



## Avaliação da atividade locomotora e teste de toxicidade do eugenol utilizando zebrafish (danio rerio) adulto.

### *Evaluation of locomotor activity and eugenol toxicity test using adult zebrafish (danio rerio).*

DOI: <https://doi.org/10.24979/ambiente.v1i1.931>

Cecília Guimarães Lemos - Universidade Estadual do Ceará <https://orcid.org/0000-0002-6663-049X>

Jean Parcellí Costa do Vale - Universidade Estadual Vale do Acaraú <https://orcid.org/0000-0001-5598-8886>

Maria Kueirislene Amâncio Ferreira - Universidade Estadual do Ceará <https://orcid.org/0000-0002-4270-8109>

Antônio Wlisses da Silva - Universidade Estadual do Ceará <https://orcid.org/0000-0002-1686-1644>

Jane Eire Silva Alencar de Menezes - Universidade Estadual do Ceará <https://orcid.org/0000-0001-9632-5464>

Helcio Silva dos Santos - Universidade Estadual Vale do Acaraú <https://orcid.org/0000-0001-5527-164X>

**RESUMO:** Eugenol é o componente majoritário do óleo essencial do cravo (*Syzygium aromaticum*). Possui efeito no sistema nervoso central em camundongos e ratos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade locomotora e toxicidade aguda do eugenol utilizando zebrafish adulto. Para o teste de campo aberto, os zebrafish receberam doses do eugenol (4, 20 e 40 mg/kg); DMSO 3% e DZP 40mg/kg. Após 30 min, os animais foram adicionados em placas de Petri, e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de CL (5 min). Para avaliação da toxicidade, os animais receberam os mesmos tratamentos e após 96h de análise, os valores obtidos com o número de ZFa mortos foram submetidos à análise estatística para estimar DL para matar 50%. O eugenol alterou o sistema locomotor do zebrafish e não foi tóxico até 96h de análise. A ausência de toxicidade e a alteração no sistema locomotor do zebrafish mostra a segurança não clínica do eugenol e nos permite dar continuidade nos testes e investigar possível efeito ansiolítico e anticonvulsivante.

**Palavras-chave:** Eugenol, sistema locomotor, zebrafish, Locomoção.

**ABSTRACT:** Eugenol is the major component of the essential oil of cloves (*Syzygium aromaticum*). It has an effect on the central nervous system in mice and rats. The present study aimed to evaluate the locomotor activity and acute toxicity of eugenol using adult zebrafish. For the open field test, zebrafish received doses of eugenol (4, 20 and 40 mg / kg); DMSO 3% and DZP 40mg / kg. After 30 min, the animals were added to Petri dishes, and locomotor activity was analyzed by counting the number of CL (5 min). For toxicity assessment, the animals received the same treatments and after 96 hours of analysis, the values obtained with the number of ZFa killed were subjected to statistical analysis to estimate DL to kill 50%. Eugenol altered the zebrafish's locomotor system and was not toxic until 96 hours of analysis. The absence of toxicity and the alteration in the zebrafish locomotor system shows the non-clinical safety of eugenol and allows us to continue testing and investigate possible anxiolytic and anticonvulsant effects.

**Keywords:** Eugenol, locomotor system, zebrafish, locomotion.

## INTRODUÇÃO

Os principais componentes químicos do óleo essencial do cravo da Índia são: acetato de eugenila, cariofileno e eugenol (AFFONSO et al., 2012). Eugenol [2-metoxi-4-(2-propenil)fenol] é o principal ingrediente ativo do óleo de cravo, que é derivado das folhas, botões e caules do cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) e tem amplo uso como anestésico para organismos aquáticos devido ao seu baixo preço e disponibilidade imediata (ROUBACH et al., 2005).

Há relatos de estudos experimentais de vários efeitos do eugenol no sistema nervoso central em camundongos e ratos Sharma et al. (2012) além disso o composto possui propriedades anticonvulsivantes, anti-inflamatórias, anti-estresse, antioxidantes, anestésicas e antimicrobianas (MÜLLER et al., 2006; SELL; CARLINI, 1976).

Durante investigações neurofarmacológicas, ambientais e entre outras áreas, o zebrafish (*Danio rerio*) vem sendo utilizado como modelo organismo e no Brasil houve um crescimento de publicações principalmente nas áreas (Neurociências e Comportamento, Farmacologia e Toxicologia e Meio Ambiente / Ecologia) (SILVESTRE et al., 2020). É considerado um modelo significativo principalmente porque seu genótipo apresenta 70% de homologia exclusiva nos receptores de neurotransmissores para mamíferos segundo Anichtchik et al., (2007), além do seu pequeno tamanho, alto poder de proliferação, desenvolvimento transparente e rápido que pode facilitar significativamente a descoberta de drogas em estudos utilizando este animal como modelo (FACCIOL; GERLAI, 2020). Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade locomotora (AL) e toxicidade aguda do eugenol utilizando zebrafish adulto.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção do eugenol

O eugenol foi adquirido da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

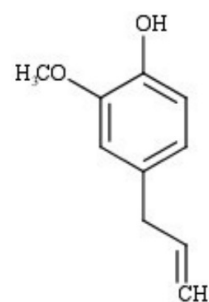


Figura 1: Estrutura química do eugenol.

### Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto, selvagens, ambos os sexos com idade de 60-90 dias, tamanhos de  $3.5 \pm 0.5$  cm e peso  $0.4 \pm 0.1$  g foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 7210149/2016.

### Avaliação da Atividade locomotora

Os zebrafish ZFa (n=6/grupo) foram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com 20 µL das soluções do eugenol nas doses (4, 20 e 40 mg/kg) e veículo (DMSO 3%) e diazepam (DZP; 40mg/kg). Após 30 min dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri, marcadas com quadrantes e analisada a AL através da contagem do número de cruzamento de linhas, durante 5 min. Animais sem tratamentos (Naive) foram considerados como 100 % e calculado o percentual de atividade locomotora (%AL).

## Toxicidade 96h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish de acordo com a Organização de Cooperação Econômica e Método Padrão de Desenvolvimento (OECD, 1992) para determinar a  $LC_{50}$ -96h. Os animais receberam os mesmos tratamentos descritos em 2.3. Após 96h de análise, o número de ZFa mortos foram submetidos à análise estatística, estimando-se a Dose Letal para matar 50% ( $DL_{50}$ ).

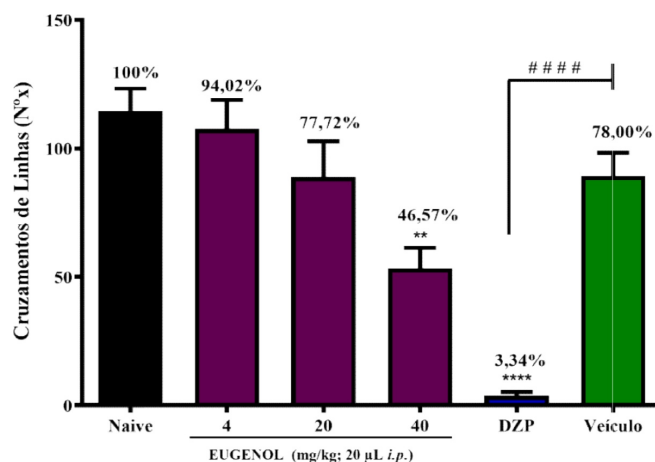
## Análise estatística

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. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Atividade locomotora

Um dos parâmetros para estudos comportamentais em larvas e animais adultos é a análise da AL por exploração de um campo aberto (Bichara et al., 2014; Ferreira et al., 2020). O teste de campo aberto é utilizado principalmente quando se tem o objetivo de analisar manifestações comportamentais sugestivas de ansiedade, estresse e o efeito de futuros fármacos. Como resultado, observou-se que o eugenol causou comprometimento motor do zebrafish, onde ocorreu uma redução no número de cruzamento de linha na placa de petri pelos animais, resultado significativamente diferente do grupo naive ( $p < 0,01$ ; vs. naive) (Fig.2).



**Figura 2:** Efeito eugenol sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto.

A diminuição da atividade locomotora em zebrafish adulto causada pelo eugenol sugere uma possível ação sedativa, tais como os benzodiazepínicos (drogas ansiolíticas), os quais diminuem AL (mobilidade) do zebrafish (*Danio rerio*) adulto em campo aberto (Benneh et al., 2017; Gupta et al., 2014).

### Toxicidade aguda (96h)

O zebrafish adulto vem sendo empregado como modelo animal complementar ao uso de roedores em testes genéticos, biologia do desenvolvimento, neurobiológicos e toxicológicos (RESENDE e SOCCOL, 2015), pois apresenta baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo de reprodução curto, alta fecundidade e embriões transparentes (DAI et al., 2014). Seu pequeno tamanho na fase adulta requer diminuição da quantidade das substâncias a serem testadas e dosadas, bem como as quantidades de reagentes e materiais utilizados no tratamento e manutenção dos animais (HILL, 2005). Como resultado, constatou-se que o eugenol se mostrou seguro, pois não foi tóxico frente a ZFa até 96 h de análise ( $DL_{50} > 40$  mg/kg).

**Tabela 1:** Resultados do teste de toxicidade aguda do EUGENOL frente ao zebrafish adulto.

| Amostra | Mortalidade |    |    |    | 96h                           |
|---------|-------------|----|----|----|-------------------------------|
|         | CN          | D1 | D2 | D3 | DL <sub>50</sub> (mg/kg) / IV |
| EUGENOL | 1           | 0  | 0  | 0  | > 40                          |

**Fonte:** Autor; CN- Grupo controle negativo: DMSO 3%. D1 – Dose 1 (4 mg/kg). D2 – Dose 2 (20 mg/kg). D3 – Dose 3 (40 mg/kg). CL50-concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança;

Uma das maiores linhas de pesquisa reconhecida com zebrafish é na área de toxicologia. Para analisar a toxicidade de um produto químico, é essencial identificar os pontos finais da toxicidade e sua dose-resposta, e assim elucidar os mecanismos de toxicidade.

## CONCLUSÃO

A ausência de toxicidade e a alteração no sistema locomotor do zebrafish após tratamentos mostra a segurança não clínica do eugenol e nos permite dar continuidade nos testes e investigar possível efeito ansiolítico e anticonvulsivante, este que por sua vez foi realizado com eugenol utilizando roedores.

## REFERÊNCIAS

AFFONSO, R. S. et al. Aspectos Químicos e Biológicos do óleo Essencial de Cravo da Índia. *Revista Virtual de Química*, 2012.

ANICHTCHIK, O. et al. Express 10,000 Genes. *Comparative and General Pharmacology*, v. 1156, n. August 2006, p. 1138–1156, 2007.

BENNEH, C. K. et al. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 207, p. 129–145, jul. 2017.

BICHARA, D. et al. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. *Journal of Applied*

*Toxicology*, 2014.

FACCIOL, A.; GERLAI, R. Zebrafish Shoaling, Its Behavioral and Neurobiological Mechanisms, and Its Alteration by Embryonic Alcohol Exposure: A Review. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 14, n. September, p. 1–12, 2020.

FERREIRA, M. K. A. et al. Anxiolytic-like effect of chalcone N-{4'[(2E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(phenyl)prop-2-en-1-one]} acetamide on adult zebrafish (*Danio rerio*): Involvement of the 5-HT system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 526, n. 2, 2020.

GUPTA, P. et al. Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. *Drug Development and Therapeutics*, v. 5, n. 2, p. 127, 2014.

MÜLLER, M. et al. Effect of eugenol on spreading depression and epileptiform discharges in rat neocortical and hippocampal tissues. *Neuroscience*, 2006.

ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 2005.

SELL, A. B.; CARLINI, E. A. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. *Pharmacology*, 1976.

SHARMA, M.; RAUNIAR, G.; DAS, B. Experimental study of various central nervous system effects of eugenol in mice and rats. *Health Renaissance*, 2012.

SILVESTRE, N. et al. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research in Brazil. *Zebrafish*, v. 00, n. 00, p. 1–14, 2020.