

# XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018  
Universidade Regional do Cariri

## EFEITO ANSIOLÍTICO-SÍMILE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA JUREMA BRANCA (*Piptadenia stipulacea*, FABACEAE) EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

**Luiza Michelly Gonçalves Lima (PG)<sup>1,2</sup>; Francisco Bastos Cavalcante Sobrinho<sup>2</sup> (IC); Luiz Francisco Wemmenon Gonçalves Moura<sup>2</sup> (PQ); Francisco Ernani Alves Magalhães<sup>2\*</sup> (PQ)**

1. Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Ceará (UECE), CECITEC, Tauá-CE; \*[michellylima2014@outlook.com](mailto:michellylima2014@outlook.com)
2. Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará (UECE), CECITEC, Tauá-CE; \*[fernanimagalhaes@yahoo.com.br](mailto:fernanimagalhaes@yahoo.com.br);

### Resumo:

A ansiedade é definida como um estado emocional negativo. É uma reação de defesa caracterizada por sentimento de apreensão, incerteza, preocupação, inquietação e tensão. Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial ansiolítico-símile do extrato etanólico das folhas de jurema branca (*Piptadenia stipulacea*, Fabaceae) (EtFoJBr) frente ao zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa). Realizou-se o Teste do Claro & Escuro. ZFa machos e fêmeas, foram tratados, via intraperitoneal (*i.p.*), com soluções de EtFoJBr (1,0 ou 2,5 ou 5,0 mg/mL; 20 µL), veículo (DMSO 3%) ou Diazepam (5,0 mg/mL; 20 µL). Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Os animais foram, individualmente, adicionados na zona clara do aquário e o efeito ansiolítico-símile foi quantificado em porcentagem de permanência na zona clara (%PZC), durante 5 min de análise. EtFoJBr (1,0 ou 5,0 mg/mL; 20 µL) apresentou efeito ansiolítico-símile significativamente semelhante ao DZP. Novos estudos devem ser realizados para investigação do possível mecanismo de ação.

**Palavras-chave:** Jurema branca (*Piptadenia stipulacea*); Ansiedade; Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

### Introdução

A ansiedade é definida como um estado emocional negativo, é uma reação de defesa caracterizada por sentimento de apreensão, incerteza, preocupação, inquietação e tensão (ENNACEUR, 2014). Os tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis para transtornos da ansiedade são os benzodiazepínicos, considerados fármacos de primeira escolha no tratamento da ansiedade, mas infelizmente estão relacionados com a ocorrência de vários efeitos adversos tais como sedação, tolerância e amnésia (MANSOURI et al., 2014).

A utilização de plantas é uma prática comum na medicina tradicional brasileira e está fundamentada no acúmulo de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por grupos étnicos (SALDANHA, 2013). A jurema-branca (*Piptadenia stipulacea*), Fabaceae-Min, é uma planta comum no Nordeste

brasileiro é conhecida também como carcará, jurema e rasga-beiço. É utilizada na medicina popular como anti-inflamatório a partir do decocto ou tintura preparados principalmente com a casca do caule. Sua constituição química e propriedades terapêuticas, ainda são pouco conhecidas, o que sugere investigação sobre esse aspecto (**BEZERRA et al., 2011**).

Nativo do sudoeste da Ásia, o peixe conhecido popularmente por zebrafish pertence à espécie *Danio rerio*, possui alta similaridade fisiológica com os seres humanos, apresenta respostas comportamentais robusta e tem seu genoma inteiramente sequenciado e caracterizado (**CACHAT, 2013**).

Baseando-se no exposto, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial ansiolítico-símile do extrato etanólico das folhas de jurema branca (*Piptadenia stipulacea*, Fabaceae) (EtFoJBr) frente ao zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa).

## **Material e métodos**

### **Extrato vegetal**

Nesse trabalho foi utilizado o extrato etanólico das folhas da jurema branca (EtFoJBr; *Piptadenia stipulacea*, Fabaceae; #57583-UFC), coletada (SISBIO; # 29145-3) em Tauá-CE (40° 23' 3.036" W; 5° 56' 59.844" S), o qual encontrava-se armazenado na geladeira (5° C) (**FRANCA, 2016**).

### **Animais**

Animais zebrafish adulto (ZFa) com 60 a 90 dias ( $0,4 \pm 0,1$  g), selvagens, de ambos os sexos, foram obtidos de um fornecedor comercial (Fortaleza, CE). Os animais foram mantidos em aquário de vidro ( $n=5/L$ ), à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , em ciclos de claro-escuro por 24 h. Água foi tratada com anticloro (*ProtecPlus*<sup>®</sup>). Os bioensaios realizados estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (#7210149/2016). Após os experimentos, os animais foram sacrificados por congelamento, imersos em água gelada ( $2-4^\circ\text{C}$ ), por 10 min até perda de movimentos operculares (CONCEA, 2018).

### **Teste do Claro & Escuro**

Esse teste se baseia na aversão inata dos zebrafish a áreas bem iluminadas, similar ao dos roedores. O teste foi realizado num aquário de vidro (30 x 15 x 20 cm) com uma zona clara e uma escura. O aquário foi cheio com 3 cm de água da torneira, pré-tratada com anticloro e livre de drogas, pois sendo raso restringe do aquário habitacional, que é um comportamento de ansiedade bem estabelecida num novo ambiente. Os animais ( $n=6/\text{grupo}$ ) foram tratados via intraperitoneal com EtFoJBr (1,0 ou 2,5 ou 5,0 mg/mL; 20  $\mu\text{L}$ ) ou veículo (Controle, DMSO 3%; 20  $\mu\text{L}$ ) ou diazepam (DZP; 5,0 mg/mL; 20  $\mu\text{L}$ ) preparada com salina suplementada de Tween 80 a 1%. Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluso. Após 30 min dos tratamentos, os animais foram, individualmente, adicionados na zona clara do aquário e teve o efeito ansiolítico-símile

quantificado como porcentagem de permanência na zona clara (%PZC), durante 5 min de análise (GEBAUER et al., 2011).

### Análise estatística

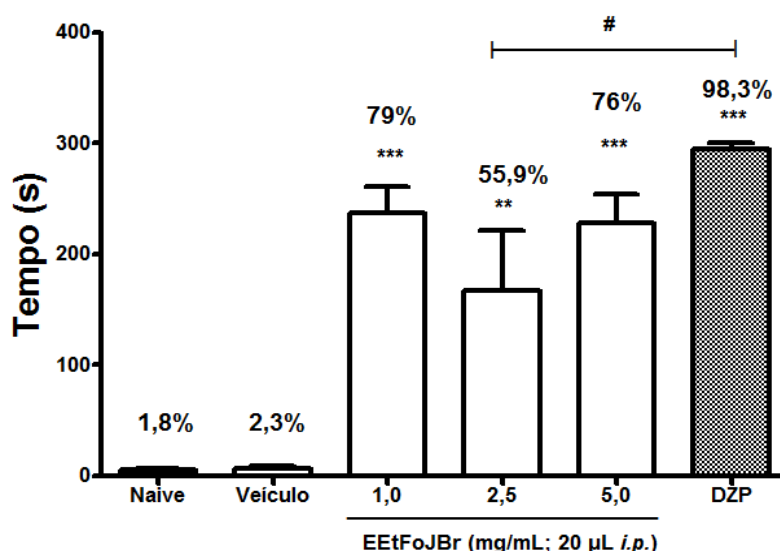
Os resultados foram expressos como valores da média  $\pm$  erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 5.01, com o nível de significância estatística estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

### Resultados e Discussão

Diversos trabalhos já reportados na literatura empregam os camundongos como modelo animal para descobrir novas drogas ansiolíticas (DE LORENZO, 2000). Porém, novos estudos com drogas ansiolíticas vêm sendo desenvolvidos empregando-se o ZFa como método alternativo ao uso de animais de laboratório (GEBAUER et al., 2011).

Em nossos trabalhos anteriores com as folhas da jurema branca detectamos efeito sedativo, pois no teste de campo aberto, EtFoJBr (1,0 ou 2,5 ou 5,0 mg/mL; 20  $\mu$ L; *i.p.*) diminuiu atividade locomotora dos zebrafish (LIMA et al., 2018).

Para confirmar se EtFoJBr também apresenta efeito ansiolítico, empregamos o Teste do Claro & Escuro, um dos métodos mais utilizados em testes ansiolíticos com Zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Nesse teste, os animais não tratados com drogas ansiolíticas apresentam o mesmo comportamento apresentado em camundongos, tendo aversão a zonas claras, conforme assinala Gebauer et al. (2011). Como resultado do nosso trabalho, EtFoJBr (1,0 ou 5,0 mg/mL; 20  $\mu$ L; *i.p.*) causou efeito ansiolítico-símile, significativamente semelhante ao diazepam, controle ansiolítico ( $TC_{DZP} = 98,3\%$ ), Figura 1.



**Figura 1.** Efeito ansiolítico-símile do EtFoJBr em zebrafish adulto no teste do Claro & Escuro, analisados individualmente (0-5 min). Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de permanência do zebrafish adulto na zona clara. EtFoJBr – Extrato etanólico das folhas da jurema branca; Naive – Animais não tratados; Veículo – DMSO 3% (20  $\mu$ L, *i.p.*); DZP – Diazepam (5,0 mg/mL; 20  $\mu$ L; *i.p.*).

Nossos resultados corroboram com dados reportados por **Bernardi, Dias e Barbosa (2013)**. Nesse trabalho, os autores avaliaram o efeito ansiolítico em Zebrafish das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (Nim ou Neem) comercializadas, utilizando o teste de Claro & Escuro.

Os resultados apresentados nesse trabalho são considerados importantes, pois reporta os primeiros relatos do potencial ansiolítico das folhas da jurema branca.

### **Conclusão**

Conclui-se que o extrato etanólico das folhas jurema branca (EtFoJBr), coletada em Tauá-CE, apresentou efeito ansiolítico-símile em zebrafish adulto. Novos estudos farmacológicos serão realizados para investigar possíveis mecanismos de tal extrato.

### **Agradecimentos**

A todos os colaboradores do Grupo de Pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais (BIOREN) da Universidade Estadual do Ceará (Campus CECITEC, Tauá-CE). Ao Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR (NUBEX). A UECE, CNPq e FUNCAP pelo apoio e suporte financeiro.

### **Referências**

- BERNARDI, M. M.; DIAS, S. G.; BARBOSA, V. E. **Neurotoxicity of neem commercial formulation (*Azadirachta indica* A. Juss) in adult zebrafish (*Danio rerio*)**. Environ ToxicolPharmacol, v.36(3), p.1276-82, 2013.
- BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, F.F.G.; DA COSTA, J.G.M.; PEREIRA, A.V.; DE SOUSA, E.O.; RODRIGUES, O.G. **Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (B enth) Ducke**. Acta Scientiarum. Biological Sciences, 33(1), p. 99-106, 2011.
- CACHAT, J., KYZAR, E. J., COLLINS, C., GAIKWAD, S., GREEN, J., ROTH, A., EL-OUNSI, M., DAVIS, A., PHAM, M., LANDSMAN, S., STEWART, AM., KALUEFF, A. V. Unique and potent effects on the developing zebrafish: The developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. **Behav Brain Res**, v. 236, p. 258-269, 2013.
- CONCEA, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 37, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2018. Diretrizes da prática de Eutanásia. Disponível em: [www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22\\_02\\_18.pdf](http://www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf). Acesso em: 23 de abril de 2018.
- DE LORENZO, M. A. (2000). **Estudo do efeito tipo ansiolítico da *C. carthagenensis* (JACQ.) J.F. MACBR. (Sete Sangrias) em camundongos**. 115p. Dissertação: Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.

- ENNACEUR, A. **Tests of unconditioned anxiety - Pitfalls and disappointments.** *Physiology & Behavior*, v. 135, p. 55-71, 2014.
- FRANCA, M. G. A. (2016). **Bioprospecção de atividade toxicológica, fitoquímica e antioxidante de extratos etanólicos das folhas, cascas e galhos da jurema branca (*Piptadenia stipulacea*, Fabaceae), coletada na Caatinga da Região dos Inhamuns do Nordeste Brasileiro.** 48 pg. *Monografia. Especialização em Ensino de Ciências e Matemática.* Universidade Estadual Vale do Acaraú, Tauá, Ceará, Brasil.
- GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A. 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.
- LIMA, L.M.G.; SILVA, F.E.S.; SANTOS, C.O.; BARROSO, S.M.; LIMA, M.C.L.; MAGALHÃES, F.E.A. uso do zebrafish (*danio rerio*) adulto para avaliação da segurança não clínica do extrato etanólico das folhas da jurema-branca (*piptadenia stipulacea*, fabaceae). Im: VI Animal Lab. Universidade Estadual do Ceará **Anais...** Fortaleza-ce, 2018.
- MAGALHÃES, F.E.A, DE SOUSA, C.A.P.B, SANTOS, S.A.A.R, MENEZES, R.B., BATISTA, F.L.A., ABEU, A.O.; DE OLIVEIRA, M.V.; MOURA, L.F.W.G.; RAPOSO, R.S.; CAMPOS, A.R. **Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception.** *Zebrafish*. DOI. 10.1089/zeb.2017.1436, 2017.
- MANSOURI, M.T.; SOLTANI, M.; NAGHIZADEH, B.; FARBOOD, Y.; MASHAK, A.; SARKAKI, A. A possible mechanism for the anxiolytic-like effect of gallic acid in the rat elevated plus maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 40-46, 2014.
- SALDANHA, L.L.(2013). **Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrciabellacambess*.** p.161. *Dissertação.* Mestrado em Ciências Biológicas. Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP. Botucatu.