



POTENCIAL TOXICOLÓGICO E ETOLÓGICO DE ANSIEDADE DO CHÁ DO FITOTERÁPICO BARBATIMÃO (*Stryphnodendron barbatiman*) FRENTE A ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

Emanuela de Lima Rebouças^{1,2a*} (PG), Antônio Wlisses da Silva^{1a*} (PG), Marnielle Rodrigues Coutinho^{1a}, Brenda Silva do Prado^a, Gerciano de Freitas Souza,^{1a}, Antônia Renata Freire de Freitas^b, Luiz Francisco Wemmenson Gonçalves Moura^{2a,b}, Maria Izabel Florindo Guedes^a (PQ), Adriana Rolim Campos^b (PQ), Erlândia Alves Magalhães^c (PQ), Maria Kueirislene Amâncio Ferreira^c (PQ), Francisco Ernani Alves Magalhães^{a-c*} (PQ)

¹ Especialização em Biotecnologia e Biologia Molecular Aplicadas a Área da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará; *emanuelarebouca@gmail.com ;

² Doutorado em Biotecnologia-RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará;

^a Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará; ^b Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Ceará; ^c Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, Tauá, Ceará; *fernanimagalhaes@yahoo.com.br

Resumo

O chá, tinturas e extratos do Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) é um fitoterápico comercializado como antisséptico, anti-inflamatório, antioxidante, antidiabético, analgésico e antimicrobiano. Porém, não existem relatos de sua ação ansiolítica. Assim, este trabalho reporta a toxicidade aguda do chá de Barbatimão (CBar) e sua possível ação ansiolítica frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa). O material botânico (cascas) foi adquirido do Mundo Verde, uma loja de produtos naturais, em Fortaleza-CE. O CBar foi preparado com água mineral e liofilizado. Soluções aquosas (500; 1.000 e 2.000 µg/mL; 20 µL v.o) foram submetidos ao teste de toxicidade aguda frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa) e calculado a concentração letal para matar 50% (CL₅₀) dos ZFa em até 96h. Doses do CBar (12,5; 25 ou 50 mg/Kg) foram investigadas quanto ao possível potencial ansiolítico frente a ZFa, através do teste de campo aberto. Como resultado, o CBar não foi tóxico para ZFa. Todas as doses testadas reduziram a atividade locomotora (AL) dos ZFa em até 14,9%, significativamente semelhante ($p > 0,05$) a ação do controle, diazepam (AL_{DZP} = 20,2%). Os resultados sugerem possível ação ansiolítica do chá de Barbatimão. Novos estudos serão realizados para confirmação e caracterização dos possíveis mecanismos de ação da atividade ansiolítica.

Palavras-chave: Chá de Barbatimão, Potencial Etológico de Ansiedade, Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.



INTRODUÇÃO

O chá é uma das bebidas mais consumidas do mundo. Características como agradável aroma e sabor contribuíram para a popularização dessa bebida, mas é devido às suas propriedades medicinais que está se espalhando pelas diversas culturas. Essas propriedades estão associadas aos compostos biologicamente ativos (flavonoides, catequinas, polifenóis, alcaloides, vitaminas, sais minerais, etc.) que contribuem para a prevenção e o tratamento de várias doenças (BRAIBANTE *et al.*, 2014).

A espécie *Stryphnodendron barbatiman* Mart, é popularmente conhecida como barbatimão sendo pertencente à família Fabaceae e considerada uma planta medicinal rica em taninos condensados que cresce no cerrado brasileiro (FELFILI *et al.*, 1999). O chá, tinturas e extratos do barbatimão são utilizados como antisséptico, anti-inflamatório, hemostático, antioxidante, antidiabético, adstringente, anti-hipertensivo, analgésico, cicatrizante e antimicrobiano e no tratamento de várias infecções cutâneas (Da FONSECA e LIBRANDI, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009; LUCENA *et al.*, 2009).

Diante dos expostos, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial toxicológico e etológico de ansiedade do chá do Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) frente a zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico e preparação do chá

Cascas do caule de *Stryphnodendron barbatiman* Mart (Barbatimão) (BARB), foram adquiridas como fitoterápico (Essência do Ser, Lote: A014235), no Mundo Verde, uma loja de produtos naturais, em Fortaleza - CE. Para obtenção do Chá, 70 g de material seco foi submetido à extração por decocção, por 10 min em 1 L de água mineral fervente (Nishiyama *et al.*, 2010). Após resfriamento a temperatura ambiente (30 ± 2 °C), o chá foi filtrado, liofilizado e acondicionado em frascos estéreis na geladeira (5°C) até utilização.

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa)

Animais, com 60 a 90 dias ($0,4 \pm 0,1$ g), selvagens, de ambos os sexos, foram obtidos de um fornecedor comercial (Fortaleza, CE). O manejo e aclimatização dos animais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM) da Universidade Estadual do Ceará,



Campus do Itaperi, Fortaleza - CE. Os animais foram mantidos em aquário de vidro (n=5/L), à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclos de claro-escuro de 14/10 horas por 24 h. Foi utilizada água da torneira previamente tratada com anticloro (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submerso. Os animais receberam ração *ad libitum*. Os bioensaios realizados estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (#7210149/2016).

Toxicidade aguda frente ao zebrafish (Danio rerio) adulto

O ensaio foi realizado baseando-se em metodologia proposta por **Ekambaram, Perumal e Pavadai (2017)**, com adaptações. Como adaptação do método, ZFa (n=7/grupo) foram tratados via oral com 20 μL de soluções aquosas (500; 1.000 e 2.000 $\mu\text{g/mL}$) do chá liofilizado de Barbatimão (CBar). Como controle negativo foi utilizado água mineral (20 μL ; v.o). Após 24, 48, 72 e 96 horas, os valores obtidos com o número de ZFa mortos foram submetidos à análise estatística, estimando-se a concentração letal para matar 50% (CL_{50}) de ZFa através do método matemático *Trimmed Spearman-Kärber*, com intervalos de confiança de 95% (**Arellano-Aguilar et al., 2015**).

Teste etológico de ansiedade (Teste de Campo Aberto)

O teste foi realizado conforme metodologia proposta por **Magalhães et al (2017)**. Os ZFa (n=6/grupo) foram tratados com soluções aquosas do chá (12,5; 25 ou 50 mg/kg; v.o). Como controle positivo, um grupo de animais foi tratado com Diazepam (DZP; 2,5 mg/Kg v.o), preparado com salina suplementada de Tween 80 a 1%. Após 1 hora dos tratamentos via oral, os animais foram adicionados em placas de Petri, contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas, durante 5 minutos. A possível atividade ansiolítica foi caracterizada pela diminuição da atividade locomotora (AL ou Cruzamentos de Linhas) dos ZFa, comparando-se com o controle (DZP). Os animais que não receberam tratamentos foram considerados como baseline ou naive (100 % de atividade locomotora) e calculado o percentual de atividade locomotora (%AL).

Análise estatística

Os dados do teste de campo aberto foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m). A comparação entre as médias foi realizada utilizando-se análise de variância (ANOVA),



seguida pelo teste de *Tukey*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho, avaliou o potencial tóxico e etológico de ansiedade do chá de cascas do caule de *Stryphnodendron barbatiman* Mart (Barbatimão) comercializado como fitoterápico (Essência do Ser, Lote: A014235). Com o processo de decocção, foram obtidos 600 mg do pó do chá liofilizado (1% de rendimento).

O uso de Zebrafish (*Danio rerio*) apresenta-se como uma vantagem promissora para avaliação da toxicidade e o potencial terapêutico de determinadas drogas em larga escala (**RESENDE e 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 Zebrafish (*Danio rerio*) adulto como organismo modelo para avaliar o efeito tóxico do chá obtido. Como resultado, o chá aplicado por via oral em Zebrafish adulto não se mostrou tóxico nem mesmo em até 96 horas de análise. Os resultados deste trabalho são considerados importantes, pois confirmam a ação não tóxica do chá das cascas do caule de *Stryphnodendron barbatiman* Mart (Barbatimão) já comercializada como fitoterápico.

O teste etológico de ansiedade como o campo aberto é um teste bastante empregado em roedores para detectar o possível efeito ansiolítico de drogas (**CRUZ E LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012**). Recentemente, **Magalhães et al. (2017)** adaptaram o método para Zebrafish (*Danio rerio*) adulto para fazer avaliações locomotoras e comportamentais abrangentes dos efeitos de drogas analgésicas. Assim, foi realizado o mesmo método para avaliar o possível efeito locomotor de soluções do chá de Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) empregando-se o Diazepam como padrão de drogas ansiolíticas. Como resultado, observamos que todas as doses dos chás utilizadas causaram comprometimento motor dos ZFs, semelhante ao controle (diazepam), Figura 1.

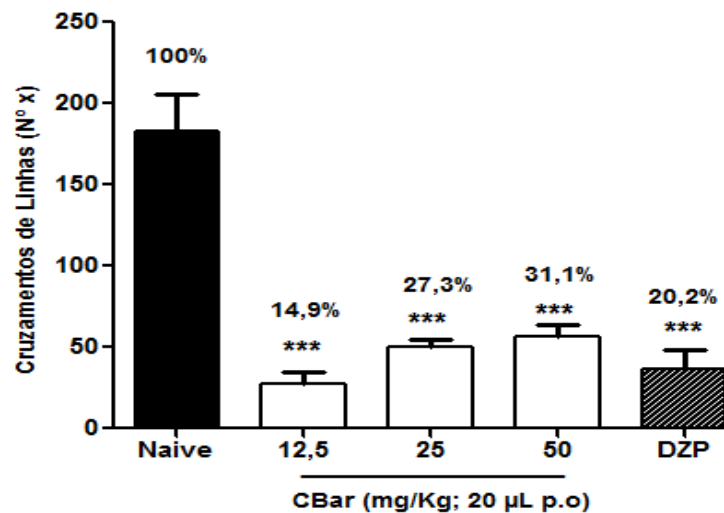


Figura 1. Comportamento locomotor de zebrafish (*Danio rerio*) adulto no Teste de Campo Aberto. CBar-chá de Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). DZP – Diazepam (2,5 mg/Kg; 20 µL v.o). Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo; ANOVA seguida de Tukey. *** $p < 0,001$ vs Naive. Os números acima de cada coluna indicam porcentagem de cruzamentos de linha.

Os animais tratados com o chá nas concentrações de 12,5; 25 ou 50 mg/Kg diminuíram a atividade locomotora dos ZFa em até 14,9%, significativamente semelhante ($p > 0,05$) ao controle ($AL_{DZP} = 20,2\%$). Tais dados sugerem possível ação ansiolítica do chá, pois segundo **Gebauer et al. (2011)**, compostos ansiolíticos tais como os benzodiazepínicos diminuem atividade locomotora de Zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Assim, esses resultados contribuem para mais uma aplicação do chá das cascas de barbatimão, bastante utilizada pela população e para isso são necessários mais estudos para confirmação da atividade ansiolítica do chá.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o chá das cascas de Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) comercializado como fitoterápico, não é tóxico e possui possível efeito ansiolítico frente a Zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Novos estudos serão realizados para a confirmação e caracterização dos possíveis mecanismos de atividade ansiolítica.



AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Especialização em Biotecnologia e Biologia Molecular da UECE. A todos que fazem o Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), pela colaboração. FUNCAP, CNPq e UECE.

REFERÊNCIAS

- ARELLANO-AGUIAR, O. et al.; Use of the Zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences.com** 9(4):052-062, 2015.
- BRAIBANTE, M.E.F. et al.; A Química dos Chás. **Química Nova na Escola** 00(0):1-8 MES, 2014.
- 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, 192-217, 2012.
- DE CAMPOS, E. G. (2016). Zebrafish como organismo modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada. 72p. *Dissertação: Mestrado em Ciências: Área Química*. Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- EKAMBARAM, S. P.; PERUMA, S. S.; PAVADA, S.; Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacol** Doi:10.1007/s10787-016-0303-2.
- FELFILI, J.M. et al.; Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Bras. Bot.** 22:83-90, 1999.
- FERREIRA, S. B. et al.; Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalccólico de *Stryphnodendrom adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **RBAC** 42(1):27-31, 2009.
- DA FONSECA, P.; LIBRANDI, A. P. L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Rev. Bras. Cienc. Farm.** 44(2):271-278, 2008.
- GEBAUER, D. L. et al.; Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacol Biochem Behav** 99:480–486, 2011.
- LUCENA, M. N. et al.; Avaliação da estabilidade da pomada à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville e a sua eficácia na neutralização dos efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. **Revista Horizonte Científico** 3(1):1-29, 2009.
- MAGALHÃES, F.E.A et al.; Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**. DOI. 10.1089/zeb.2017.1436, 2017.
- NISHIYAMA, M. F. et al.; Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 30(Supl.1):191-196, 2010.
- RESENDE, R. R., SOCCOL, C. R. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. Vol. 1, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2015.