

# AValiação DA SEGURANÇA NÃO CLÍNICA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE *Ziziphus cortinifolia* Reissek EM ZEBRAFISH

Djane Ventura de Azevedo<sup>1,2\*</sup>; José Ismael Feitosa de Araujo<sup>1</sup>; Daniela Braga de Sousa<sup>1</sup>; Francisco Bastos Cavalcante<sup>1</sup>; Sandra Maria Barbosa de Araújo<sup>1</sup>; Francisco Ernani Alves Magalhães<sup>1,2\*</sup>; Maria Izabel Florindo Guedes<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Centro de Educação, Ciências e Tecnologia da Região dos Inhamuns (CECITEC), Universidade Estadual do Ceará; Rua Solon Medeiros, S/N, BR 020, CEP 63660-000 – Bezerra e Souza, Tauá-CE, Brasil; \*[ernani.magalhaes@uece.br](mailto:ernani.magalhaes@uece.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia (LBBM), Centro de Ciências da Saúde. Av. Silas Munguba, 1700, Itaperi, CEP 60.740-000, Fortaleza-Ce, Brasil; \*[djane.azevedo@uece.br](mailto:djane.azevedo@uece.br); [florinf@uol.com.br](mailto:florinf@uol.com.br)

## RESUMO

*Ziziphus cortinifolia* Reissek é uma planta utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e cicatrizante. Esse estudo avalia a segurança não clínica de extratos etanólicos de folhas (EEFoJ), caule (EECJ), galhos (EEGJ) e raízes (EERJ) frente a *Danio rerio* (Zebrafish-ZFa). ZFa (60-90 dias, 0,4±0,1 g; n=6/grupo), machos e fêmeas, foram tratados, via intraperitoneal (*i.p.*), com soluções dos extratos vegetais (0.5 ou 1.0 ou 5.0 ou 10.0 ou 50.0 ou 100.0 mg/ml; 20 µl (*i. p.*) ou veículo (Controle, DMSO 3 %, 20 µL). Um grupo sem tratamentos (Naive), também foi incluído. Após 30 min dos tratamentos, os animais foram transferidos para placas de Petri (10 x 15 cm), e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6), analisados por ANOVA seguindo do teste de Tukey com (p<0,05.). A cada 24 h e até 96 h dos tratamentos, a concentração que mata 50 % (CL<sub>50</sub>) foi determinada (Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95%). Tais protocolos foram aprovados pela CEUA-UECE (#7210149/2016). Os extratos vegetais (0,5 ou 1,0 ou 5,0 mg/ml; 20 µL; *i.p.*) não alteraram o comportamento locomotor dos animais e tais concentrações não se mostraram tóxicas. Somente o extrato das cascas (EEtCZc) alterou locomoção dos zebrafish se comparada ao naive. As concentrações não letais de tais extratos permitem avaliar os efeitos farmacológicos (antinocicepção, ansiedade e anticonvulsão) de *Ziziphus cortinifolia* Reissek frente a zebrafish.

**Palavras chaves:** Compostos bioativos, toxicidade, campo aberto

## ABSTRACT

*Ziziphus cortinifolia* Reissek is a plant used in folk medicine as an anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and healing agente. This study evaluation of non-clinical safety of ethanol extracts from leaves (EEFoJ), stem (EECJ), branches (EEGJ) e roots (EERJ) agaisnt *Danio rerio* (zebrafish) ZFa (60-90 days ,0,4±0,1 g; n=6/grupo), males and females were treated , via intraperitoneally (*i.p.*), with solutions of plants extracts (0.5 or 1.0 or 5.0 or 10.0 or 50.0 or 100.0 mg/ml; 20 µl (*i. p.*) ou vehicle (Control, DMSO 3 %, 20 µL).A group without treatments (Naive), was also included. After 30 min of treatments, the animals were transferred to Petri dishes (10 x 15 cm), and locomotor activity analysed by counting the number of crossing lines (CL). The results werw expressed as mean Os resultados foram expressos as mean ± E.P.M. (n=6), analysed by ANOVA following the Tukey teste and p<0,05. For 24 h and until 96 h from treatments, that concentration that kills 50 % (CL<sub>50</sub>) of ZFa was determined (Trimmed Spearman-Kärber with de 95% confidence interval). Such protocols were aproved by CEUA-UECE (#7210149/2016). Plant extracts (0,5 ou 1,0 ou 5,0 mg/ml; 20 µL; *i.p.*) did not alter the animals' locomotor behavior and such concentrations were not toxic. Only bark extracts (EEtCZc) altered zebrafish locomotion of such extracts allow to evaluation the pharmacological effects (antinociception, anxiety and convulsion) of *Ziziphus cornitifolia*Reissek As concentrações não letais de tais extratos permitem avaliar os efeitos farmacológicos (antinocicepção, ansiedade e anticonvulsão) de *Ziziphus cortinifolia* Reissek against zebrafish.

**Keywords:** *Ziziphus cortinifolia* Reissek, non-clinical safety, adult zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

## INTRODUÇÃO

A espécie *Ziziphus cortinifolia* Reissek pertence à família Rhamnaceae, quando adultos, apresentam um crescimento arbóreo, produzindo frutos comestíveis e uma folhagem densa. Na região nordeste oferece aos animais criados pelo nordestino, sombra e alimento durante a estação seca (CARVALHO, 2007). As folhas, cascas e raízes de *Ziziphus cortinifolia* Reissek tem sido utilizadas pelas comunidades tradicionais no tratamento de infecções da pele, pulmões, gengivites e cicatrização de ferimentos (RIBEIRO et al; 2014). As saponinas e taninos encontrados em folhas e frutos de juazeiro são responsáveis pela atividade cicatrizante e inibitória do crescimento de algumas espécies de bactérias e fungos (MELO et al., 2012).

A utilização de *Danio rerio* em pesquisas de toxicologia tem mostrado um alto custo-benefício em função dos baixos custos de implantação e manutenção desses animais como modelos experimentais, além da similaridade genética com o homem e outros vertebrados (BARBAZUK et al, 2017). Embora os efeitos terapêuticos de espécies vegetais sejam reconhecidos e produzidos por moléculas do metabolismo secundário das plantas, torna-se necessário avaliar se o uso destas plantas traria riscos a saúde. Dessa forma esse trabalho teve como objetivo avaliar a segurança não clínica de extratos etanólicos de *Ziziphus cortinifolia* Reissek em zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material botânico e preparação dos extratos orgânicos

A coleta e herborização de *Ziziphus cortinifolia* Reissek foi realizada em Tauá (040°18'05,4" W; 06°01'03,6" S), Ceará, Brasil. As exsiccatas foram identificadas (64387) no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará. Os extratos foram preparados a partir de folhas (EEtFJ), caule (EEtCJ), galhos (EEtGJ) e raízes (EEtRJ) da planta (BRAQUEHAIS et al. 2016). A extração fria foi feita com a utilização de etanol comercial (96%) durante 96h e evaporação do solvente em banho Maria ( $50 \pm 2$  °C).

### Animais

Foram utilizados indivíduos da espécie *Danio rerio* em estágio adulto, com idade entre 60 a 90 dias ( $0,5 \pm 0,2$  g), selvagens, de ambos os sexos, obtidos de um fornecedor comercial em Fortaleza, Ceará, Brasil. Os animais (40-50 animais) foram mantidos em aquário (30 x 15 x 20 cm), com capacidade para 10 L, à temperatura de  $28 \pm 2$ °C, em ciclos de claro-escuro de 14/10 horas. Os bioensaios foram realizados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, aprovados pela Comissão de Ética para Uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (7210149/2016).

## Protocolo geral

Os animais foram selecionados aleatoriamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com os extratos ou controle, via intraperitoneal (*i.p.*) com seringa (0,5 mL; UltraFine® BD). Acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso.

## Avaliação da segurança não clínica

Os animais (n=6/gupo) foram tratados com 20 µL, via intraperitoneal, com EEtFJ ou EEtG ou EEtCJ ou EEtRJ, nas concentrações 0,5 ou 1,0 ou 5,0 ou 10,0 ou 50,0 ou 100 mg/mL. Um grupo tratado com veículo (DMSO 3%; 20 µL) foi incluso. Após os tratamentos, os animais foram deixados em repouso. A cada 24 h e até 96 horas dos tratamentos, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL<sub>50</sub>) pelo método de Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR et al., 2015).

## Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

Os animais (n=6/gupo) foram tratados com 20 µL, via intraperitoneal, com as três menores doses não tóxicas de cada extrato (0,5 ou 1,0 ou 5,0 mg/mL) ou veículo (DMSO 3%; 20 µL). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 30 min dos tratamentos via intraperitoneal, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). Usando o valor de CL do grupo Naive como linha de base (100%), será calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos (Magalhães et al., 2017).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de toxicidade *in vivo* frente ao zebrafish (*Danio rerio*) adulto, os extratos etanólicos de folhas, galhos, caule e raízes não apresentaram toxicidade nas três concentrações menores (Tabela 1).

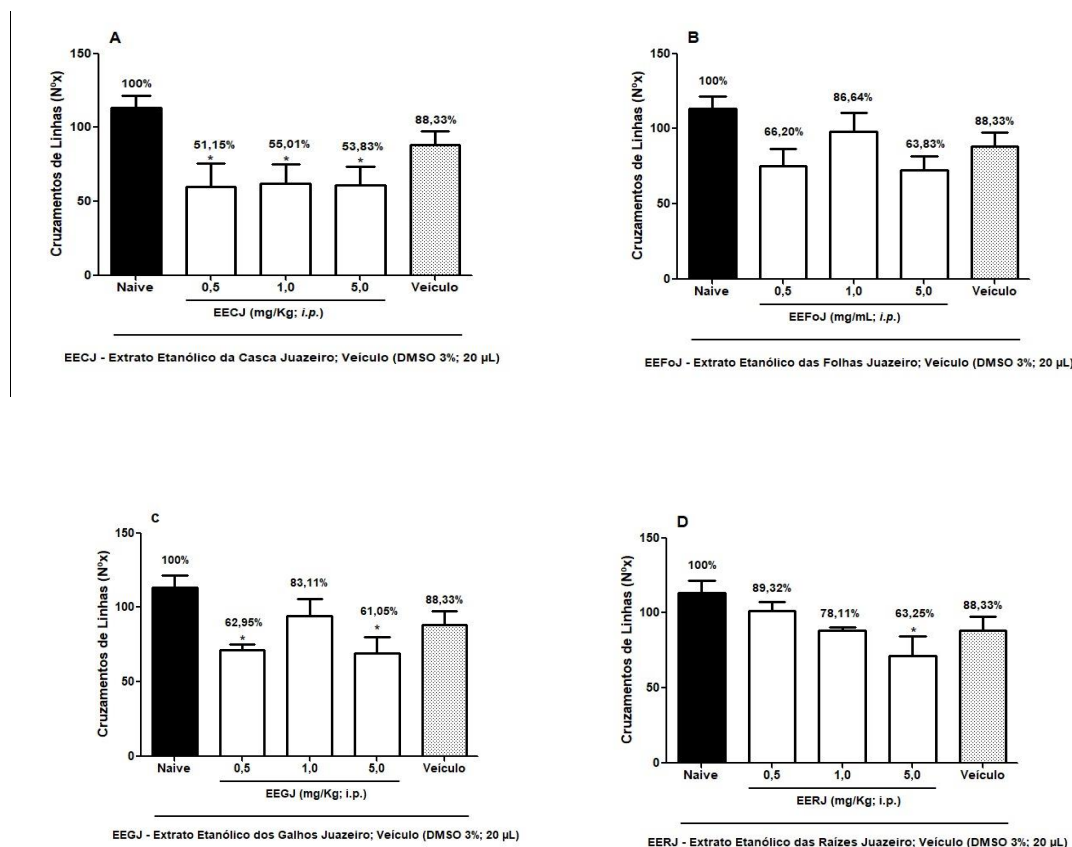
**Tabela 1.** Resultados dos testes de toxicidade dos extratos etanólicos de *Ziziphus cortinifolia* Reissek (joazeiro), coletada em Tauá-CE, frente a zebrafish adulto.

Extratos	Número de Animais Mortos						100	CL <sub>50</sub> (µg/mL) / IV
	V	0,5	1,0	5,0	10	50		
EEtFJ	0	0		0	0	0	0	16,77 (8,64-32,55)
EEtGJ	0	0	1	1	3	6	6	17,51 (6,56-46,71)
EEtCJ	0	0	1	3	2	6	3	14,8 (6,2-35,35)
EEtRJ	0	0	1	0	7	5	5	8,0 (6,28-10,18)

**Fonte:** Djane Ventura de Azevedo EEtFJ – extrato etanólico das folhas do joazeiro; EEtGJ - extrato etanólico dos galhos do joazeiro; EEtCJ - extrato etanólico do caule do joazeiro; EEtRJ - extrato etanólico das raízes do joazeiro V – veículo (DMSO 3%); C1 – concentração 1 (0,5 µg/mL; 20µL; *i.p.*); C2 – concentração 2 (1,0 µg/mL; 20µL; *i.p.*); C3 – concentração 3 (5,0 µg/mL; 20µL; *i.p.*); C4 - concentração 4 (10,0 µg/mL; 20µL; *i.p.*); concentração 5 (50,0 µg/mL; 20µL; *i.p.*); CL50-concentração letal para matar 50% dos animais; IV – intervalo de confiança;

## Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

De todos os extratos testados, apenas as concentrações do EEtCJ (0,5 ou 1,0 ou 5,0 mg/mL; 20  $\mu$ L; *i.p.*) diminuíram locomoção dos animais (Figura 1C). Segundo Benneh et al. (2017), a diminuição da atividade locomotora em zebrafish adulto causada por plantas medicinais pode-se inferir ação no sistema nervoso central dos animais, causando-se assim uma possível ação sedativa e/ou ansiolítica.



**Figura 1.** Efeito dos extratos etanólicos de *Ziziphus cortinifolia* Reissek sob a atividade locomotora de zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min). Naive – animais não tratados; Veículo – água mineral (Usou DMSO 3% não?); EECJ – Extrato etanólico de Caule; EEfJ – Extrato etanólico de folhas; EEGJ- extrato etanólico dos galhos e EERJ – extrato etanólico de raízes. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo; ANOVA seguida de Tukey. Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de atividade locomotora (%AL).

A frequência e velocidade de natação são parâmetros comportamentais usados para avaliar ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central ou periférico de zebrafish (*Danio rerio*) (GERBAUR et al., 2011). O que pode ser corroborado pelo uso de fármacos com ação testada e comprovada que atuem em receptores ativados pela dor ou situações de estresse (TAYLOR et al;2017).

## CONCLUSÃO

Dessa forma, usaremos os extratos testados em doses menores, não tóxicas, para avaliar seus efeitos farmacológicos (antinociceptivo, anti-inflamatório, ansiolítico e/ou anticonvulsivante) em zebrafish adulto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BARBAZUK, W. B; KORF, L; KADAVI, C; HEYEN, J; TATE, S; WUN, E; BEDELL, J. A; MCPHERSON, J. D; JOHNSON, S. L. The syntenic relationship of zebrafish and human genomes. **Genoma research**, 2017.

BENNEH, C.K., BINEY, R.P., MANTE, P.K., TANDOH, A., ADONGO, D.W., WOODE, E. 2017. 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.

BRAQUEHAIS, I. D; VASCONCELOS, F. R; RIBEIRO, A. R.C; DA SILVA, A. R. A; FRANCA, M. G. A; GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A.L.; SHAEFER, I.C.; BONAN, C.D. LARA, D.R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspiron and ethanol. **Pharmacol Biochem Behav** 99:480–486, 2011.

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

MELO, M. S.F; ROCHA, C. Q; SANTOS, M. H; CHAVASCO, J. M; CHAVASCO, J. K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha, casca de caule de *Ziziphus joazeiro* Mat. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 2012.

RIBEIRO, L. P. (2010). **Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de Sitophilus zeamais Mots. (Coleoptera: Curculionidae)**. 155p. *Dissertação: Mestrado em Ciências*. Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

TAYLOR, J. C; DEWBERRY, L. S; TOTSCH, S. K; YESSICK, L.R; DEBERRY, J. J; WATTS, S. A; SORGE, R. E. A novel Zebrafish-based model of nociception. *Physiology & Behaviour*, v.174, p. 83-88, 2017.