCHNER, J.; SOUZA, D.O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochem Res.**, 20:461–565, 1995.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L.F.; SOUZA, D.O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, 6:107–113, 1999.

LINCK, V.M.; SILVA, A.L.; FIGUEIRÓ, M.; CARAMÃO, E.B.; MORENO, P.R.; ELISABETSKY, E. Effects of inhaled linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, 17:679–683, 2010.

MAGALHÃES, F.E.A.; DE SOUSA, C.A.P.B.; SANTOS, S.A.A.R.; MENEZES, R.B.; BATISTA, F.L.A.; ABREU, A.O.; DE OLIVEIRA, M.V.; MOURA, L.F.W.G.; RAPOSO, R.S.; CAMPOS, A.R. Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, 4(5):422-429, 2017.

MIYASHITA, M. AND SADZUKA, Y. Effect of linalool as a component of *Humulus lupulus* on doxorubicin-induced antitumor activity. **Food Chem Toxicol.**, 53:174–179, 2013.

OECD Guideline for Testing Acute Toxicity in Fishes, (1992) Test No. 1992. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Accessed 14, May 2019.

SINGULANI, J.L.; PEDROSO, R.S.; RIBEIRO, A.B.; NICOLELLA, H.D.; FREITAS, K.S.; DAMASCENO, J.L.; VIEIRA, T.M.; CROTTI, A.E.; TAVARES, D.C.; MARTINS, C.H.; MENDES-GIANNINI, M.J.; PIRES, R.H. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiol.**, 13:1637-1646, 2018.

SOUTO-MAIOR, F.N.; FONSÊCA, D.V.; SALGADO, P.R.; MONTE, L.O.; DE SOUSA, D.P.; DE ALMEIDA, R.N. Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpene linalool oxide. **Pharm Biol.**, 55(1):63-67, 2017.