

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NÃO CLÍNICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocimum basilicum* LINN EM ZEBRAFISH (*Daniorerio*) ADULTO

Maria Eduarda Xenofonte Carvalho¹, Francisco Lucas Alves Batista², Maria Gabriely de Lima Silva³, Maria Rayane Correia de Oliveira⁴, Isabel Sousa Alcântara⁵, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins⁶, Francisco Ernani Alves Magalhães⁷, Irwin Rose Alencar de Menezes⁸

Resumo: Este trabalho reporta a segurança não clínica do óleo essencial das folhas de *Ocimum basilicum* Linn (OEFOb) em zebrafish (*Daniorerio*) adulto (ZFa). ZFa (n=6/grupo) foram tratados, via oral (v.o) com OEFOb (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 OEFOb 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). Concluiu-se de suma importância a extração do OEFOb neste estudo realizado. Não houve comprometimento locomotor dos ZFa tratados com OEFOb ou veículo. O OEFOb não se mostrou tóxico para os ZFa (LC₅₀ > 2,5 mg/mL). Diante destes resultados, o OEFOb pode ser considerado seguro em testes farmacológicos utilizando o Zebrafish (*Daniorerio*) adulto como modelo animal.

Palavras-chave: *Ocimum basilicum* Linn. Toxicidade. Zebrafish (*Daniorerio*) adulto.

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

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

³ Universidade Regional do Cariri, email: gabriellyscience@gmail.com

⁴ Universidade Estadual do Ceará, email: rayaneoliveirabio@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pernambuco, email: isabel-alcantara-@hotmail.com

⁶ Universidade Regional do Cariri, email: anitaoliveira24@yahoo.com.br

⁷ Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, email: fernanimagalhaes@yahoo.com.br

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

1. Introdução

O gênero *Ocimum* (Lamiaceae) é constituído por mais de 150 espécies originárias de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América Central e do Sul (LABRA et al., 2004). O manjeriço (*Ocimum basilicum*) faz parte de um grupo de plantas medicinais e aromáticas de grande valor econômico, pois é

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



muito utilizada para diversos fins, como ornamental, condimentar, medicinal, aromática, na indústria farmacêutica e de cosméticos e para produção de óleo essencial, sendo esta última característica a mais valorizada (ROSAS et al., 2004).

Um aspecto muito importante na obtenção dos extratos de plantas aromáticas diz respeito ao método de extração empregado (MAZUTTI et al., 2006). O óleo essencial dessa planta tem sido utilizado nas indústrias de alimentos como flavorizante para produtos de confeitaria, bebidas não alcoólicas, sorvetes e como condimentos e na indústria de cosméticos (BOZIN et al., 2006).

Recentemente, modelos substitutivos vêm sendo empregados, tais como o zebrafish (*Daniorerio*) (CHALLAL et al., 2014). O zebrafish (*Daniorerio*) é um teleósteo 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).

O zebrafish (*Daniorerio*) possui uma série de atributos que se prestam a investigações sobre a biologia da nocicepção. Pode, portanto, ser vantajoso desenvolver ensaios fenotípicos de alto rendimento para modelar comportamentos nociceptivos complexos nos quais se pode pesquisar novos analgésicos de maneira imparcial (CURTRIGHT et al., 2015).

2. Objetivo

Analisar a segurança não clínica do óleo essencial das folhas de *Ocimum basilicum* Linn em zebrafish (*Daniorerio*) adulto.

3. Metodologia

3.1. Extração do óleo essencial

Três gramas de folhas frescas foram adicionados a 150 ml de água em um frasco de 500 ml. A mistura foi hidro-destilada até 50 ml foram recuperados. O destilado foi extraído três vezes com éter etílico recentemente destilado. O solvente foi removido em temperatura ambiente e o óleo essencial diluído com etil acetato a 5 mg / ml. Uma alíquota foi injetada no capilar Cromatográfico GC-MS. Para cada cultivar três diferentes extrações foram realizadas (LABRA et al., 2004).

3.2. 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 OEFOb (0,25 ou 1,25 ou 2,5 mg/mL; 20 µL; v.o.) ou veículo (controle; salina 0,9%; 20 µL; v.o.). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive).

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



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.

3.3. Toxicidade aguda 96 h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*Daniorerio*) adulto conforme diretrizes da OECD (2019) e descrita por Batista et al. (2018). Os animais (n=8/cada) foram tratados, com OEFOb (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 então determinado a DL₅₀ através do método matemático TrimmedSpearman-Karber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUIAR et al., 2015).

A Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) tem por finalidade avaliar do ponto de vista ético e legal as atividades de ensino e pesquisa desenvolvidas com animais, fazendo cumprir o disposto na lei aplicável à criação e/ou utilização de animais para ensino e pesquisa (especialmente a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 e o Decreto nº 6.899 de 15/07/2009) bem como o seu Regimento.

4. Resultados

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

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

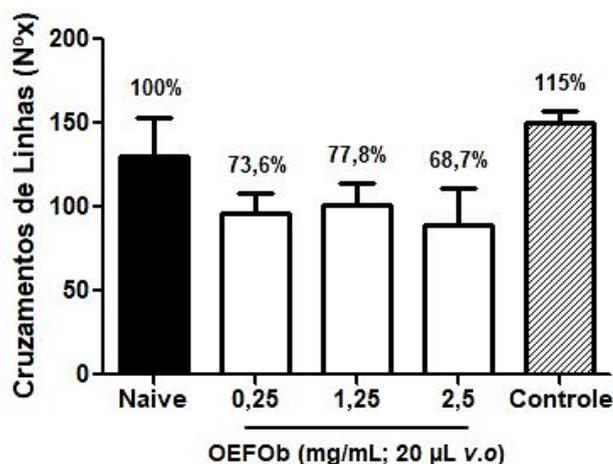
Figura 1. Efeito do OEFOb sob a atividade locomotora de zebrafish (*Daniorerio*) adulto, analisados individualmente durante 0-5 min no Teste de campo aberto.

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



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.

4.2. Toxicidade aguda 96 h

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

Tabela 1. Resultados do teste de toxicidade aguda para o OEFOb frente a zebrafish (*Daniorerio*) adulto.

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

OEFOb - óleo essencial das folhas de *Ocimum basilicum* Linn; ZF - zebrafish; 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;

5. Conclusão

Conclui-se que, não houve comprometimento locomotor dos ZFs tratados com OEFOb, bem como o mesmo não apresentou efeito tóxico com uma LC₅₀ maior que 2,5 mg/mL. Desta maneira, o OEFOb pode ser usado de forma segura em testes farmacológicos utilizando o zebrafish (*Daniorerio*) adulto como modelo animal.

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



6. Agradecimentos

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao grupo de Pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais (BIOREN) da Universidade Estadual do Ceará (UECE-CECITEC/TAUÁ). E 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. Fisheries Sciences**, 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.;

BOZIN, B.; Mimica-Dukic, N.; Samojlik, I.; Jovin, E. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.54, n.5, p.1822-1828, 2006.

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 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.

LABRA, M. et al. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**, v.167, p.725-731, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TBH-4CG0MC1-1&_user=686379&_coverDate=10%2F31%2F2004&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000037538&_version=1&_urlVersion=0&_userid>

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino,
pesquisa e extensão"



[=686379&md5=c92ce5764d11de096959e809f8211357>](#). Acesso em: 20 abr. 2009. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.04.026.

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. Adultzebrafish (Daniorerio): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, 4(5):422-429, 2017.

MAZUTTI, M.; BELEDELLI, B.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; PAROUL, N. Chemical characterization of *Ocimum basilicum* L. extracts obtained by high pressure CO₂ extraction. **Quím. Nova** vol.29 no.6 São Paulo Nov./Dec. 2006.

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.

ROSAS, J.F.; SILVA, A.C.M.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. 2004. Comparação dos voláteis das folhas de *Ocimum micranthum* Willd. obtidos por hidrodestilação e destilação-extração simultânea. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 7: 26-29.