

**Avaliação da segurança não clínica do triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA) isolado de *Croton zehntneri* em zebrafish (*Danio rerio*) adulto****Evaluation of the non-clinical safety of triterpene aleuritolic acid (AAA) isolated from *Croton zehntneri* in zebrafish (*Danio rerio*) adult**

DOI:10.34117/bjdv6n8-128

Recebimento dos originais: 08/07/2020

Aceitação para publicação: 12/08/2020

**Antônia Jaqueline Nobre Bezerra**

Mestranda em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Estadual do Ceará-UECE

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: jack\_n\_b@yahoo.com.br

**Maria Kueirislene Amâncio Ferreira**

Doutoranda em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: kueirislene.ferreira@aluno.uece.br

**Antônio Wlisses da Silva**

Doutorando em Biotecnologia de Recursos Naturais (RENORBIO-UECE)

Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: wlissesdasilva@hotmail.com

**Pedro Henrique Ribeiro Lopes**

Mestrando em Ciências Naturais

Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903

E-mail: hlopes2906@gmail.com

**Paulo Nogueira Bandeira**

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Instituição: Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Endereço: Av. da Universidade, 850, CEP: 62.040-370

E-mail: bandeirapn@yahoo.com.br

**Hélcio Silva dos Santos**

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Instituição: Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Endereço: Av. da Universidade, 850, CEP: 62.040-370

E-mail: helciodossantos@gmail.com

**Francisco Ernani Alves Magalhães**

Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais -RENORBIO-UECE

Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)  
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903  
E-mail: fernanimagalhaes@yahoo.com.br

**Jane Eire Silva Alencar de Menezes**

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)  
Instituição: Universidade Estadual do Ceará (UECE)  
Endereço: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 - Itaperi, Fortaleza - CE, 60714-903  
E-mail: jane.menezes@uece.br

## RESUMO

Este trabalho busca a avaliação da segurança não clínica do triterpeno AAA frente aos ensaios com zebrafish (*Danio rerio*) adulto. O triterpeno AAA foi isolado da raiz de *Croton zehntneri*. Soluções desta substância foram preparadas com salina 0,9 %, nas concentrações de (4,0 mg/kg ou 12 mg/kg ou 40 mg/kg; 20 µL i.p) e submetidas ao teste de toxicidade aguda frente ao modelo zebrafish. As mesmas doses foram investigadas quanto ao possível efeito ansiolítico, através do teste de campo aberto. As três dosagens de AAA testadas não foram tóxicas nos zebrafish e não reduziram a atividade locomotora do animal, tendo assim uma possível ação nociceptiva pois a amostra não alterou a atividade locomotora dos animais.

**Palavras-chave:** *Croton zehntneri*, Zebrafish, Nocicepção.

## ABSTRACT

This paper seeks the evaluation of the non-clinical safety of triterpene AAA in front of the adult zebrafish (*Danio rerio*) trials. Triterpene AAA was isolated from *Croton zehntneri* root. Solutions of this substance were prepared with 0.9 % saline at concentrations of (4.0 mg/kg or 12 mg/kg or 40 mg/kg; 20 µL i.p) and subjected to the acute toxicity test against the zebrafish model. The same doses were investigated for possible anxiolytic effect using the open field test. The three dosages of AAA tested were not toxic in the zebrafish and did not reduce the locomotor activity of the animal, thus having a possible nociceptive action because the sample did not alter the locomotor activity of the animals.

**Keywords:** *Croton zehntneri*, Zebrafish, Nociception.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma flora infinitamente diversificada, ainda pouco explorada quanto às suas possíveis atividades farmacológicas. Neste contexto desperta-se o interesse em investigar os compostos químicos dessas espécies vegetais e comprovar cientificamente a ação farmacológica desses compostos (CAVALCANTI et al., 2020).

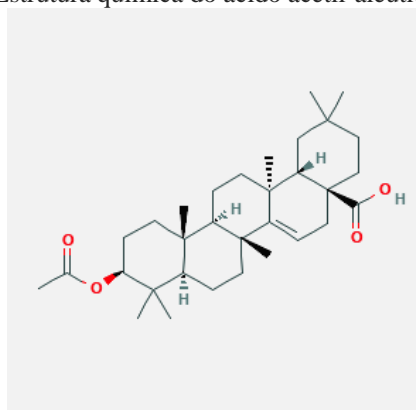
As plantas medicinais surgem como fontes terapêuticas alternativas, pois apresentam em sua composição variedades de moléculas biologicamente ativas, como os triterpenos e que apresentam amplo espectro de atividades biológicas que possam apresentar efeitos no tratamento de diversas doenças (SILVA et al., 2015).

Dentre todas as famílias pertencentes à flora mundial, a família Euphorbiaceae, merece um especial destaque, por ser uma das maiores entre as dicotiledôneas, compreendendo cerca de 300 gêneros, e 5000 espécies. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.300 espécies em todos os tipos de vegetação, sendo o gênero *Croton* o segundo mais representativo com cerca de 700 espécies (GOVAERTS et al., 2000).

Os estudos realizados com espécies de *Croton* têm mostrado uma alta diversidade de estruturas químicas: terpenos (KAWAKAMI et al., 2015; CHAVEZ et al., 2013; PIZZOLATTI et al., 2013; ALDAHAER et al., 2017; QIU et al., 2018; MORA et al., 2011; MATEU et al., 2012; PEREIRA et al., 2012; BERNARDINO et al., 2017; PALMEIRA et al., 2006; TENE et al., 2009), alcalóides e flavonóides também são comuns no gênero (ARAUJO-JUNIOR et al., 2004; SUÁREZ et al., 2004).

O ácido acetil-aleutitólico (AAA) (Figura 1) é um triterpenóide isolado de *Croton zehntneri*, com fórmula molecular  $C_{32}H_{50}O_4$ . O AAA foi isolado anteriormente de outras espécies de Euphorbiaceae, como *C. Cajucara*, e para esta espécie observou-se ação na motilidade gástrica, ação anti-inflamatória e antinociceptiva (MELO et al., 2014).

Figura 1 - Estrutura química do ácido acetil-aleutitólico (AAA)



Conhecido popularmente como “canela de cunhã”, “canelinha” ou “canelabrava”, *C. zehntneri* é uma planta subarborescente e caducifólia, nativa do Nordeste brasileiro (CRAVEIRO et al., 1978). Suas folhas e talos são dotados de um aroma forte e agradável que lembra uma mistura de erva-doce ou anis (*Illicium verum*) e cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) exalado por toda a planta (FERNANDES, ALENCAR e MATOS, 1971).

Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe de água doce que mede  $\pm 5$  centímetros quando adulto, pesando em torno de  $(0,5 \pm 0,2 \text{ g})$ . É utilizado como modelo complementar de experimentação, em

substituição ao uso de roedores. Por ocupar menos espaço, custar menos e ser mais versátil, o uso do peixe está se popularizando no meio científica (DE CAMPOS, 2016).

Nesse contexto, e em virtude do potencial terapêutico dos triterpenos, bem como a crescente utilização do zebrafish (ZFa) como modelo experimental, esse trabalho busca a avaliação da segurança não clínica do triterpeno AAA frente aos ensaios com zebrafish (*D. rerio*) adulto.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 OBTENÇÃO DO TRITERPENO ÁCIDO ACETIL ALEURITÓLICO (AAA)**

O triterpeno AAA foi isolado da raiz de *C. zehntneri* conforme metodologia de Melo et al. (2014) e fornecido pelo Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos, da Universidade Vale do Acaraú (UVA).

### **2.2 PROTOCOLO GERAL ANTES DOS TESTES**

Os testes com zebrafish foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães et al. (2017) e sob os Princípios Éticos do Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 3344801/2017.

Inicialmente, os animais (n=6/grupo) foram tratados com AAA (4,0 mg/kg ou 12 mg/kg ou 40 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%; 20 µL; i.p.). Para o teste de campo aberto, 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 quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL). O valor de CL do grupo Naive como linha de base (100%) e foi calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante 0-5 minutos. Posteriormente, os animais ficaram sob observação (24 à 96h) e então foram contabilizados o número de mortalidade dos animais.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **3.1 TOXICIDADE AGUDA 96H**

O uso de Zebrafish (*D. rerio*) apresenta-se como uma vantagem promissora para avaliação em testes toxicológicos e o potencial terapêutico de determinadas drogas em larga escala (RESENDE; SOCCOL, 2015), apresentando ainda uma série de vantagens em relação aos modelos mamíferos tais como manutenção de baixo custo, prática e experimentação executável em espaços reduzidos (DE CAMPOS, 2016). Desta forma, utilizamos o ZFa como organismo modelo para avaliar o efeito tóxico de AAA.

Como resultado da toxicidade aguda (96 h), todas as doses testadas do triterpeno AAA (4,0 ou 12 ou 40 mg/kg) se mostraram seguras, pois não foram tóxicas frente ao ZFa em até 96 h de análise (Tabela 1).

Tabela 1- Resultado do teste de toxicidade aguda do triterpeno AAA frente ao zebrafish adulto.

Amostra	Mortalidades				96h
	CN	D1	D2	D3	DL <sub>50</sub> (mg/kg) / IV
AAA	0	0	0	1	> 40

CN- Grupo controle negativo: Salina 0,9%; Triterpeno AAA (ácido acetil-aleuritólico); D1 – Dose 1 (1 mg/kg; 20 µL; *i.p.*); D2 – Dose 2 (3 mg/kg; 20 µL; *i.p.*). D3 – Dose 3 (10 mg/kg; 20 µL; *i.p.*); DL<sub>50</sub>-Dose letal para matar 50% do Zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança.

Fonte: Elaborada pelo autor

Este resultado indica o possível uso fitoterapêutico do ácido acetil aleuritólico de acordo com Simões e Almeida (2015).

### 3.2 ATIVIDADE LOCOMOTORA DO ZEBRAFISH (CAMPO ABERTO)

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 (*D. rerio*) adulto e causar comprometimento locomotor ou não (KURTA e PALESTIS, 2010; GERBAUR et al., 2011; TAYLOR et al., 2017).

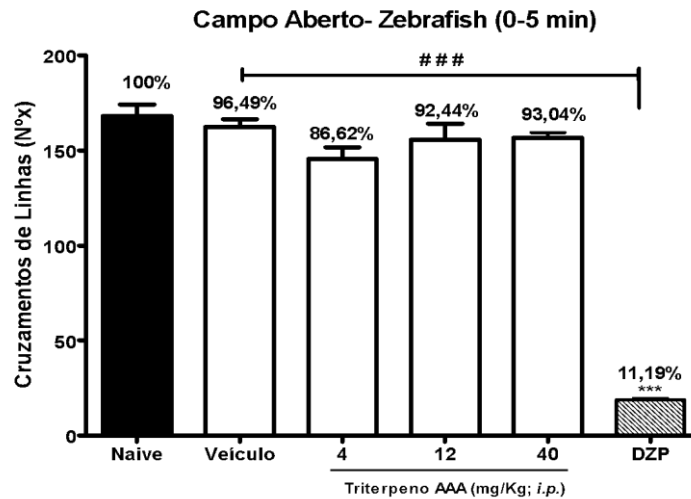
O campo aberto é um teste bastante empregado em roedores para detectar o possível efeito ansiolítico de drogas (CRUZ e LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). Neste teste, diferentes parâmetros podem ser avaliados tais como freezing (imobilidade), entre outros. O comportamento natural do zebrafish em campo aberto é caracterizado por atividade natatória constante e manifestações de imobilidade, são pouco observadas em condições naturais do ZFa (CACHAT et al., 2011).

Recentemente, Magalhães et al. (2017) adaptaram o método para ZFa em placas de Petri, para fazer avaliações locomotoras e comportamentais abrangentes dos efeitos de drogas analgésicas. Portanto, empregamos o mesmo método com o triterpeno AAA para avaliar suas ações sobre o sistema locomotor do ZFa.

Como resultado, nenhuma dose testada do triterpeno AAA (4,0 ou 12 ou 40 mg/kg) causou efeito sedativo e/ou comprometimento locomotor dos animais, pois apresentaram atividade locomotora (AL) significativamente ( $p > 0,05$ ) semelhante aos grupos controles, naive (AL = 100%)

e veículo (AL = 96,49%) e significativamente ( $p < 0,001$ ) diferente do grupo diazepam (DZP) (40 mg/kg; i.p.; ALDZP = 11,19%) (Figura 2).

Figura 2 - Atividade locomotora do zebrafish (*D. rerio*) adulto no Teste de Campo aberto (0- 5 min) Efeito de AAA sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto (0-5min).



Naive - animais não tratados. i.p. – Administração intraperitoneal. Veículo – Salina 0,9% (20  $\mu$ L; i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (\*\* $p < 0,001$  vs Naive; ### $p < 0,001$  vs DZP). Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de atividade locomotora (% AL).

Fonte: Elaborado pelo autor

O fato do triterpeno AAA não alterar a atividade locomotora dos animais no teste no campo do aberto (Figura 1) indica que não houve relaxamento muscular ou efeito sedativo semelhante ao grupo DZP. Estudos realizados por Soares et al. (2019) mostraram que o ácido oleanólico (triterpenóide pentacíclico de ocorrência natural), também não alterou a atividade locomotora do zebrafish adulto.

## 4 CONCLUSÃO

O triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA) isolado da raiz de *C. zehntneri* possui segurança clínica, pois não foi tóxico frente a zebrafish (*D. rerio*) adulto até 96 h de análise. O triterpeno AAA apresentou possível efeito antinociceptivo, pois não alterou a atividade locomotora dos animais.

**REFERÊNCIAS**

ALDAHAER, A.; LANGART, M.; NDUNDA, B.; CHIRCHER, D.; MIDIWO, J. O.; NJUE, A.; SCWIKKARD, S.; CAREW, M.; MULHOLLAND, D. Diterpenoids from the roots of *Croton dichogamus* Pax. *Phytochemistry*, v. 144, p. 1-8, 2017.

ARAÚJO-JÚNIOR, V. T.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; AGRA, M. F.; SILVA, R. N.; BARBOSA, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and diterpenes from *Croton moritibensis*. *Pharmaceutical Biology*, v. 42, n. 1, p. 62-67, 2004.

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*, v.9, n. 4, p. 052-062, 2015.

BERNARDINO, A. C.; TEIXEIRA, A. M.; MENEZES, J. E. S. A.; PINTO, C. C. C.; SANTOS, H. S.; FREIRE, P. C.; COUTINHO, H. M.; SENA-JUNIOR, D. M.; BANDEIRA, P. N.; BRAZ-FILHO, R. Spectroscopic and microbiological characterization of labdane diterpene 15,16-epoxy-4-hydroxy-labda-13(16),14-dien-3,12-dione isolated from the stems of *Croton jacobinensis*. *Journal of Molecular Structure*, v. 1147, p. 335-344, 2017.

CACHAT, J.; STEWART, A.; UTTERBACK, E.; HART, P.; GAIKWAD, S.; WONG, K. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PLoS One*, v. 6, n. 3, p.17597-17610, 2011.

CAVALCANTI, D. F. G.; SILVEIRA, D. M.; SILVA, G. C. Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). *Braz. J. of Develop.*, v. 6, n. 7, p. 45931-45946, 2020.

CHAVEZ, K.; RIINA, R.; COMPAGNONE, R. S.; SUÁREZ, A. I.; BRICEÑO, A.; GONZALEZ, T.; LANDAETA, C.; SQUITIERI, E. Crotofolanes diterpenes from *Croton caracasana*. *Natural Product Communications*, v. 8, n. 12, p. 1679-1682, 2013.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, C. H. S.; MACHADO, M. I. L. Composição química de óleos essenciais de espécies nordestinas de croton. *Cienc. Cult*, v. 30, p. 326-327, 1978.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Cienc. Cult*, v.29, p. 445, 1977.

CRUZ, A. P. M., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Em: J. landeira-Fernandez e Sérgio Fukusima (org), *Métodos em Neurociência*. São Paulo: Manole, p. 192-217, 2012.

DE CAMPOS, E. G. Zebrafish como organismo modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada. 2016. 72 f. Dissertação: Mestrado em Ciências: Área Química. Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2016.

FERNANDES, L. R.; ANTUNES, A. S.; Informações estratégicas sobre plantas medicinais obtidas a partir de bases de dados em linha Mimeo. Rio de Janeiro: UFRJ, 2000.



GEBAUER, D. L.; PAGNUSSAT, N.; PIATO, A. L.; SCHAEFER, I. C.; BONAN, C. D.; LARA, D. R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 99, p. 480-486, 2011.

GOVAERTS, R.; FRODIN, R. D.; RADCLIFFE-SMITH, A. World checklist and bibliography of Euphorbiaceae. Royal Botanical Gardens, Kew, 2000.

KAWAKAMI, S.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; INAGAKI, M.; TAKEDA, Y.; KAWAHATA, M.; YAMAGUCHI, K. Crotoascarins I–K: Crotofolane-type diterpenoids, crotoascarin  $\gamma$ , isocrotofolane glucoside and phenolic glycoside from the leaves of *Croton cascarilloides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 63, n. 12, p. 1047-1054, 2015.

KURTA, A.; PALESTIS, B. G. Effects of ethanol on the shoaling behavior of zebrafish (*Danio rerio*). *Dose-Response*, v. 8, p.527-533, 2010.

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

MATEU, E.; CHAVEZ, K.; RIINA, R.; COMPAGNONE, R. S.; MONACHE, F. D.; SUÁREZ, A. I. New 3,4-Seco-ent-kaurene dimers from *Croton micans*. *Natural Product Communications*, v. 7, n. 1, p. 5-8, 2012.

MORA, S.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; CHAVARRIA, M.; MURILLO, R. Two new 3,4-seco-ent-kaurenes and other constituents from the Costa Rican endemic species *Croton megistocarpus*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 94, n. 10, p. 1888-1892, 2011.

PALMEIRA, S.; ALVES, V.; MOURA, F.; VIEIRA, L.; CONSERVA, L.; LEMOS, R. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 3, p. 397-401, 2006.

PEREIRA, S.; TALEB-CONTINI, S.; COPPEDE, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.; PEREIRA, A. M. An ent-Kaurane-type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. *Molecules*, v. 17, n. 18, p. 8851-8858, 2012.

PIZZOLATTI, M.; BORTOLUZZI, A.; BRIGHENTE, I.; ZUCHINALLI, A.; CARVALHO, F.; CANDIDO, A.; PERES, M. Clerodane diterpenes from bark of *Croton urucurana* Baillon. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, n. 4, p. 609-614, 2013.

QIU, M.; JIN, J.; ZHOU, L.; ZHOU, W.; LIU, Y.; TAN, Q.; CAO, D.; ZHAO, Z. Diterpenoids from *Croton crassifolius* include a novel skeleton possibly generated via an intramolecular [2+2]-photocycloaddition reaction. *Phytochemistry*, v. 145, p. 103-110, 2018.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. Vol. 1, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2015.

SILVA, R. O. S.; ASSREUY, A. M. S.; MADEIRA, J. C.; CHAGAS, F. D. S.; PARREIRAS, L. A.; SANTOS, G. R. C.; MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. G. Purified polysaccharides of



Geoffroea spinosa barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. *Carbohydrate Polymers*, v. 124, p. 208-215, 2015.

SIMÕES, R. C.; DE ALMEIDA S. S. M. S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae), *Biota Amazônia*, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015.

SOARES, I. C. R.; SANTOS, S. A. A. R. COELHO, R. F.; ALVES, Y. A.; VIEIRA, A. E.; TAVARES, K. C. MAGALHÃES, F. E. A. Oleanolic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors. *Chemico-Biological Interactions*, v. 299, p. 37-43, 2019.

SUÁREZ, A. I.; BLANCO, Z.; MONACHE, F. D.; COMPAGNONE, R. S. Three new glutarimide alkaloids isolated from *Croton cuneatus*. *Natural Product Research*, v. 18, p. 421-426, 2004.

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 & Behavior*, v. 174, p. 83-88, 2017.

TENE, M.; NDONTSA, B. L.; TANE, P.; TAMOKOU, J. D.; KUIATE, J. R. Antimicrobial diterpenoids and triterpenoids from the stem bark of *Croton macrostachys*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, v. 3, n. 3, p. 538-544, 2009.