

# IV SIMPÓSIO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS MÉDICAS 30 DE NOVEMBRO DE 2018

## Efeito Antinociceptivo Corneal do Óleo Essencial das Folhas da Aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Fêmea) em Zebrafish (*Danio rerio*) Adulto

Maria da Conceição Lobo Lima<sup>1\*</sup> (PG), José Ismael Feitosa de Aaraújo<sup>1</sup> (IC); Francisco Ernani Alves Magalhães<sup>1</sup> (PQ), Jane Eire Silva Alencar de Menezes<sup>2</sup> (PQ), Hécio Silva dos Santos<sup>3</sup> (PQ); Edson Holanda Teixeira<sup>4\*</sup> (PQ)

<sup>1</sup>Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, Tauá, Ceará, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN-Bloco S), Universidade Estadual do Ceará, Campus Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil;

<sup>3</sup>Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral-CE, Brasil;

<sup>4</sup>Laboratório Integrado de Biomoléculas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil;

\*[maria.lobo@uece.br](mailto:maria.lobo@uece.br); [edson@ufc.br](mailto:edson@ufc.br);

### Resumo

A dor ocular crônica, em particular dor na córnea, é um problema de saúde pública, pois aumenta a morbidade e o ônus social. Os principais opioides endógenos (encefalinas) são empregados para tal dor, porém apresentam efeitos analgésicos transitórios devido à sua rápida degradação. Nesse contexto, esse trabalho reporta o efeito antinociceptivo corneal do óleo essencial das folhas da aroeira (OEFARO; *Schinus terebinthifolius*, Fêmea; #21832 UVA-Sobral-CE) em zebrafish adulto (ZFa). Os animais (60-90 dias; 0,4 ± 0,1 g; n=6/grupo), machos e fêmeas, foram tratados via oral (v.o.) com OEFARO (4 ou 20 ou 40 mg/kg) ou veículo (Controle; Salina 0,9%; 20 µL) ou morfina (40 mg/kg). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. Após 1 h dos tratamentos, 5,0 µL de solução salina hipertônica (NaCl 5,0 M; agonista TRPV1) foram aplicados na superfície do olho direito dos ZFa. Após 10 segundos, cada animal foi adicionado a uma placa de Petri (dividida em quadrantes) e a resposta antinociceptiva foi caracterizada pelo aumento do número de cruzamentos realizados durante 0-5 min. O estudo foi aprovado pela CEUA-UECE (# 7210149/2016). Como resultado, OEFARO (20 ou 40 mg/kg; v.o.) inibiu significativamente ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ; vs. Controle) a nocicepção induzida por salina hipertônica (NaCl 5,0 M; 5 µL) na córnea do ZFa. Tal efeito foi significativamente ( $p > 0,05$ ) semelhante ao efeito da morfina (40 mg/kg; v.o.;  $p < 0,001$  vs. controle). Tais resultados sugerem ação antagonista aos canais TRPV1. Porém, novos estudos devem ser realizados para investigação dos possíveis mecanismos de ação.

**Palavras-chave:** Óleo essencial; *Schinus terebinthifolius*; Nocicepção corneal; Zebrafish (*D. rerio*) adulto;

### Introdução

A dor ocular, em particular dor na córnea, é considerada um sintoma central de distúrbios inflamatórios ou traumáticos que afetam o segmento anterior do olho. O aumento da prevalência, a morbidade e o ônus social resultante fizeram com que a dor ocular crônica fosse reconhecida como um sério problema de saúde pública (BELMONTE et al., 2017).

Os principais opioides endógenos (encefalinas) desempenham um papel fundamental no controle da dor, mas exibem apenas efeitos analgésicos transitórios devido à sua rápida degradação (ANABELLE et al., 2018).

O TRPV1 (Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide 1) é um dos receptores nociceptivos expresso em tecidos do olho, responsável pela transmissão da dor corneal (DEL FIACCO et al., 2015; SILBERSTEIN, 2015). Pesquisas pré-clínicas empregam o uso de roedores na busca por produtos naturais com efeito antagonista aos canais TRPV1 (LEITE et al., 2014). Tal receptor também já foi detectado em zebrafish (KASTENHUBER et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2018).

*Schinus terebinthifolius* é popularmente conhecida no Brasil como aroeira da praia. Ela tem sido utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, antipirética, analgésica, agente depurativo. Também é empregada para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, inflamação uterina, infecções do trato urinário, úlceras da pele e distúrbios gastroduodenais. O óleo essencial dos frutos de *S. terebinthifolius* apresenta atividades antioxidantes, anticancerígenas, distúrbios respiratórios, micose e infecções por candidíase invasivas (CARVALHO et al., 2015).

Baseando-se no exposto, esse trabalho reporta o efeito antinociceptivo corneal do óleo essencial das folhas da aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Fêmea) em zebrafish adulto.

## Metodologia

### Óleo essencial

Nesse trabalho foi utilizado o óleo essencial extraído das folhas da aroeira (OEFARO; *Schinus terebinthifolius*, Fêmea; #21832 UVA-Sobral) (AZEVEDO, 2018), armazenado no nosso laboratório (LBPNB-UECE, Tauá-CE) em geladeira (5 °C).

### Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos, com idade entre 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). Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro (30 x 15 x 20 cm), contendo água desclorada (*ProtecPlus*<sup>®</sup>) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração ad libitum 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (2-4 °C), por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares (CONCEA, 2018). 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.

### Protocolo geral

Os testes foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães et al. (2017; 2018) e Ekambaram et al. (2017). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com a amostra teste ou controles, via oral (v.o.) (COLLYMORE et al., 2003). Em seguida foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso.

Para os tratamentos via oral foi usada pipeta automática variável de 20 µL. Para os tratamentos via intraperitoneal (*i.p.*) ou tópico foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G.

### **Atividade antinociceptiva corneal comportamental**

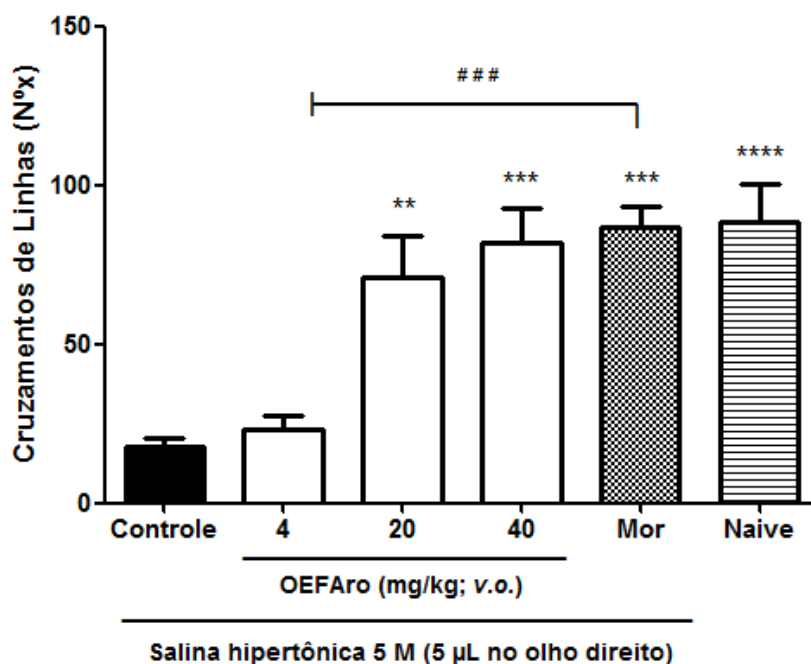
Para as análises comportamentais, seguiu-se mesmas metodologias descritas por [Magalhães et al. \(2018\)](#). Os animais (n=6/grupo) foram tratados com OEFAro (4 ou 20 ou 40 mg/kg; *v.o.*) ou veículo (Controle, salina 0,9%; 20 µL; *v.o.*) ou morfina (40 mg/kg; *v.o.*), utilizada como controle positivo. Um grupo sem tratamentos (Naive) foi incluído. Após 1 h dos tratamentos, a nocicepção corneal foi induzida com solução de salina hipertônica, NaCl (agonista TRPV1; 5,0 M; 5,0 µL) aplicada na superfície da córnea direita do ZFa. Após tratamentos com agente nociceptivo, os animais foram colocados em uma placa de Petri de vidro (10 x 15 cm), divididos em quadrantes, e a resposta antinociceptiva foi caracterizada pelo aumento da atividade locomotora ou cruzamentos de linhas (CL), analisadas durante 5 min.

### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como valores da média ± 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**

Em nossos trabalhos iniciais, o óleo essencial das folhas da aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Fêmea), OEFAro, não se mostrou tóxico e não alterou locomoção ([LIMA et al., 2018a](#)), bem como inibiu o efeito nociceptivo induzido pela formalina (1ª Fase) aplicada na calda do zebrafish adulto ([LIMA et al., 2018b](#)). Com o intuito de dar continuidade aos nossos estudos com o OEFAro, empregamos o zebrafish adulto como modelo animal para avaliar o efeito do OEFAro sob a nocicepção corneal induzida pela salina hipertônica (NaCl 5,0 M). Como resultado, OEFAro (20 ou 40 mg/kg; *v.o.*) inibiu significativamente ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ; *vs.* Controle) a nocicepção induzida por salina hipertônica (NaCl 5,0 M; 5 µL) aplicada na superfície da córnea direita do ZFa. Tal efeito do OEFAro foi significativamente ( $p > 0,05$ ) semelhante ao efeito da morfina (40 mg/kg; *v.o.*;  $p < 0,001$  *vs.* controle), Fig. 1.



**Fig. 1.** Efeito do AEFARo sob a nocicepção corneal induzida por salina hipertônica (NaCl 5 M) em zebrafish adulto, analisados individualmente durante 0-5 min. Cada coluna representa a média  $\pm$  erros padrão da média (n=6/grupo). Controle: veículo (salina 0,9%; 20  $\mu$ L; v.o.). Naive - grupo não tratado. Mor – morfina (40 mg/kg; v.o.). ANOVA unidirecional com teste pós-hoc de Tukey (\*\* $p$  <0,01; \*\*\* $p$  <0,001; \*\*\*\* $p$  <0,0001 vs. Controle; ### $p$  <0,001 vs. Mor).

Piccinelli et al. (2015) e Scheid et al. (2018) reportaram que o óleo essencial dos frutos e o uma fração metanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius*, respectivamente, apresentaram efeito antinocicepção em modelos de dor neuropática em ratos.

Nesse trabalho, os resultados apontam mais uma aplicação farmacológico do óleo essencial das folhas de *Schinus terebinthifolius* como inibidor da dor corneal em zebrafish adulto. Tais resultados sugerem ação antagonista aos canais TRPV1. Porém, novos estudos devem ser realizados para investigação dos possíveis mecanismos de ação.

## Conclusão

O óleo essencial das folhas da aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Fêmea) apresentou efeito antinociceptivo corneal em zebrafish adulto. Novos estudos devem ser realizados para investigação dos possíveis mecanismos de ação.

## Referências

- Azevedo FRP (2018). Composição química do óleo essencial extraído das partes aéreas da aroeira (*Schinus terebinthifolius*): avaliação da influência do gênero da planta. 16 p. *Trabalho de Conclusão de Curso: Bacharelado em Química*. Universidade Vale do Acaraú, Sobral, Ceará, Brasil.
- Annabelle RG, Hervé P, Cyrine BD, Tanja O, Christophe B, Michel W, Stéphane MP. Dual enkephalinase inhibitor (DENKI) PL265: a novel topical treatment to alleviate corneal pain and inflammation. *Pain*. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001419, 2018.

- Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, Dartt DA, Galor A, Hamrah P, Ivanusic JJ, Jacobs DS, McNamara NA, Rosenblatt MI, Stapleton F, Wolffsohn JS. TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf* 15:404-437, 2017.
- Collymore, C., Rasmussen, S., Tolwani, R.J. 2013. Gavaging adult zebrafish. *J Vis Exp*. 78(e50691), 1-5.
- 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 22/4/18.
- Carvalho MG, Melo AGN, Aragão CFN, Raffin FN, Moura TFAL. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Rev. Bras. Plantas Med.* 15 (2013) 158–169.
- Del Fiacco M, Quartu M, Boi M, Serra MP, Melis T, Boccaletti R, Shevel E, Cianchetti C. TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:393-397, 2015.
- Kastnhuber E, Gesemann M, Mickoleit M, Neuhauss SC. Phylogenetic analysis and expression of zebrafish transient receptor potential melastatin family genes. *Dev. Dyn.* 242: 1236-1249, 2013.
- Leite LHI, Leite GO, Coutinho, TS, de Sousa SDG, Sampaio RS, da Costa, GJM, de Menezes IRA, Campos AR. Topical antinociceptive effect of *Vanillosmopsis arborea* baker on acute corneal pain in mice, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2014:1–6, 2014.
- Lima MCL, Bezerra FS, de Azevedo DV, Abrante IA, Félix GV, Lima LMG, Batista FLA, Batista FLA, Magalhães FEA, Rodrigues THS, dos Santos HS, Teixeira EH. Evaluation of the non-clinical safety of aroeira (*S. terebinthifolius*) leaves oil in adult zebrafish (*D. rerio*). In: V Simpósio Zebrafish, Natal-RN. Anais do V Simpósio Zebrafish, 2018a. v. único. p. 1-1.
- Lima MCL, Bezerra FS, de Araújo JIF, Lima LMG, Félix GV, Vieira NCG, Vieira Neto AE, Campos AR, Magalhães FEA, Rodrigues THS, dos Santos HS, dos Santos CC, Holanda ET. Antinociceptive effect of Essential oil of aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Female) leaves in zebrafish (*Danio rerio*). In: V Simpósio Zebrafish, 2018, Natal-RN. Anais do V Simpósio Zebrafish, 2018b. v. único. p. 1-1.
- Magalhães FEA, de Sousa CAPB, Santos SAAR, Menezes RB, Batista FLA, Abreu AO, de Oliveira MV, Moura LFWG, Raposo RS, Campos AR. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish* 4(5):422-429, 2017.
- Magalhães FEA, Batista FLA, Lima LMG, Abrante IA, Batista FLA, Abrante IA, de Araújo JIF, Santos SAAR, de Oliveira BA, Raposo RS, Campos AR. Adult zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of corneal antinociceptive compounds. *Zebrafish*. doi: 10.1089/zeb.2018.1633, 2018.
- Piccinelli AC, Santos JA, Konkiewitz EC et al. Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene,  $\alpha$ -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutritional Neuroscience* 18(5):217-224, 2015.

Scheid T<sup>1</sup>, Moraes MS<sup>1</sup>, Henriques TP<sup>1</sup>, Riffel APK<sup>1</sup>, Belló-Klein A<sup>1</sup>, Poser GLV<sup>2</sup>, Ethur EM<sup>3</sup>, Partata WA<sup>1</sup>. Effects of methanol fraction from leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi on nociception and spinal-cord oxidative biomarkers in rats with neuropathic pain. Evid Based Complement Alternat Med. 2018(5783412):1-11, 2018.

Silberstein SD. TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine. Some like it hot! Chronic migraine increases TRPV1 receptors in the scalp. J Neurol Neurosurg Psychiatry 86:361, 2015.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem aos colaboradores do Grupo de Pesquisa Biotecnologia em Recursos Naturais, da Universidade Estadual do Ceará (UECE-CECITEC), Tauá-Ce. Ao Núcleo de Biologia Experimental da Unifor (NUBEX). A UVA, UECE, UFC, CNPq e FUNCAP pelo apoio e suporte financeiro.