

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

Avaliação da Segurança não Clínica do Mentol *in Vitro* e *in Vivo* em Zebrafish (*Danio Rerio*) Adulto

Oneide Facundo Vasconcelos de Oliveira^{1*}(PG), Francisco Ernani Alves Magalhães²(PQ), Natália Vasconcelos de Souza³(PG), Danielle Malta Lima⁴(PQ)

*1*Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Fortaleza, Fortaleza-CE;
2 Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, CECITEC, Tauá, Ceará, Brasil

3 Programa de Pós-Graduação Renorbio, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE

*4*Docente da Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Fortaleza, Fortaleza-CE.
oneide_facundo@hotmail.com

Resumo

O mentol é um óleo essencial com diversas utilidades. Este trabalho reporta a análise toxicológica do Mentol. Para avaliar a citotoxicidade das amostras realizamos teste *in vitro* com cultura celular da Linhagem Vero (*rim do macaco verde africano*) nas amostras (1.000 - 32,5 µg/mL) e calculado o percentual de viabilidade celular e calculado a CE50. Em seguida, realizamos testes *in vivo* com modelo animal Zebrafish. Os testes foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 7648070318, da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, Ceará. Para teste de locomoção do animal foi realizado inoculação por via oral do óleo essencial Mentol nas concentrações de(0,1; 0,5; 1 mg/mL; 20 µL; via oral) e as analisados os cruzamentos no teste de campo aberto. Concluímos que o mentol não causou mortalidade nem comprometimento locomotor considerável no Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Palavras-chave: Mentol. Citotoxicidade. Zebrafish (*Danio rerio*) adulto

Introdução

As pesquisas com o menthol sugerem que muitos dos seus componentes compõem os óleos vegetais essenciais e podem ser classificados como naturais. Os óleos essenciais (OE) são substâncias lipossolúveis e voláteis que integram o metabolismo secundário de plantas. O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à história da humanidade e os produtos de origem vegetal são as principais fontes para a produção de novos medicamentos (SANTOS, 2014).

O Zebrafish (*Danio Rerio*) é um pequeno peixe teleósteo de água doce medindo cerca de 3 a 4 centímetros de comprimento pertencente à família do Cyprinidae. No Brasil ele é conhecido como paulistinha e está sendo bastante utilizado por diversos laboratórios como um ótimo modelo

para estudos genéticos (DAMMSKI et al., 2011). O pioneiro a estudar este pequeno peixe foi George Streisinger nos anos 60 que utilizou diferentes técnicas para estudar o desenvolvimento embrionário do Zebrafish (SANT`ANNA, 2006).

O Zebrafish como um organismo modelo para pesquisa apresenta diversas características favoráveis, tais como: baixo custo, requer pouco espaço para manutenção, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, fácil manipulação, seu comportamento pode ser facilmente observado e quantificado em um ambiente controlado e ainda, seu pequeno tamanho, a sensibilidade para fármacos, e o rápido metabolismo, possui semelhança genética de 70% com os humanos, o que viabiliza estudos com este modelo animal (MAGALHÃES et al.,2017).

Para teste de locomoção do animal ,foi realizado inoculação por via oral do óleo essencial Mentol proveniente da empresa Sigma-aldrich, e em seguida divideremos em 4 grupos o naive .Cada grupo de zebrafish (n=6/cada) receberão Menthol (0,1; 0,5 e 1,0 mg/kg 20 µL). A análise foi feito com auxilio de filagem durante 5 minutos para cada grupo estado em campo aberto. Como parâmetros de análise será contabilizado a mobilidade do animal em uma placa de petri dividida em em quarto quadrantes para saber se o Menthol modifica a locomoção do animal.

O objetivo deste trabalho foi investigar a segurança não clínica do mentol *in vitro* e *in vivo* em Zebrafish adulto.

Metodologia

Amostra

O Mentol foi comprado da Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América, cedido pelo Núcleo de Biologia Experimental (Nubex) da UNIFOR.

Zebrafish

Foram utilizados Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), 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, 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 (40 x 20 x 25 cm), contendo água desclorada (anticloro *ProtecPlus*[®]) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo circadiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração (*Spirulina*[®]) *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 para o Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 7648070318, da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, Ceará.

Protocolo geral

Os testes com zebrafish foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães et al. (2017). No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou

controle, via intraperitoneal (*i.p.*) (KINKEL et al., 2010), usando seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G. Em seguida, os animais foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso.

Avaliação da segurança não clínica

Toxicidade *in vitro*

Soluções do mentol (0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL) foram preparadas com água destilada e testadas frente à Células Vero (rim do macaco verde africano). Foi usado o método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). Com base nos estudos de (BARROSO, 2015) os valores de absorbância registrados serão calculados o percentual de viabilidade celular pela fórmula: $viabilidade\ celular\ (\%) = [a / b] \times 100$, **A** será definido como sendo a absorbância das células tratadas com as amostras de Menthol e **B** a Absorbância do controle celular para posteriormente passar para o teste *in vivo*. Teste de MTT O potencial tóxico da amostra foi classificado em: a) não tóxico $CL_{50} > 1000\ \mu\text{g/mL}$; b) tóxico ($CL_{50} \leq 1000\ \mu\text{g/mL}$).

Foram utilizadas soluções (1.000 - 32,5 $\mu\text{g/mL}$) e calculado o percentual de viabilidade celular. O valor da concentração capaz de reduzir a viabilidade a 50 % quando comparada ao controle celular (CC_{50}) foi obtido pela análise da regressão não-linear da curva concentração-efeito. Nosso teste encontrou CE_{50} de $171,5 \pm 295,5$, com média de 235,5.

Atividade locomotora do zebrafish adulto (Teste de Campo Aberto)

Foi realizado o teste de campo aberto (AHMAD e RICHARDSON, 2013) para avaliar alteração ou não da coordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Inicialmente, os animais ($n=6/\text{gupo}$) foram tratados com mentol (0,1 ou 0,5 ou 1,0 mg/mL; 20 μL ; *i.p.*) e veículo do mentol (água mineral com anticloro e dimetilsulfóxido (DMSO) um solvente orgânico a 3%; 20 μL ; *i.p.*). Um grupo de animais sem tratamentos foi incluído (Naive). Após 30 min dos tratamentos, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, 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%), foi calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos.

Toxicidade aguda 96 h em zebrafish adulto

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto conforme metodologias propostas pela OECD (OECD, 1992) e Huang et al. (2014). Os animais ($n=6/\text{cada}$) foram tratados com mentol (0,1 ou 0,5 ou 1,0 mg/mL; 20 μL ; *i.p.*) ou veículo do mentol (Controle; DMSO 3%; 20 μL ; *i.p.*). Após os tratamentos, os animais foram deixados em repouso para analisar a taxa de mortalidade. A cada 24 h e até 96 h foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a dose letal capaz de matar 50% dos animais (DL_{50}) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR et al., 2015).

Análise estatística

Os resultados *in vivo* 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. 5.0. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Nesse trabalho investigamos inicialmente o potencial citotóxico do mentol *in vitro*, frente à Células Vero (rim do macaco verde africano). Como resultado, o mentol não se mostrou tóxico, pois apresentou média de CE_{50} igual a 235,5($\mu\text{g/mL}$).

Estudos como os de (SIMÕES; GOMES, 2009) realizaram pesquisas com mentol para testar eficiência deste como anestésico para a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio da avaliação de eventos comportamentais, da verificação da margem de segurança do anestésico e das respostas de estresse.

Os achados demonstraram que o mentol não é um anestésico eficaz para juvenis de tilápia durante procedimentos de rotina na piscicultura. Porém não houve mortalidade nos peixes expostos ao mentol. O que mostra mais uma vez a segurança e vai de acordo com nossos achados que ele pode ser usado com peixes.

Autores como (SOUZA et al., 2012) discorreram também sobre uso do mentol com peixes. Nossos achados sobre mortalidade concordam com este estudo no qual também não houve peixes mortos ao se utilizar mentol.

Recentemente, adaptamos o teste de campo aberto em placas de Petri, proposto por Ahmad e Richardson (2013), para avaliar atividade locomotora de zebrafish adulto sob ação de drogas analgésicas (MAGALHÃES et al., 2017). Desta forma, empregamos o mesmo método com o mentol para avaliar sua ação sobre o sistema locomotor do ZFa. Como resultado, todas as concentrações testadas não causaram efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor dos animais (Fig. 1).

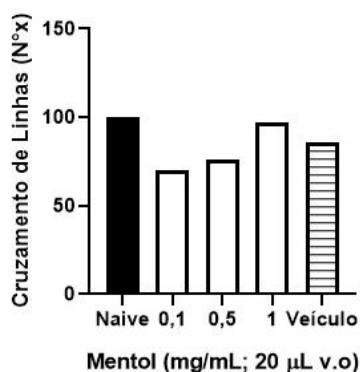


Figura 1. Efeito do mentol sob a atividade locomotora de zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5 min). Naive – animais não tratados; Veículo – DMSO 3%. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo; ANOVA seguida de Tukey. Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de atividade locomotora (%AL).

O uso de animais em pesquisas científicas vem sendo reconsiderada, visando a redução do número de animais empregados, o refinamento de técnicas ou até a substituição destes se baseando na ética. Para testes de toxicidade os peixes são indicados como uma alternativa promissora para o uso de animais “in vivo”, sendo o Zebrafish um ótimo modelo.

Nesse contexto, empregamos o Zebrafish adulto como modelo animal para avaliar a toxicidade aguda do mentol. Como resultado, o mentol não se mostrou tóxico, pois não houve mortalidade dos animais em até 96 h de análise (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos testes de toxicidade aguda do mentol frente ao zebrafish adulto.

Amostra	Mortalidades do Zebrafish Adulto				96h
	CN	C1	C2	C3	CL ₅₀ (mg/mL) / IV
Mentol	0	0	0	0	> 1,0

Fonte: Autor; CN- Grupo controle negativo: DMOS 3%; C- concentrações (20 μ L; *i.p.*); C1 – 0,1 mg/mL; C2 – 0,5 mg/mL; C3 – 1,0 mg/mL; CL₅₀- Concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança;

Conclusão

Nossos resultados mostraram que o mentol é considerado seguro, pois não foi tóxico frente à células vero, bem como ao Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Referências

- AHMAD, Farooq; RICHARDSON, Michael K.. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, [s.l.], v. 92, p.88-98, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2012.10.014>.
- 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. *Journal of Fisheries Sciences*, v. 9, n. 4, p.052-062, 2015.
- BARROSO, Lana Karine Vasconcelos. **Atividade antiviral in vitro de plantas medicinais da flora cearense contra o vírus da dengue**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Coletiva, Universidade de Fortaleza, Fortaleza, 2015.
- DAMMSKI, Ana Paula et al. **Zebrafish**: manual de criação em biotério. Curitiba: Ufpr, 2011. 106 p.
- 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 . Acesso em 22/4/18.

EKAMBARAM, S. P.; PERUMA, S. S.; PAVADA, S.; Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal edema in zebrafish model. *Inflammopharmacol* Doi:10.1007/s10787-016-0303-2.

FADEYI, Saudat Adamson et al. In vitro anticancer screening of 24 locally used Nigerian medicinal plants. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.79-87, 8 abr. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-13-79>.

HUANG, Yi et al. The Use of Zebrafish (*Danio rerio*) Behavioral Responses in Identifying Sublethal Exposures to Deltamethrin. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.3650-3660, 2 abr. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110403650>.

KINKEL, Mary D. et al. Intraperitoneal Injection into Adult Zebrafish. **Journal Of Visualized Experiments**, [s.l.], n. 42, 30 ago. 2010. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/2126>.

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 (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish*. DOI. 10.1089/zeb.2017.1436, 2017.

SANT`ANNA, Maria Cristina Berta. **Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro**.2006. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SIMÕES, L.n.; GOMES, L.c.. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.613-620, jun. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352009000300014>.

SOUZA, Roberto Almeida Rêgo de et al. EFEITO COMPARATIVO DA BENZOCAÍNA, MENTOL E EUGENOL COMO ANESTÉSICOS PARA JUVENIS DE ROBALO PEVA. **Bol. Inst. Pesca**. São Paulo, p. 247-255. 38(3).2012.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade de Fortaleza e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Estadual do Ceará e a FUNCAP por viabilizarem a realização deste trabalho.