

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO DE *Syagrus coronata* EM MODELO DE TOXICIDADE AGUDA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

¹ Francisca Amanda de Oliveira Silva; ² Vitória Maria de Freitas Franco; ³ Meykson Alexandre da Silva; ⁴ José Eduardo Ribeiro Honório Júnior; ⁵ Maria Tereza dos Santos Correia; ⁶ Márcia Vanusa da Silva;

¹ Pós-Graduanda em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará – UFC; ² Pós-Graduanda em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará; ³ Dr. em Ciências Biológicas - UFPE; ⁴ Unichritus, Docente do Centro Universitário Christus; ^{5,6} Docente Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Área temática: Temas transversais

Modalidade: Comunicação Oral Online

E-mail dos autores: amandaoliveiraa@alu.ufc.br ¹; vitoriafreitas128@gmail.com ²; meykson.silva@ufpe.br ³; jose.ribeiro@unichristus.edu.br ⁴; maria.tscorreia@ufpe.br ⁵; marcia.vanusa@ufpe.br ⁶;

RESUMO

INTRODUÇÃO: Modelos alternativos que seguem o princípio dos 3R's são usados para promover o bem-estar animal e avançar na pesquisa científica, dentre estes modelos, o zebrafish é um animal modelo que segue os princípios dos 3R's para o estudo de compostos biológicos, por conta de sua fisiologia semelhante à de mamíferos. A palmeira *Syagrus coronata*, ou licuri, nativa do semiárido brasileiro, é rica em compostos com propriedades biológicas interessantes, desde antinociceptivas, anti-inflamatórias, antimicrobianas às moléculas antioxidantes. **OBJETIVO:** O presente estudo possui o objetivo de analisar a toxicidade aguda do óleo fixo da *S. coronata* em um modelo alternativo de toxicidade aguda utilizando zebrafish. **MÉTODOS:** O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) e obteve aprovação com o protocolo número CEUA 007/22. Os animais foram expostos ao óleo fixo extraído da amêndoa do *S. coronata*, que foi previamente aquecida antes da prensagem com o intuito de aumentar o seu rendimento, foram adotadas as doses de 10, 50 e 100 mg/kg e os animais testados foram monitorados por um período de 96 horas. A observação dos peixes após a aplicação foi registrada em uma tabela de sinais clínicos, onde foram anotadas alterações no comportamento, na anatomia corpórea e na mortalidade. A rotina de monitoramento incluiu duas avaliações por dia no 1º dia, duas avaliações diárias nos 2º e 3º dias, e uma avaliação diária no 4º dia. **RESULTADOS:** As concentrações testadas não foram suficientes para determinar a DL50, pois não apresentaram toxicidade elevada, não havendo mortalidade entre os grupos. Entretanto, foram observados sintomas clínicos, como alterações no comportamento de natação, mudanças na pigmentação da pele e outras anormalidades visíveis. **CONCLUSÃO:** Conclui-se que o óleo fixo das amêndoas de licuri não apresentou efeitos tóxicos relevantes em zebrafish.

Palavras-chave: Zebrafish; Toxicidade; Licuri.

1 INTRODUÇÃO

Modelos alternativos a utilização de animais que visem o cumprimento do princípio dos 3R's da experimentação animal (substituir, reduzir e refinar) são bastante empregados em diversas áreas com o objetivo de conduzir investigações científicas e assegurar o bem-estar animal (Sneddon, Halsey; Bury, 2017). Na toxicologia, a experimentação em modelos de peixe zebrafish é bastante utilizado dado a eficiência, versatilidade e algumas semelhança anatomofisiológicas com algumas espécies de mamíferos como, roedores, cães, entre outras, para estudar inúmeros compostos com aplicações biológicas (MacRae, Peterson, 2023; Cassar; Dunn; Ramos, 2020).

A *Syagrus coronata*, uma palmeira nativa do da caatinga no semi-árido do nordeste brasileiro, também conhecida como licuri, cuja composição fitoquímica é rica em ácidos graxos de cadeia média, polifenóis e flavonoides (Dos Santos Nunes *et al*, 2024). Possui comprovada atividade antinociceptiva e antiinflamatória (Barbosa *et al*, 2024), antimicrobiana (Anand *et al*, 2019), antioxidante (Dos Santos Nunes *et al*, 2024), entre outras. Deste modo o presente estudo possui o objetivo de analisar a toxicidade aguda do óleo fixo da *S. coronata* em um modelo alternativo de toxicidade aguda utilizando zebrafish (*Danio rerio*).

2 MÉTODO

Composto

Para a realização dos estudos de toxicidade em zebrafish foi utilizado o óleo extraído da amêndoa do *S. coronata*, que foi previamente aquecida antes da prensagem para facilitar a liberação de uma maior quantidade de óleo.

Animais

O projeto foi enviado para a avaliação do Comitê de Ética de uso Animal (CEUA), e aprovado número do protocolo da CEUA: 007/22. Todos os experimentos de comportamento e eutanásia ocorreram dentro das dependências do Laboratório de Comportamento Animal (uma extensão no campus Benfica) do Biotério da Unichristus, respeitando a Resolução Normativa CONCEA nº22/2015 e Lei nº11.794, de 2008, conhecida como Lei Arouca.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e normas internacionais (Guide for the Care and use of Laboratory Animals, National Academy of Science, EUA, 2011). Para esse projeto, utilizamos 32 zebrafish adultos. Os animais foram mantidos em aquários de vidro (5 ZFa/L), à temperatura de 27°C, em ciclos de claro-escuro de 14/10 ou 12/12 horas.

Delineamento experimental

Os peixes foram anestesiados com água fria a 10°C e, em seguida, foi aplicado o óleo via intraperitoneal por um período de 96 horas, em condições estáticas, semi-estáticas ou de fluxo. Para o monitoramento dos peixes pós-aplicação, foi utilizada uma tabela de registros de sinais clínicos, onde foram anotadas anormalidades relacionadas ao comportamento e à aparência, bem como a mortalidade. As observações foram feitas conforme o seguinte cronograma: no 1º dia, 2 vezes ao dia; no 2º e 3º dias, 2 vezes ao dia; e no 4º dia, apenas 1 vez ao dia (OECD, 2018). As doses testadas do óleo foram 10mg/kg, 50mg/kg e 100mg/kg.

3 RESULTADOS

Determinação da DL50

O óleo extraído de *S. coronata*, nas doses testadas (10 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg), não apresentou toxicidade suficiente para causar a mortalidade dos animais. A dose de 100 mg foi a dose máxima permitida para ser testada no modelo animal zebrafish, conforme o protocolo.

Sinais Clínicos

Apesar de não causar mortalidade nos animais, o composto provocou alterações clínicas, como comportamento anormal de natação, pigmentação anormal da pele e outras anormalidades visíveis.

Nas alterações de comportamento de natação, foi observado um comportamento anormal de distribuição inferior (Perto da base do tanque, mergulho deitado; estático no fundo do aquário ou logo

acima do fundo): 37,5% dos animais na dose de 10 mg/kg, 50% na dose de 50 mg/kg e 100% na dose de 100 mg/kg apresentaram esse comportamento. Além disso, os animais exibiram reatividade excessiva (Voo (sobressalto) ou resposta de evitação a: visual (mão passando por cima do tanque, luminoso (feixe de luz), tátil (toque) ou estímulo de vibração (tanque batido levemente)) aos estímulos, com 62,5% dos animais nas doses de 10 mg/kg e 50 mg/kg demonstrando essa reação, e 87,5% dos animais na dose de 100 mg/kg. Apenas as doses de 10 mg/kg e 50 mg/kg apresentaram comportamento de cardume em 100% dos animais e hiperatividade (Agitação e nado errático) em 62,5%, enquanto a dose de 100 mg/kg resultou em hipoatividade (Letargia e apatia) em 100% dos animais (Tabela 1).

Tabela 1 - Alterações no comportamento de natação

Grupo	Distribuição Comportamento inferior anormal	Reativo demais ao estímulo	Escolaridade densa/ comportamento de cardume	Hiperatividade	Hipoatividade
Controle	12,5 %	25%	0%	0%	12,5%
Dose 10	37,5%	62,5%	100%	62,5%	0%
Dose 50	50%	62,5%	100%	62,5%	0%
Dose 100	100%	87,5%	0%	0%	100%

Fonte: Dados da pesquisa

Os animais apresentaram alterações anormais na pele. Na dose de 10 mg/kg, 87,5% dos animais exibiram iluminação anormal; na dose de 50 mg/kg, a alteração foi observada em 62,5% dos animais; e na dose de 100 mg/kg, 100% dos animais apresentaram a mesma alteração (Tabela 2). Os animais apresentaram outras anormalidades visíveis. Na dose de 10 mg/kg, 12,5% dos animais exibiram hemorragias; na dose de 50 mg/kg, esse índice aumentou para 25%; e na dose de 100 mg/kg, 12,5% dos animais também apresentaram hemorragias.

Tabela 2 - Alterações na pigmentação anormal da pele.

Grupo	Iluminação
Controle	0%
Dose 10	87,5%
Dose 50	62,5%
Dose 100	100%

Fonte: Dados da pesquisa

DISCUSSÃO

O modelo de toxicidade em zebrafish é bastante utilizado para a avaliação da toxicidade e segurança de muitos compostos. Alguns estudos demonstraram que o zebrafish e os mamíferos compartilham semelhanças significativas em termos de fisiologia, desenvolvimento, metabolismo e vias biológicas, mostrando que algumas respostas a substâncias tóxicas são altamente indicativas das reações observadas em mamíferos (He *et al.*, 2014).

No presente estudo, o óleo fixo extraído das amêndoas de licuri apresentou efeitos no comportamento e na fisiologia dos animais, como alterações no comportamento de natação, variações na coloração da pele e outras anormalidades visíveis, mas não ocasionou uma alta mortalidade, demonstrando assim um baixo nível de toxicidade. Corroborando com esses achados, o estudo recente conduzido por Barbosa (2024) também demonstrou a ausência de mortalidade no teste de toxicidade aguda com o uso do óleo de amêndoa de licuri. Ademais, em outras pesquisas com o óleo extraído da amêndoa de *S. coronata*, destinadas a avaliar a segurança biológica, também não foram detectados efeitos tóxicos significativos nem danos genéticos após administração oral (Dos Santos Souza *et al.*, 2021).

Contudo, esses resultados indicam que, embora o óleo possa influenciar nos parâmetros fisiológicos e comportamentais de zebrafish, ele possui um perfil de segurança elevado, sem causar efeitos letais nos animais testados.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo fixo das amêndoas torradas de licuri não apresenta efeitos tóxicos relevantes em zebrafish, demonstrando assim um perfil de segurança elevado. No entanto, são necessários mais estudos para investigar de forma mais aprofundada as alterações comportamentais dos zebrafish e determinar sua DL50 efetiva neles e em outros modelos animais.

REFERÊNCIAS

UTTPAL, Anand.; JACOBO-HERRERA, Nadia.; ALTEMIMI, Ammar.; LAKHSSASSI, Naoufal. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. **Metabolites**. v. 9, n. 11, p. 258, 2019.

BARBOSA, Bartira Victória Dantas Da Rocha. *et al.* Almond fixed oil from *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. has antinociceptive and anti-inflammatory potential, without showing oral toxicity in mice. **J Ethnopharmacol**. v. 331, n. 15, p. 118283. 2024.

CASSAR, Steven.; DUNN, Christina.; RAMOS, Meg Ferrell. Zebrafish as an Animal Model for Ocular Toxicity Testing: A Review of Ocular Anatomy and Functional Assays. **Toxicol pathol**. v. 49, n. 3, p. 438-454. 2020.

DOS SANTOS NUNES, Ricardo Gomes. *et al.* *Syagrus coronata* fixed oil prevents rotenone-induced movement disorders and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **J Toxicol Environ Health A**. v. 17, n. 87, p. 497-515, 2024.

DOS SANTOS SOUZA, Talita Giselly. *Et al.* Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **J Ethnopharmacol**. v. 23. n. 272, p. 113941. 2021.

HE, Jian-Hui. *et al.* Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicol Teratol**. v. 42, p. 35-42, 2014.

MACRAE, Calum A.; PETERSON, Randall T. Zebrafish as a Mainstream Model for In Vivo Systems Pharmacology and Toxicology. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. v. 20, n. 63, p. 43-64. 2023.

SNEDDON, Lynne U.; HALSEY, Lewis G.; BURY, Nic R. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **J Exp Biol**. v. 1, n. 220, p. 3007-3016. 2017.