

**OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) E AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NÃO CLÍNICA UTILIZANDO ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) ADULTO<sup>1</sup>**

*OBTAINING THE ESSENTIAL OIL FROM THE INDIAN CARNATION (*Syzygium aromaticum*) AND NON-CLINICAL SAFETY ASSESSMENT USING ADULT ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)*

**Vitória Ellen Lima Bantim**

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5622-9117>  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7675769479403664>  
Universidade Estadual do Ceará, CE, Brasil  
E-mail: [vitoria.bantim@aluno.uece.br](mailto:vitoria.bantim@aluno.uece.br)

**Pedro Henrique Ribeiro Lopes**

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5928-6021>  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9265820053474041>  
Universidade Estadual do Ceará, CE, Brasil  
E-mail: [pedrohenrique.lopes@aluno.uece.br](mailto:pedrohenrique.lopes@aluno.uece.br)

**Tigressa Helena Soares Rodrigues**

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8044-3121>  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1726823683011143>  
Universidade Estadual Vale do Acaraú, CE, Brasil  
E-mail: [tigressa.rodrigues@aluno.uece.br](mailto:tigressa.rodrigues@aluno.uece.br)

**Maria Kueirislene Amâncio Ferreira**

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4270-8109>  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7980864567733551>  
Universidade Estadual do Ceará, CE, Brasil  
E-mail: [kueirislene.ferreira@aluno.uece.br](mailto:kueirislene.ferreira@aluno.uece.br)

**Antônio Wlisses da Silva**

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1686-1644>  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7201060534343864>  
Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciência e Tecnologia  
E-mail: [wlissesdasilva@hotmail.com](mailto:wlissesdasilva@hotmail.com)

<sup>1</sup> Artigo advindo dos Anais do I Simpósio de Meio Ambiente e Energia (I SiMAE) – Fortaleza, CE

**Jane Eire Silva Alencar de Menezes**Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1968-0643>Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5495579352462112>

Universidade Estadual do Ceará, CE, Brasil

E-mail: jane.menezes@uece.br

**Helcio Silva dos Santos**Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5527-164X>Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3478842054984497>

Universidade Estadual Vale do Acaraú, CE, Brasil

E-mail: helciodossantos@gmail.com

**RESUMO**

Óleos essenciais são substâncias odoríficas, encontrados por várias partes das plantas. A atividade locomotora avalia drogas que causam comprometimento locomotor ou não. O objetivo desse trabalho foi obter o óleo essencial do cravo da Índia e realizar a avaliação da segurança não clínica utilizando zebrafish. O OE foi obtido por meio de hidrodestilação. Para o teste de campo aberto, os zebrafish receberam doses de OE (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 h de análise, os valores obtidos com o número de ZFa mortos foram submetidos à análise estatística para estimar DL para matar 50%. O OE apresentou composição elevada teor de eugenol e baixos teores de acetato de eugenila e  $\beta$ -cariofileno. Além disso, alterou o sistema locomotor do zebrafish e é considerado seguro, pois não se mostrou tóxico até 96h de análise.

**PALAVRAS-CHAVE:** Óleo essencial. Cravo da Índia. Segurança não clínica. Atividade locomotora. Zebrafish.

**ABSTRACT**

*Essential oils are odorous substances, found by various parts of plants. Locomotor activity evaluates drugs that cause locomotor impairment or not. The objective of this work was to obtain the essential oil of cloves and perform a non-clinical safety assessment using zebrafish. The EO was obtained through hydrodistillation. For the open field test, zebrafish received doses of OE (4, 20 and 40 mg / kg); DMSO 3% and DZP 40mg / kg. After 30 min, the animals were added in 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 h of analysis, the values obtained with the number of ZFa killed were subjected to statistical analysis to estimate DL to kill 50%. The OE had a high eugenol composition and low eugenyl acetate and  $\beta$ -karyophylene levels. In addition, it changed the zebrafish locomotor system and is considered safe, as it was not toxic until 96 hours of analysis.*

**KEYWORDS:** *Essential oil. Cloves. Non-clinical safety. Locomotor activity. zebrafish.*

## INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OE) são substâncias odoríferas, voláteis a temperatura ambiente, e podem ser extraídos através de flores, raízes e frutos. A hidrodestilação é o método mais utilizado na extração de OE <sup>1</sup>. São reconhecidos como agentes terapêuticos desde a antiguidade pelas propriedades farmacológicas e psicológicas. Eles são uma mistura complexa de compostos voláteis consistindo principalmente de benzenoides, fenilpropanóides, monoterpenóides e sesquiterpenóides<sup>2</sup>. Possuem algumas atividades biológicas, como propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiinflamatórias, antioxidantes, anticâncer e antinociceptivas <sup>2</sup>.

A composição química do OE pode variar significativamente dependendo de vários fatores, incluindo as condições da parte aromática da planta, a localização geográfica, o método de extração e o tempo de extração. Vários métodos de extração são usados para produzir OE, incluindo destilação a vapor, destilação a seco, hidrodestilação e destilação a vapor de alta pressão <sup>3</sup>. A prensagem a frio é usada no caso de extração de óleo de casca especificamente de frutas cítricas. A destilação a vapor é o método mais comum amplamente usado para a produção industrial de OE. Embora a aplicação de métodos de extração por solvente usando vários solventes (por exemplo, extração de CO<sub>2</sub> supercrítico ou extração de fluido supercrítico) esteja ganhando popularidade na indústria de aromas e sabores, os extratos obtidos por essas técnicas não são considerados verdadeiros EOs <sup>2</sup>.

Estudos apontam os múltiplos benefícios que os OE têm na saúde mental dos humanos, incluindo efeitos ansiolíticos / antidepressivos, aprimoramento do processamento cognitivo, aprimoramento da atenção, efeitos psicoestimulantes e aprimoramento da memória. Um levantamento desses estudos foi recentemente realizado por <sup>4</sup> e mostra uma visão geral dos experimentos pré-clínicos e clínicos que estudam o efeito dos óleos essenciais (OE) no sistema nervoso e suas propriedades no Sistema Nervoso Central (SNC).

O cravo da Índia é um botão floral seco do *Syzygium aromaticum*, uma planta de porte arbóreo com copa alongada característica e que pode atingir em média 8-10 metros de altura. Seu nome mais conhecido cientificamente é *Eugenia caryophyllus*.

Os principais componentes químicos do OE do cravo da Índia são: acetato de eugenila, cariofileno e eugenol <sup>1</sup>.

Na maioria das pesquisas científicas, alguns animais são utilizados para estudar melhor as causas das doenças humanas e aplicar teste para terapias inovadoras. O Zebrafish foi utilizado na pesquisa científica por George Streisinger, biólogo, professor da Universidade de Oregon. Ele percebeu que existe uma grande vantagem na utilização do peixe em estudos científicos, pois os peixes são de pequenos portes, sua manutenção é simples e sua criação é econômica comparada aos roedores <sup>5</sup>. Assim, o presente trabalho teve por objetivo obter o OE do cravo da Índia e realizar a avaliação da segurança não clínica utilizando zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

Os botões florais de *S. aromaticum* foram adquiridos no mercado público de Sobral - CE e levado ao Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Vale do Acaraú para obtenção do óleo essencial do cravo (OECRAVO).

### Protocolo de aclimação dos animais

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). Grupos de 60 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 peixes foram sacrificados com água gelada (5 °C). 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.

Os testes foram realizados baseando-se em metodologias propostas por <sup>6</sup> e <sup>7</sup>. No dia dos experimentos, os peixes foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou controles, via intraperitoneal (i.p.). Em seguida foram acondicionados individualmente em béqueres (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via intraperitoneal (i.p.) foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine<sup>®</sup> BD) com uma agulha de calibre 30G.

### Obtenção do óleo essencial

O OE dos botões florais de *Syzygium aromaticum* foi obtido por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger durante 2h. Em seguida, o óleo essencial foi coletado, armazenado em frascos de vidro (Fig. 1) e estocados em freezer.



Figura 1- Botões florais de *S. aromaticum* (A), OECRAVO (B)

### Avaliação da Atividade locomotora

Os zebrafish ZFa (n=6/grupo) foram tratados, via intraperitoneal (*i.p.*), com 20  $\mu$ L das soluções do OE 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 atividade locomotora 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 aguda 96h

Os animais receberam os mesmos tratamentos descritos em 4.1. Após 96h de análise, o número de ZFa mortos foram submetidos à análise estatística, estimando-se a Dose Letal para matar 50% (DL<sub>50</sub>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise Química

A composição química do OE dos botões florais de *S. aromaticum* está descrita na Tabela 1. Observa-se que foi possível a identificação de três constituintes totalizando 99,00 %.

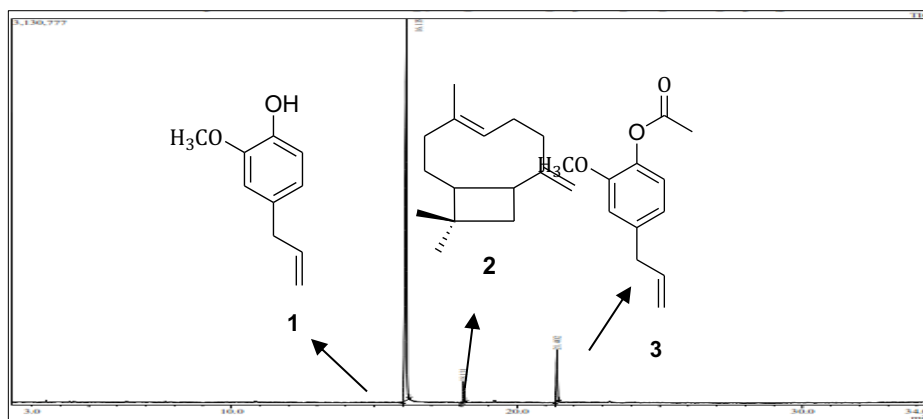
**Tabela 1-** Composição química do OE dos botões florais de *S. aromaticum*

Composto	IK <sub>lit</sub> <sup>2</sup>	Área relativa (%)
Eugenol	1359	83,90
β-Cariofileno	1419	3,57
Acetato de Eugenila	1523	11,53
Total		99,00

<sup>1</sup>IK<sub>lit</sub> : Índice de Kovats da literatura

A análise do OE dos botões florais de *S. aromaticum* permitiu a identificação do fenilpropanóide eugenol (83,90%), além do sesquiterpeno não oxigenado β-cariofileno (3,57%) e do acetato de eugenila (11,53%) (Fig. 2). Este resultado encontra-se de acordo com a literatura onde uma amostra de óleo essencial de *S. aromaticum* coletada na região sul de Ilhéus, apresentou elevado teor de eugenol e baixos teores de acetato de eugenila e β-cariofileno. A ordem dos tempos de retenção (TR) dos constituintes majoritários do *S. aromaticum* é eugenol, β-cariofileno e acetato de eugenila <sup>1</sup>, confirmada na análise do cromatograma do OE dos botões florais de *S. aromaticum* (Fig.2).





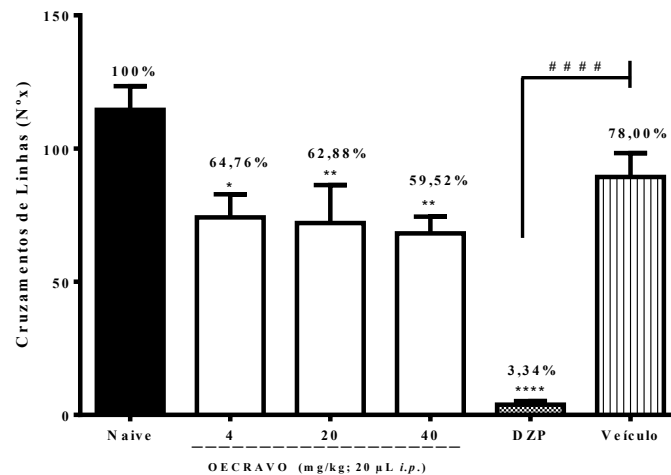
**Figura 2-** Cromatograma do OE dos botões florais de *S. aromaticum* eugenol (1),  $\beta$ -cariofileno (2) e acetato de eugenila (3).

### Avaliação da atividade locomotora

A atividade locomotora é um dos parâmetros de análise comportamental que vem sendo utilizado para avaliar ação de drogas que podem atuar sob o sistema nervoso central do zebrafish (*Danio rerio*) adulto e causar comprometimento locomotor ou não<sup>8-10</sup>.

Essa atividade pode ser explorada através do Teste de Campo Aberto, em um aquário<sup>11</sup>, bem como placas de Petri<sup>12</sup>. Como resultado, observou-se que (OECRAVO) 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 naïve ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,1$  vs. naïve) (Fig.3).

O comportamento natural do zebrafish em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante e manifestações de imobilidade, são pouco observadas em condições naturais do zebrafish<sup>13</sup>. A análise da atividade locomotora explorada através de um campo aberto pode ser um modelo empregado para avaliar hiperatividade como sendo indicativo de ansiedade<sup>5</sup>. O tratamento do zebrafish com fármacos ansiolíticos, como benzodiazepínicos, pode aumentar da atividade exploratória no campo aberto<sup>13</sup>, bem como causar efeito sedativo e diminuir atividade locomotora<sup>14,15</sup>.



**Figura 3** - Efeito do óleo essencial do cravo-da-índia sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

A diminuição da atividade locomotora em zebrafish adulto causada pelo (OECRAVO) sugere uma possível ação sedativa, tais como os benzodiazepínicos (drogas ansiolíticas), os quais diminuem atividade locomotora (mobilidade) de zebrafish em campo aberto, conforme destacam. <sup>16, 17</sup>

### Toxicidade 96

Nossos resultados mostraram que o OECRAVO não foi tóxico frente a ZFa até 96 h de análise ( $DL_{50} > 40$  mg/kg).

### CONCLUSÃO

Os dados obtidos revelaram que o OECRAVO apresentou em sua composição elevado teor de eugenol e baixos teores de acetato de eugeila e  $\beta$ -cariofileno. Os resultados indicam que o OE altera o sistema locomotor do zebrafish e é considerado seguro, pois não se mostraram tóxicas até 96h de análise.

### REFERÊNCIAS

- Affonso RS, Rennô MN, Slana GBCA, et al. Aspectos Químicos e Biológicos do óleo Essencial de Cravo da Índia. *Revista Virtual de Química*.
- Adlard ER, K. Hüsnü Can Başer and Gerhard Buchbauer (Eds.): Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. 2nd Edn. *Chromatographia* 2016; 79: 791–791.



3. Rombol L, Tridico L, Scuteri D, et al. Bergamot Essential Oil Attenuates Anxiety-Like Behaviour in Rats. *Molecules* 2017; 22: 614.
4. Lorena R. Lizarraga-Valderrama. Effects of essential oils on central nervous system\_ Focus on mental health \_ Enhanced Reader. *Phytotherapy Research* 2021; 35: 657–679.
5. Resende, R. R; Soccol CR. *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. 1st ed. Capítulo 1: zebrafish como modelo para estudos comportamentais, 2015.
5. Magalhães FEA, De Sousa CÁPB, Santos SAAR, et al. Adult Zebrafish (Danio rerio): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish* 2017; 14: 422–429.
6. Ekambaram SP, Perumal SS, Pavadai S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. *Inflammopharmacology* 2017; 25: 147–158.
7. Kurta A, Palestis BG. Effects of ethanol on the shoaling behavior of Zebrafish (Danio rerio). *Dose-Response* 2010; 8: 527–533.
8. Gebauer DL, Pagnussat N, Piato ÂL, et al. Pharmacology , Biochemistry and Behavior Effects of anxiolytics in zebra fish : Similarities and differences between benzodiazepines , buspirone and ethanol ☆. 2011; 99: 480–486.
9. Taylor JC, Dewberry LS, Totsch SK, et al. A novel zebrafish-based model of nociception. *Physiology and Behavior* 2017; 174: 83–88.
11. Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BHM, et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS ONE*; 6. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0019397.
12. Ahmad F, Richardson MK. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. *Behavioural Processes*. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1016/j.beproc.2012.10.014.
13. Cachat J, Stewart A, Utterback E, et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS ONE*; 6. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017597.

14. Atale N, Gupta S, Yadav UCS, et al. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy*. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1111/jmi.12133.
15. Benneh CK, Biney RP, Mante, Kolibea P, et al. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebra fi sh — Involvement of GABAergic and 5-HT systems. *Journal of Ethnopharmacology* 2017; 207: 129–145.
16. Gupta P, Khobragade S, Rajaram S, et al. Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. *Drug Development and Therapeutics* 2014; 5: 127.
17. Benneh CK, Biney RP, Mante PK, et al. Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. *Journal of Ethnopharmacology* 2017; 207: 129–145.