



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR

POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS FLORES DE *Ocimum Basilicum* Linn
E EFEITO ANTIMICROBIANO DO ESTRAGOL E DE
SEU COMPLEXO EM β -CICLODEXTRINA USANDO
MODELOS EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ADULTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FRANCISCO LUCAS ALVES BATISTA

CRATO-CE

2020

FRANCISCO LUCAS ALVES BATISTA

**POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE
Ocimum Basilicum Linn E EFEITO ANTIMICROBIANO DO ESTRAGOL E DE SEU
COMPLEXO EM β -CICLODEXTRINA USANDO MODELOS EM ZEBRAFISH
(*Danio rerio*) ADULTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais. Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes

Orientador

Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães

Co-orientador

CRATO-CE

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva de Sousa CRB: 3/1000

Batista, Francisco Lucas Alves.

B333p Potencial antinociceptivo do óleo essencial das flores de *Ocimum Basilicum* Linn e efeito antimicrobiano do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina usando modelos em zebrafish (*Danio rerio*) adulto/
Francisco Lucas Alves Batista. – Crato-CE, 2020

68p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA; Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães

1. *Ocimum basilicum*, 2. Antinociceção, 3. Antimicrobiano, 4. Zebrafish (*Danio rerio*); I. Título.

CDD: 615.32

FRANCISCO LUCAS ALVES BATISTA

**POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FLORES DE
Ocimum Basilicum Linn E EFEITO ANTIMICROBIANO DO ESTRAGOL E DE SEU
COMPLEXO EM β -CICLODEXTRINA USANDO MODELOS EM ZEBRAFISH
(*Danio rerio*) ADULTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais. Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Aprovada em 29 de setembro de 2020

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (URCA) - Membro Interno

Prof^a. Dr^a. Jacqueline Cosmo Andrade (UFCA) - Membro Externo

Prof. Dr. Fábio Hideki Yamada (URCA) - Suplente Interno

Prof(a) Dr(a) Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins (URCA) - Suplente Externo

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (URCA) - Orientador

Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães (UECE) - Co-orientador

Dedico este mérito primeiramente a Deus, que é o responsável pelo meu esforço e dedicação, a minha família que foram a minha base nos momentos difíceis, aos meus grandes amigos irmãos do grupo de pesquisa ao qual fiz e faço parte, e em especial a Ernani Magalhães por ter me ensinado muito do que eu ainda não sabia. A vocês todo meu respeito, carinho e admiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que tudo pode, por me conceder saúde, inteligência e sabedoria para buscar e conquistar sonhos. Pois, tenho certeza que se não fosse por Ele não teria conseguido alcançar todos os ensinamentos e vitórias que alcancei até hoje.

Em especial, agradeço ao meu orientador Professor Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, não somente por me orientar neste trabalho, mas principalmente pelo estímulo, empolgação e motivação. Obrigado pela grande oportunidade de fazer parte da família científica do laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) e principalmente por ajudar no meu crescimento profissional.

Aos meus pais, Francisco Deusvane Ferreira Batista e Francisca Alves Rodrigues pelo companheirismo em todos os momentos, colaboração e incentivo. Vocês são peças importantíssimas nessa conquista e sem eles não haveria motivos suficientes para sonhar por um futuro melhor.

As minhas irmãs, Leividânia Batista, Liliane Batista e Larissa Batista pela cumplicidade, parceria e apoio. Obrigado a toda minha família que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

A todos os meus colegas dos grupos de pesquisa BIOREN e LFQM, e também pelos que tiveram que seguir outros caminhos, obrigado pela ajuda e colaboração e por se mostrarem sempre os melhores companheiros de pesquisa que eu poderia ter ao meu lado.

A minhas amigas e pesquisadoras Rayane Oliveira, Maria Gabriely, Thassya Santos e Jacqueline Andrade por toda a ajuda, incentivo e conselhos, pois tenho a certeza que servirá para o resto de minha vida e a nossa amizade será eterna.

Agradeço a Universidade Regional do Cariri (URCA), ao Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) e as agências financiadoras: CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

Enfim, gostaria de declarar a minha profunda gratidão a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a consecução dessa dissertação e para o meu crescimento pessoal, seja nos momentos de dificuldade, elucidando minhas dúvidas, seja nos momentos de fadiga, incentivando-me. Seria impossível mencionar a todos, mas estou especialmente grato.

Serei eternamente grato!

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Apresentação.....	viii
1 Introdução.....	1
2 Referencial teórico.....	2
2.1 <i>Ocimum Basilicum</i> Linn (Manjeriçã, Lamiaceae)	2
2.2 Atividade antinociceptiva	4
2.3 Atividade antimicrobiana	6
2.4 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto	7
2.4.1 Nocicepção em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto	7
2.4.2 Infecção em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto	8
2.5 Uso de produtos naturais em sistema de liberação em ciclodextrina (CD)	10
2.6 Óleos essenciais e seus componentes	11
2.6.1 Estragol (4-Allylanisole)	12
3 Procedimento experimental e Resultados.....	14
3.1 Manuscrito 1 - Efeito antinociceptivo do óleo essencial das flores de <i>Ocimum basilicum</i> Linn em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	14
3.2 Manuscrito 2 - Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto.....	31
4 Considerações finais.....	39
Referências.....	40
Anexos.....	53
Anexo A - Documento de identificação da espécie, emitido pelo Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri (URCA).....	53
Anexo B - Declaração da Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) - Manuscrito 1.....	54
Anexo C - Declaração da Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri (URCA) - Manuscrito 2.....	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%A	Percentual de analgesia	CIM	Concentração inibitória mínima
%AL	Percentual da atividade locomotora	NaCl	Cloreto de sódio
%I	Percentual de infecção	NSC	Sistema nervoso central
β -CD	β -ciclodextrina	NMDA	N-metil D-Aspartato
BHI-agar	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>	OEFOb	Óleo essencial das flores de <i>Ocimum basilicum</i> Linn
ASIC's	Canais iônicos com detecção de ácido	PKC	Proteína-cinase C
CG/MS	Cromatografia Gasosa com Espectrômetro de Massa	S.a. ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
Capsa	Capsazepina	TRP	Receptor de Potencial Transitório
CL	Cruzamentos de linhas		
CD	Ciclodextrina	TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
CCB	Crescimento da cultura de bactérias	TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1
DL ₅₀	Dose letal necessária para matar 50% dos indivíduos	ZFa	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto
ES/ β -CD	Complexo estragol em β -ciclodextrina		
FTIR	Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourie		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Ocimum basilicum</i> Linn (Manjeriçã, Lamiaceae)	3
Figura 2 - Estrutura química do estragol (4-Allylanisole)	12

Manuscrito 1

Figura 1 - Effect of the essential oil of <i>Ocimum basilicum</i> Linn flowers (OEFOb) on the locomotor activity of adult zebrafish in the Open Field Test (0-5 min)	24
Figura 2 - Effect of the essential oil of <i>Ocimum basilicum</i> Linn flowers (OEFOb) on corneal nociception induced by hypertonic saline (5 M NaCl) in adult zebrafish (0-5 min)	25
Figura 3 - Effect of Capsazepine (Cpasa) on the antinociceptive effect of the essential oil of <i>Ocimum basilicum</i> Linn flowers (OEFOb) in adult zebrafish	26

Manuscrito 2

Figura 1 - Espectro na região do infravermelho: (A) Estragol; (B) β -ciclodextrina; (C) ES/ β -CD	34
Figura 2 - Infecção bacteriana por <i>Staphylococcus aureus</i> em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto durante 24 (A) e 48 h (B)	35
Figura 3 - Efeito antimicrobiano do Estragol e seu complexo ES/ β -CD contra <i>Staphylococcus aureus</i> em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto durante 24 (A) e 48 h (B)	35
Figura 4 - Efeito modulatório do Estragol e seu complexo ES/ β -CD quando associado com Gentamicina contra <i>Staphylococcus aureus</i> em zebrafish (<i>Danio rerio</i>) adulto durante 24 (A) e 48 h (B)	36

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1

Tabela 1 - Chemical profile of the essential oil of <i>Ocimum basilicum</i> Linn flowers (OEFOb)	28
Tabela 2 - Antinociceptive effect of OEFOb in adult zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	29
Tabela 3 - Effect of pre-treatment with naloxone, L-NAME, methylene blue, ketamine, camphor, ruthenium red and amiloride on the antinociceptive effect of OEFOb in adult zebrafish	30

Manuscrito 2

Tabela 1 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) do estragol e seu complexo ES/ β -CD contra cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	34
--	----

RESUMO

A espécie *Ocimum basilicum*, conhecida popularmente como manjeriço um arbusto aromático, cultivado e comercializado no Brasil para fins culinários, possui diferentes componentes principais (quimiótipos): linalol, o estragol e o eugenol em suas partes, o que justifica o seu potencial farmacológico como larvicida, repelente, antifúngico e antimicrobiano. Assim, o objetivo desta pesquisa é analisar o efeito antinociceptivo agudo do óleo essencial de flores de *Ocimum basilicum* Linn (OEFOb) e efeito antimicrobiano do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina em zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa). O OEFOb foi obtido por hidrodestilação e analisado por GC-MS. O complexo de inclusão do estragol em β -ciclodextrina (ES/ β -CD) foi preparado através do método de co-evaporação e precipitação (3:1 β -ciclodextrina/estragol). Os animais (n=6/grupo) foram tratados oralmente (20 μ L) com diferentes concentrações de OEFOb (0,25 ou 1,25 ou 2,5 mg/mL; 20 μ L) ou veículo (NaCl a 0,9%; 20 μ L) e submetido à nocicepção por diferentes agentes (formalina, cinamaldeído, capsaicina, glutamato, solução salina ácida e solução salina hipertônica). Possíveis mecanismos de neuromodulação, além de alterações motoras e toxicidade, também foram avaliados. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro*, pelo método adaptado de infecção *in vivo* por *S. aureus* em ZFa, e pelo método adaptado de potencialização da ação antibiótica em ZFa. Como resultado, a análise do perfil químico identificou quatorze componentes presentes no óleo essencial, dentre eles: linalol (56,37%). O OEFOb não apresentou toxicidade aguda e não alterou o sistema locomotor de ZFa, reduzindo o comportamento nociceptivo em todos os modelos testados. Esses efeitos do OEFOb foram significativamente semelhantes aos da morfina, utilizados como controle positivo. O efeito antinociceptivo de OEFOb foi inibido pela naloxona, L-NAME, azul de metileno, cetamina, cânfora, vermelho de rutênio e amilorida. O efeito antinociceptivo da córnea do OEFOb foi inibido pela capsazepina. O ES/ β -CD apresentou complexação com bandas específicas do estragol (1511 cm^{-1} e 1238 cm^{-1}), bem como da β -CD (3359, 2926, 1153 e 1029 cm^{-1}). O estragol e o seu complexo ES/ β -CD ambos demonstraram valores de CIM de 1024 $\mu\text{g/mL}$, frente à cepa S.a. ATCC 25923 no ensaio *in vitro*. O modelo de infecção *in vivo* por *S. aureus* em ZFa foi estabelecido durante o período de 24 e 48 h após a infecção por inóculo bacteriano. O estragol (P1) e seu complexo ES/ β -CD (P2) não causaram mortalidade dos ZFa até 48 h de ensaio, reduzindo a infecção induzida por S.a. ATCC 25923. Na verificação do efeito sinérgico, o estragol e seu complexo ES/ β -CD mostraram-se significativos frente a cepa S.a. ATCC 25923, sendo que o complexo ES/ β -CD apresentou resultados mais relevantes quando associados a gentamicina. Os resultados demonstram que, o OEFOb tem potencial farmacológico no tratamento da dor aguda e esse efeito é modulado pelo sistema opioide, receptores NMDA e canais TRPs e ASICs, bem como no tratamento da dor corneal e esse efeito é modulado pelo canal TRPV1. Foi confirmado a formação do complexo de inclusão entre estragol e β -ciclodextrina, bem como foi possível estabelecer o modelo de infecção *in vivo* por *S. aureus* em zebrafish adulto, e a administração oral do estragol e seu complexo

ES/ β -CD inibiram a infecção induzida por *S. aureus* nos zebrafish's adultos, e na associação com a gentamicina, ambos se mostraram significativos frente a cepa de *S. aureus*, sendo o complexo ES/ β -CD mais relevante. No entanto, foram obtidos dados significativos em relação ao efeito farmacológico das amostras estudadas, usando o zebrafish adulto como modelo experimental.

Palavras-chave: *Ocimum basilicum*, antinocicepção, antimicrobiano, zebrafish (*Danio rerio*).

ABSTRACT

The species *Ocimum basilicum*, popularly known as basil an aromatic shrub, cultivated and marketed in Brazil for culinary purposes, has different main components (chemotypes): linalool, estragole and eugenol in its parts, which justifies its pharmacological potential as larvicide, repellent, antifungal and antimicrobial. Thus, the objective of this research is to analyze the acute antinociceptive effect of essential oil of the *Ocimum basilicum* Linn flowers (OEFOb) and the antimicrobial effect of estragole and the β -cyclodextrin complex in adult zebrafish (*Danio rerio*) (ZFa). OEFOb was obtained by hydrodistillation and analyzed by GC-MS. The inclusion complex of estragol in β -cyclodextrin (ES/ β -CD) was prepared using the co-evaporation and precipitation method (3:1 β -cyclodextrin/estragole). The animals (n=6/group) were treated orally (20 μ L) with different concentrations of OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 μ L) or vehicle (0.9% NaCl; 20 μ L) and submitted to nociception by different agents (formalin, cinnamaldehyde, capsaicin, glutamate, acid saline and hypertonic saline). Possible neuromodulation mechanisms, in addition to motor changes and toxicity, were also evaluated. The antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution method, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) *in vitro*, by the adapted method of infection *in vivo* by *S. aureus* in ZFa, and by the adapted method of potentiation of the antibiotic action in ZFa. As a result, the chemical profile analysis identified fourteen components present in the essential oil, among them: linalool (56.37%). OEFOb did not present acute toxicity and did not alter the locomotor system of ZFa, reducing the nociceptive behavior in all models tested. These effects of OEFOb were significantly similar to those of morphine, used as a positive control. The antinociceptive effect of OEFOb was inhibited by naloxone, L-NAME, methylene blue, ketamine, camphor, ruthenium red and amiloride. The antinociceptive effect of the OEFOb cornea was inhibited by capsazepine. The ES/ β -CD presented complexation with specific estragole bands (1511 cm^{-1} and 1238 cm^{-1}), as well as β -CD (3359, 2926, 1153 and 1029 cm^{-1}). Estragol and its ES/ β -CD complex both demonstrated MIC values of 1024 $\mu\text{g/mL}$, against the S.a. ATCC 25923 in the *in vitro* assay. The *in vivo* infection model for *S. aureus* in ZFa was established during the period of 24 and 48 h after infection by bacterial inoculum. Estragole (P1) and its ES/ β -CD (P2) complex did not cause mortality of the ZFa until 48 h of test, reducing the infection induced by S.a. ATCC 25923. In verifying the synergistic effect, estragole and its ES/ β -CD complex proved to be significant compared to strain S.a. ATCC 25923, with the ES/ β -CD complex showing more relevant results when associated with gentamicin. The results demonstrate that OEFOb has pharmacological potential in the treatment of acute pain and this effect is modulated by the opioid system, NMDA receptors and TRPs and ASICs channels, as well as in the treatment of corneal pain and this effect is modulated by the TRPV1 channel. The formation of the inclusion complex between estragol and β -cyclodextrin was confirmed, as well as it was possible to establish the model of infection *in vivo* by *S. aureus* in adult zebrafish, and the oral administration of estragole and its ES/ β -CD complex inhibited the infection induced by *S. aureus* in adult zebrafish, and in association with gentamicin, both were significant against

the strain of *S. aureus*, with the ES/ β -CD complex being the most relevant. However, significant data were obtained regarding the pharmacological effect of the studied samples, using adult zebrafish as an experimental model.

Keywords: *Ocimum basilicum*, antinociception, antimicrobial, zebrafish (*Danio rerio*).

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação está apresentada no formato de artigo científico, dividida em dois manuscritos. O primeiro manuscrito é intitulado “Efeito antinociceptivo do óleo essencial das flores de *Ocimum basilicum* Linn em zebrafish (*Danio rerio*) adulto”, que foi submetido na Revista Zebrafish (QUALIS A2). O segundo manuscrito é intitulado “Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina em zebrafish (*Danio rerio*) adulto”, a ser submetido à Revista Zebrafish (QUALIS A2).

No manuscrito 1, reporta-se o efeito antinociceptivo agudo do óleo essencial de flores de *O. basilicum* Linn (OEFOb) em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. O perfil químico do OEFOb foi investigado, por meio do método de CG-MS. A atividade antinociceptiva foi avaliada através dos testes da formalina, cinamaldeído, capsaicina, glutamato, solução salina ácida e solução salina hipertônica. Possíveis mecanismos de neuromodulação, além de alterações motoras e toxicidade, também foram avaliados. Em todos os modelos nociceptivos desse manuscrito, foram testadas as concentrações de 0,25 ou 1,25 ou 2,5 mg/mL. Os bioensaios foram realizados 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).

No manuscrito 2, reporta-se a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina em zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa). O estragol foi adquirido da Sigma Aldrich (Brasil), o complexo de inclusão do estragol em β -ciclodextrina foi preparado através do método de co-evaporação e precipitação (3:1 β -ciclodextrina/estragol), e analisados pela técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourie (FTIR). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro*, pelo método adaptado de infecção *in vivo* por *S. aureus* em ZFa, e pelo método adaptado de potencialização da ação antibiótica em ZFa. A pesquisa foi conduzida em estrita obediência com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos: animais (*Guide for the care and use of laboratory animals*, do NIH - National Institute of Health-EUA, 1996; Lei Federal Nº 11.794/2008; Conselho Nacional de Controle de Experimentação – CONCEA); e integridade da fauna e flora (Lei Federal Nº 9605/1998). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade Regional do Cariri – URCA (#00225/2018.2).

1 INTRODUÇÃO

Independente dos grandes avanços observados na medicina atual nas últimas décadas, as plantas medicinais ainda contribuem significativamente para a assistência à saúde (Correa, Soares e Muccillo-Baisch, 2018), e são fontes de produtos naturais servindo para a identificação de novas drogas (Atanasov et al., 2015). Os óleos essenciais de plantas medicinais são ricos em metabólitos secundários, que são responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas (Ribeiro-Santos, et al., 2017). Nessa perspectiva, os produtos naturais tornam-se uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial antinociceptivo e antimicrobianos.

A dor se torna um sinal significativo para determinar algumas doenças assim como indicar a gravidade destas mencionadas pelos pacientes (Treede et al., 2019). A dor é um dos mecanismos mais importantes, adaptativos e protetores do corpo, e geralmente é classificada como dor nociceptiva ou neuropática. O nociceptivo se origina em tecidos danificados fora do sistema nervoso, incluindo dor somática e visceral. A dor neuropática surge da atividade neural anormal e é classificada como dor simpaticamente medicada, periférica ou central (Ellison, 2017). Logo, pesquisas com produtos naturais de plantas medicinais são estratégias produtivas e lógicas no tratamento da dor (Saldanha et al., 2019). Pois, os tratamentos relacionados a dor aguda e crônica utilizando analgésicos, atualmente ainda geram severos efeitos colaterais e dependência.

Embora progressos significativos tenham sido feitos na pesquisa microbiológica e no controle de muitas doenças causadas por micro-organismos infecciosos, epidemias recorrentes devido a micro-organismos resistentes a drogas, bem como o aparecimento de novas cepas patogênicas microbianas, exigem a descoberta de novos antibióticos (Tagousop et al., 2018). Os processos infecciosos geram dor como consequência da inflamação ocasionada. Assim, os produtos naturais de plantas se tornaram alternativas interessantes, uma vez que muitos constituintes químicos são conhecidos por possuírem atividades antimicrobianas (Siebra et al., 2018) e potencial de ação nociceptiva.

O manjeriço (*Ocimum basilicum* Linn), cresce em várias regiões do mundo, sendo frequentemente usada como agente medicinal, a mesma é pertencente à família Lamiaceae, é uma planta anual ou perene, dependendo do local em que é cultivado (Piras et al., 2018). Os óleos essenciais extraídos das folhas e flores frescas podem ser usados como aditivos de aromas alimentares e em produtos farmacêuticos e cosméticos (Javanmardi et al., 2002; Silva

et al., 2016). Além disso, o manjeriço tem sido utilizado para o tratamento de várias doenças, como dores de cabeça, tosse, diarreia, constipação, verrugas, vermes e disfunções renais (Silva et al., 2016).

O zebrafish (*Danio rerio*) é pertencente à família Cyprinidae, um teleósteo tropical que vive geralmente nas águas doces do Sudeste da Ásia (Davis et al., 2014), e atualmente, é amplamente utilizados como organismos modelos em todo o mundo, servindo de plataforma viável para experimento animal (Hugo et al., 2020; Nakayama e Makinoshima, 2020).

Dessa forma, pesquisas vêm sendo desenvolvidas empregando-se o zebrafish (*Danio rerio*) como método substitutivo na busca por produtos naturais com diversas atividades biológicas (Ekambaram et al., 2017; Magalhães et al., 2018; Batista et al., 2018), isso é devido pelo o mesmo apresentar homologia genética humana em torno de 70%, baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo de reprodução curto, alta fecundidade e embriões transparentes (Ghenou et al., 2016).

Diante do exposto, esse estudo objetivou investigar o potencial antinociceptivo do óleo essencial das flores de *Ocimum Basilicum* Linn e efeito antimicrobiano do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina utilizando o zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Ocimum Basilicum* Linn (Manjeriço, Lamiaceae)

O gênero *Ocimum* pertence à família Lamiaceae, possuindo cerca de 150 espécies de *Ocimum*, sendo utilizadas no tratamento de diferentes tipos de doenças desde os tempos antigos, principalmente a espécie *Ocimum basilicum* Linn (Figura 1). É conhecido como manjeriço, uma planta herbácea e perene cultivada universalmente (Bantis, Ouzounis, & Radoglou, 2016; Purushothaman et al., 2018), sendo popularmente usada na culinária italiana e do sudeste da Tailândia e do Vietnã (Snoussi et al., 2016).

Figura 1 - *Ocimum basilicum* Linn (Manjeriçã, Lamiaceae).



FONTE: Rodrigues, L.B. (2016).

Ocimum basilicum Linn possui inúmeras atividades potentes devido aos metabólitos presentes nele (Purushothaman et al., 2018). Pesquisas mostraram que os óleos essenciais de *O. basilicum* Linn são utilizados como sabores para os produtos alimentícios, na culinária e como planta ornamental. Também tem sido utilizado como fragrâncias comerciais, sabores e para melhorar a vida útil dos alimentos (Nguyen e Niemeyer, 2008; Purushothaman et al., 2018).

O. basilicum Linn contém majoritariamente cerca de 20 compostos como linalol, estragol, metil eugenol, 1, 8-cineol, entre outros, que foi identificado pelo GC-MS (Radulović, Blagojević e Miltojević, 2013). Cânfora, limoneno, timol, citral, α -linalol, β -linalol e estragol, são monoterpenos já identificados nessa planta como compostos ativos (Purushothaman et al., 2018).

Os óleos essenciais obtidos de *O. basilicum* Linn possuem uma fonte rica de compostos aromatizantes, bem como também possuem uma variedade de compostos com potencial antimicrobiano (Okazaki et al., 1998). O óleo essencial das raízes de *O. basilicum* já foi descrito por possuir atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (Bais et al., 2002; Purushothaman et al., 2018). Dois quimiotipos isolados do óleo essencial das flores de manjeriçã (*O. basilicum*), estragol e linalol, também já foram relatados por seu efeito antifúngico significativo em estudos *in vitro* (Oxenham, Svoboda e Walters, 2005).

O potencial terapêutico de *Ocimum basilicum* Linn foi confirmado quando o óleo essencial das folhas e seu composto principal estragol, foram eficazes na atividade anti-inflamatória (Rodrigues et al., 2016), assim como também quando esse mesmo óleo essencial

foi conjugado com a β -ciclodextrina (Rodrigues et al., 2017) aumentando mais ainda sua eficácia.

2.2 Atividade antinociceptiva

A dor é mais que uma sensação, é uma experiência, podendo incorporar componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. Inicialmente é um mecanismo de defesa do organismo contra estímulos nocivos (Lamont, Tranquilli e Grimm, 2000), podendo persistir por fatores genéticos e/ou ambientais, ou até aumentando e/ou diminuindo a atividade dos nociceptores, devido a modificações no Sistema Nervoso Central (SNC), causando prejuízos aos tecidos lesados (Marchand, 2008). Assim, a transmissão dos estímulos dolorosos se dá a partir da transformação dos estímulos ambientais nocivos, em potenciais de ação levados até o SNC no processo de dor.

De forma mais clara, o processo de dor compreende quatro fases, sendo a primeira fase a Transdução, que ocorre a partir de um estímulo, ativando os nociceptores locais induzindo potenciais de ação. Na segunda fase que é a Transmissão, esses potenciais de ação são transmitidos por meio de fibras nervosas presentes no local da transdução, passando pelo gânglio da raiz dorsal. Na terceira fase a Percepção, esses sinais (potenciais de ação) chegam a determinadas áreas do córtex cerebral, resultando na sensação dolorosa. E por fim a quarta fase a Modulação, modula esses sinais em todo corpo dorsal da medula espinhal para que chegue a níveis superiores do SNC (Zhu e Lu, 2010).

Além disso, a dor se classifica em fisiológica, nociceptiva ou inflamatória e neurogênica. A dor fisiológica é definida como um sinal de alerta, em que uma sensação desagradável não traumática é percebida, e se inicia um reflexo que evite ou reduza esse dano, sendo essa de duração rápida (Świeboda et al., 2013). A dor nociceptiva ou inflamatória é a percepção de estímulos nocivos, sendo proporcional a amplitude da lesão tecidual e liberação dos mediadores inflamatórios. A dor neurogênica é causada devido a uma lesão ou disfunção nos nervos periféricos e centrais (Schaible, Schmelz e Tegeder, 2006; Klaumann, Wouk e Sillas, 2008).

Termos como dor e analgesia são empregados para estudos em humanos, enquanto que nocicepção e antinocicepção são mais utilizados para estudos pré-clínicos, envolvendo animais de laboratório. Logo, o termo nocicepção refere-se ao estímulo doloroso propriamente dito, sem levar em consideração o componente emocional, ou seja, engloba as

vias neuroanatômicas, bem como os mecanismos neurológicos e os nociceptores específicos que detectam o estímulo lesivo (De Souza, 2016).

Os nociceptores podem exercer funções eferentes no tecido pela liberação de neuropeptídeos (substância P, peptídeos relacionados ao gene calcitonina) de suas terminações sensoriais (Da Fonsêca, 2016). Durante a inflamação, o limiar de ação dos nociceptores diminui e estímulos normalmente inócuos podem ativá-los. Assim, o potencial antinociceptivo de um produto natural, por exemplo, pode ser medido pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação dessas terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo doloroso promovido (Silva et al., 2013).

Os nociceptores são classificados de acordo com a velocidade de condução do estímulo doloroso, e se são ou não mielinizadas, em: fibras A δ (A-Delta) e fibras C. As fibras A δ , são mielinizadas e responsáveis pela modulação da dor aguda; as fibras C, não são mielinizadas e responsáveis pela dor difusa (Rosenquist et al., 2017). Os nociceptores correspondentes às fibras A δ , respondem a estímulos mecânicos e térmicos, enquanto aqueles correspondentes às fibras C, respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, sendo assim chamados de polimodais (Dubin e Patapoutian, 2010).

Numerosos tipos de receptores são ativados na sensação de dor que varia em sua via de sinalização. Essas vias de sinalização podem ser consideradas um local de modulação da dor. Logo, canais iônicos receptores de potencial transitório (TRPV1, TRPV2 e TRPM8), canais iônicos piezoelétricos do tipo 2, canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs), canais catiônicos purinérgicos (P2X e P2Y), canais receptores de bradicinina (B1 e B2), canais receptores de α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA), canais receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu), receptores para neurocinina 1 (NK1) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) são receptores que podem modular a dor quando ativados (Khan, Khan e Kim, 2019).

Vários mediadores inflamatórios atuam ativando os receptores para a modulação da dor. Diante disso, substâncias definidas como algio gênicas são responsáveis por ativar os nociceptores, essas substâncias incluem: bradicinina, serotonina, prostaglandinas, óxido nítrico, acetilcolina, IL-1, substância P e glutamato (Fernandes e Gomes, 2011; Rocha et al., 2007). Também, há as substâncias inibitórias que atuam bloqueando os receptores, como: GABA (Ácido gama-aminobutírico), serotonina, beta-endorfinas, somatostatina, acetilcolina e glicina (Alves et al., 2017).

Os modelos animais utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva de um extrato ou substância isolada envolvem diversas respostas nociceptivas geradas por estímulos químicos ou térmicos (Silva et al., 2013). Na maioria das vezes, mesmo não se chegando ao mecanismo de ação definitivo do extrato, óleo essencial ou substância isolada da planta em estudo, esses modelos experimentais são de grande importância e representam o ponto de partida para a caracterização farmacológica de novos compostos capazes de interferir com o curso da dor (Souza et al., 2015).

No entanto, existe vários modelos utilizados para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais, sendo o mais utilizado o teste da formalina. O teste da formalina é um método de avaliação comportamental em que a dor está associada à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea ou intramuscular de formalina diluída numa região específica do corpo do animal. A vantagem deste teste sobre outros métodos de nociceção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação (Souza et al., 2015).

2.3 Atividade antimicrobiana

A disseminação do uso de antibióticos ocasionaram uma seletividade nos mecanismos de resistência das bactérias, contribuindo com fatores evolutivos (Okeke et al., 2005; Coutinho et al., 2018). Logo, com o uso disseminado e, por vezes, irracional e abusivo desses fármacos (Mantzourani et al., 2015), o fenômeno da seleção e disseminação de micro-organismos multirresistentes aos antibióticos e quimioterápicos com atividade antimicrobiana vem limitando significativamente a eficiência desses agentes, além de provocar milhares de óbitos, em função de “superinfecções e infecções refratárias”, ao redor do globo, representando, portanto, um grande problema de saúde pública (Wright, 2003; Jindal, Pandya e Khan, 2015).

Em termos de saúde pública, a resistência bacteriana representa um risco à qualidade de vida humana conquistada ao longo dos anos com o avanço da microbiologia, das engenharias, da farmácia e da medicina, comprometendo o orçamento dos sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados (Da Costa e Silva Junior, 2017). Embora progressos significativos tenham sido feitos na pesquisa microbiológica e no controle de muitas doenças causadas por micro-organismos infecciosos, epidemias recorrentes devido a microrganismos

resistentes a drogas, bem como o aparecimento de novas cepas patogênicas microbianas, exigem a descoberta de novos antibióticos (Tagousop et al., 2018).

Numerosas plantas terapêuticas possuem agentes antimicrobianos próprios e ganharam popularidade nos últimos anos. A literatura mostra milhares de espécies de plantas que foram testadas *in vitro* contra muitas cepas de fungos e bactérias, e um bom número de extratos de plantas medicinais e compostos puros tem se mostrado ativo contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Mahady et al., 2008; Tatsimo et al., 2015; Pagning et al., 2016; Tebou et al., 2017). No entanto, isso tem despertado mais ainda a comunidade científica, a necessidade de buscar novos fármacos para o tratamento de infecções ocasionadas por microorganismos, sendo estes mais eficazes e apresentarem menos efeitos adversos.

2.4 Zebrafish (*Danio rerio*)

Nos últimos anos, o zebrafish (*Danio rerio*) tem ganhado destaque mundial como um organismo modelo em ensaios bioguiados de produtos naturais para descoberta de novas drogas (Crawford et al., 2011). O zebrafish (ZF) é o modelo animal considerado mais promissor, pois tem similaridade genética humana em torno de 70-80%, além de ter baixo custo, fácil manuseio e manutenção em comparação com outros modelos (Gebauer et al., 2011; McCormick e Law, 2016).

Os modelos de testes de drogas usando o zebrafish ganharam popularidade como ponto de partida para o teste de terapias potenciais. Os modelos zebrafish podem fornecer informações sobre a especificidade alvo dos compostos que estão sendo testados juntamente com potenciais efeitos fora do alvo que podem ser prejudiciais ou levar à toxicidade (Kanungo et al., 2014). Além disso, existe um grande número de modelos de doenças que foram desenvolvidos usando zebrafish que pode ser usado para testar a eficácia de terapias potenciais (Santoriello e Zon, 2012; MacRae e Peterson, 2015). Ele também tem sido utilizado para biotecnologia, em modelo de dor e nocicepção (Correia et al., 2011; Malafoglia et al., 2014), bem como estudos de infecções bacterianas (Prajsnar et al., 2012).

2.4.1 Nocicepção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto

O zebrafish (*Danio rerio*) é o vertebrado não mamífero mais frequentemente utilizado para modelar muitas doenças humanas e vários estudos apontam para o seu potencial como modelo de dor e nocicepção (Correia et al., 2011; Malafoglia et al., 2014). A fisiologia

nociceptiva do zebrafish (*Danio rerio*) está bem estabelecida (Taylor et al., 2017).

Com respeito à dor, agora é amplamente aceito que os peixes podem detectar estímulos dolorosos (nocicepção) e ter redes neurais somatossensoriais semelhantes aos vertebrados superiores (Malafoglia et al., 2013). Os modelos comportamentais de nocicepção Zebrafish foram desenvolvidos usando adultos e larvas (Correia et al., 2011; Malafoglia et al., 2013; Lopez-Luna et al., 2017). O zebrafish adulto foi testado como modelo comportamental de nocicepção induzida por ácido acético devido a muitas semelhanças entre o sistema nervoso (incluindo o sistema opióide) e a dos mamíferos e outros vertebrados (Correia et al., 2011; Taylor et al., 2017).

Com o objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo em modelos de dor orofacial em zebrafish adultos, Soares et al. (2019) testaram a capacidade do ácido oleanólico em inibir a nocicepção aguda induzida por formalina, capsaicina, cinamaldeído, mentol, solução salina ou glutamato acidificada (modos cutâneos) e solução salina hipertônica (modelo da córnea). E logo confirmaram que o pré-tratamento com ácido oleanólico reduziu significativamente o comportamento nociceptivo associado a dor aguda., sugerindo que o zebrafish adulto é um ótimo modelo experimental em testes envolvendo a dor orofacial.

Em seus estudos, Batista et al. (2018) utilizou o zebrafish adulto para avaliar a capacidade do extrato etanólico de frutos de *A. indica* (Neem) em atenuação da dor aguda como modelo alternativo ao uso em roedores, avaliando também os possíveis mecanismos de neuromodulação. Foi confirmado o potencial farmacológico dos frutos de *Azadirachta indica* (Neem) para o tratamento da dor aguda, e esse efeito foi modulado pelo sistema opioide, pelos receptores NMDA e pelos canais ASICs, usando o zebrafish adult como modelo experimental.

Magalhães et al. (2017) em seus estudos, testaram os adultos de zebrafish (*Danio rerio*) como modelo comportamental alternativo de nocicepção induzida por formalina. O modelo comportamental foi validado testando o efeito antinociceptivo da morfina e indometacina (medicamentos analgésicos padrão utilizados no teste de formalina de roedores), confirmando que os indivíduos adultos de zebrafish como modelo comportamental é uma alternativa viável para modelos de laboratório mais convencionais utilizados na pesquisa de novos compostos com potencial antinociceptivo.

2.4.2 Infecção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto

O zebrafish nos estágios embrionário e larval é um excelente modelo para exames histológicos de biópsias em processos de infecção associados a biomateriais, pois é

translúcido e as células imunológicas fluorescentes e as bactérias podem ser microscopicamente visualizadas em tempo real. Além disso, os embriões podem ser obtidos em grande número (Lieschke et al., 2006; Brittijn et al., 2009; Carvalho et al., 2011; Cui et al., 2011; Ellett et al., 2011). As respostas de muitos patógenos diferentes, como *Escherichia coli*, *Mycobacterium marinum*, *Salmonella typhimurium*, *Edwardsiella tarda*, *Burkholderia cenocepacia* e *Staphylococcus aureus*, já foram avaliadas em zebrafish (Davis et al., 2002; Van Der Sar et al., 2003; Prajsnar et al., 2008; Vergunst et al., 2010; Meijer & Spaink, 2011; Van Soest et al., 2011).

Em sua pesquisa, Neely, Pfeifer e Caparon (2002) estabeleceram o primeiro modelo de infecção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto, utilizando os patógenos *Streptococcus iniae* e *Streptococcus pyogenes* para infecção. Esses organismos receberam a injeção no músculo dorsal, desenvolvendo uma infecção letal, com uma dose letal de 50% de 10^3 UFC, e morreram dentro de 2 a 3 dias. A infecção foi comprovada por um necrose bem estabelecida no musculo dorsal do indivíduo adulto assim como também foi feita a análise histopatológica dos órgãos dessecados, confirmando o uso do zebrafish adulto como um modelo de infecção *in vivo* viável para experimentação animal.

Usando um modelo estabelecido de infecção em embriões de zebrafish, (Prajsnar et al., 2012) mostraram que uma infecção avassaladora é devida à subversão de fagócitos por *Staphylococcus*, permitindo que as bactérias evitem matar e encontrar focos de doença. Os embriões de zebrafish foram co-infectadas com duas cepas de *S. aureus* portadoras de diferentes fusões gênicas, os quais apresentaram lesões bacterianas.

Kannan et al. (2014) em seus estudos, demonstraram a produção de *S. aureus* resistente à meticilina de *Streptomyces rubrolavendulae* ICN3, avaliando o composto anti-MRSA em embriões de zebrafish, que atuou de forma antagonista potente contra MRSA de *Streptomyces rubrolavendulae* ICN3, sugerindo que o composto foi potente com menos efeitos tóxicos no sistema de modelo embrionário de zebrafish para infecção por MRSA.

Com o surgimento do biofilme, Lotha et al. (2018) utilizaram nanopartículas de prata com extrato de *Capsicum annuum* (pimentão) na tentativa de produzir um efeito anti-biofilme, e demonstraram que o mesmo exerceu efeito anti-biofilme potente sobre o patógeno *S. aureus* e reduzindo o crescimento planctônico em um modelo de infecção em zebrafish adulto.

2.5 Uso de produtos naturais em sistema de liberação em ciclodextrina (CD)

As ciclodextrinas são consideradas novos excipientes farmacêuticos, veículos de administração de medicamentos e agentes antiagregantes (Kurkov e Loftsson, 2013; Chilajwar et al., 2014; Morin-Crini et al., 2015). As CD's e os complexos de ciclodextrina se automontam formando nanopartículas, que sob certas condições, essas nanopartículas podem se automontam formando micropartículas, tornando-se uma tendência que aumenta com a formação de complexos de inclusão com drogas lipofílicas (Crini, Fourmentinn e Lichtfouse, 2018). Assim, tais propriedades mudaram a maneira como realizamos pesquisas farmacêuticas sobre ciclodextrina e deram origem a novas oportunidades de formulação de ciclodextrina (Bilensoy, 2011; Kurkov e Loftsson, 2013). Os sistemas de liberação baseados em ciclodextrinas (nanopartículas) podem melhorar a biodisponibilidade, reduzir a imunogenicidade, modificar o metabolismo dos medicamentos, reduzir a toxicidade e aumentar a meia-vida biológica dos medicamentos após a administração sistêmica (Concheiro e Alvarez-Lorenzo, 2013; Simoes et al., 2014; Morin-Crini et al., 2015; Sharma e Baldi, 2016).

O campo da medicina usando ciclodextrinas e seus derivados é vasto, incluindo a nanomedicina (nanopartículas para administração de medicamentos). Na verdade, as ciclodextrinas também são percebidas como moléculas dos sonhos para o desenvolvimento de aplicações em nanomedicina, incluindo nanovetorização, como, por exemplo, nanopartículas para administração de medicamentos (Chilajwar et al., 2014).

Conforme relatado por Pinho et al. (2014), as ciclodextrinas possuem poderosas habilidades de complexação e biocompatibilidades, que melhoram as propriedades farmacológicas dos produtos naturais nos sistemas de administração de medicamentos quando utilizadas. Assim o uso das ciclodextrinas é promissor, tendo em vista o notável sucesso clínico.

As cavidades hidrofóbicas das ciclodextrinas podem encapsular moléculas orgânicas e inorgânicas com menor tamanho molecular para formar vários compostos de inclusão nas formas líquida ou sólida (Wang, Yuan e Yue, 2015; Yang et al., 2016). Entre as CD's naturais, a β -ciclodextrina é a mais usada principalmente por causa de seu tamanho de cavidade adequado para hóspedes comuns com peso molecular de 200-800 g/mol, assim como também é barata e prontamente disponível (Waleczek et al., 2003).

A β -ciclodextrina é um material útil para a inclusão de óleos essenciais, devido à sua baixa toxicidade e alta biocompatibilidade, solubilidade e biodisponibilidade de compostos

pouco solúveis na administração oral de medicamentos (Hadian et al., 2018). Logo, pesquisadores confirmaram o uso de CD's para proteção e estabilização de diferentes óleos essenciais contra calor, oxigênio e evaporação (Menezes et al., 2012; Yamamoto et al., 2012).

Em seu estudo, Kfoury et al. (2015) realizaram a complexação do estragol como composto puro e como componente principal de óleos essenciais de manjerição utilizando vários tipos de ciclodextrinas (nanocápsulas), determinando que a formação de complexos de inclusão permite a liberação controlada de compostos isolados, sugerindo que o encapsulamento com ciclodextrinas pode ser uma ferramenta eficiente para melhorar o uso de óleos essenciais e compostos isolados no campo da aromaterapia, cosméticos e alimentos.

Colusso (2016) produziu nanocápsulas contendo trans-anetol (NCTA), e com essa formulação obtiveram uma excelente taxa de associação, indicando maior proteção do ativo, reduzindo os possíveis danos celulares. Por outro lado, Martellet (2017) também produziu um novo modelo de nanocápsulas Resveratrol utilizando o Eudragit S100® como biopolímero e o óleo essencial da planta *Piper dilatatum* Rich, como núcleo lipídico, demonstrando que as nanocápsulas de Resveratrol apresentaram características morfológicas em tamanho e homogeneidade para uma nanopartícula, afirmando que as nanocápsulas de Resveratrol com núcleo lipídico o óleo de *Piper dilatatum* Rich, além de ser uma alternativa inovadora, por se tratar de nanocarreadores poliméricos, torna-se um sistema promissor para a terapêutica na via de administração oral, preservando a integridade física dos compostos em estudo.

Combinando o acetato de celulose com três óleos essenciais selecionados para criar nanocápsulas esféricas, Liakos et al. (2018) usaram a técnica de solvente/antissolvente e obtiveram nanossistemas bioativos, demonstrando que as nanocápsulas esféricas podem ser usadas em uma variedade de aplicações, incluindo receptores médicos, farmacêuticos e no uso de produtos domésticos para tratamento ou prevenção de colonização microbiana e desenvolvimento de biofilme.

Hadian et al. (2018) em seus estudos, formularam nanopartículas de β -ciclodextrina (β -CD) carregadas com óleo essencial de produtos naturais com propriedades físico-químicas adequadas, e confirmaram que o complexo de inclusão com óleos essenciais com β -ciclodextrina é considerado como material bioativo promissor para o planejamento de alimentos funcionais.

2.6 Óleos essenciais e seus componentes

Os óleos essenciais são compostos voláteis, extraído de plantas aromáticas

apresentando um forte odor e são ricos em metabólitos secundários, que são responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas pelos mesmos (Bakkali et al., 2008; Ribeiro-Santos et al., 2017). Suas atividades biológicas incluem atividade bactericida, viricidas e fungicidas, bem como propriedades medicinais (Asbahani et al., 2015).

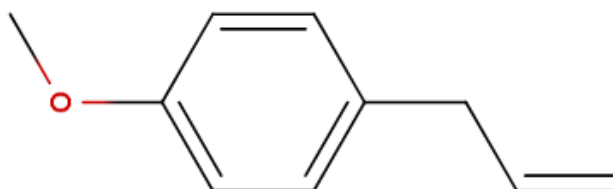
A produção do óleo essencial se dá por meio de diferentes partes da planta, como folhas, flores, raízes e sementes (Teixeira et al., 2013). A extração dos óleos essenciais pode ser realizada por diferentes técnicas, que podem ser: hidrodestilação, arraste por vapor de água, extração de solventes orgânicos e prensagem a frio (Asbahani et al., 2015).

Os óleos essenciais podem apresentar uma gama de compostos químicos, incluindo monoterpenos e sesquiterpenos que incluem: álcoois, éteres, carboidratos e cetonas (Dhifi et al., 2016; Khosravi et al., 2018). No entanto, a composição química dos óleos essenciais pode sofrer variações, dependendo de um conjunto de fatores, como por exemplo: a localização geográfica, estado de desenvolvimento em que a planta se encontra, horário de coleta e a parte da planta coletada (Ribeiro-Santos et al., 2017).

2.6.1 Estragol (4-Allylanisole)

O Estragol (Figura 2) é um monoterpeno amplamente utilizado na indústria de alimentos e bebidas como aromatizante e também nos perfumes, sabões e detergentes. É um constituinte químico importante dos óleos essenciais de muitas plantas aromáticas, tais como *Croton zehntneri* Pax e Hoffm., *Artemisia dracunculus* (Asteraceae), *Ocimum basilicum* (Lamiaceae), *Pimpinella anisum* (Apiaceae), *Illicium anisatum* (Illiciaceae) e *Foeniculum vulgare* (Apiaceae) (De Vincenzi et al., 2000; Da Costa et al., 2008; Silva-Comar et al., 2014).

Figura 2 - Estrutura química do estragol (4-Allylanisole).



Ensaios experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o Estragol tem muitos efeitos biológicos, incluindo atividades antioxidantes (De Moraes et al., 2006) e

antimicrobianas contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella entérica* (Friedman, Henika e Mandrell, 2002).

Suas atividades farmacológicas são relatadas como ansiolíticas (Cosentino, Norte e Lazarini, 2004), para induzir a contração do músculo esquelético (Albuquerque, Sorenson e Leal-Cardoso, 1995) e para relaxar o ileal e outros músculos lisos vasculares (Coelho-de-Souza et al., 1997; Soares et al., 2007). Além dessas atividades, o estragol demonstrou ter uma atividade anti-inflamatória, que é farmacologicamente potente e é eficaz em doses orais menores do que aquelas consideradas tóxicas (Ponte et al., 2012).

O Estragol é um fenilpropanóide, e algumas substâncias dessa classe são anestésicos locais, pois bloqueiam a excitabilidade predominantemente através de efeitos inibitórios diretos na ativação da condutância do canal de Na⁺ (Joca et al., 2012). Ele também bloqueia a excitabilidade do nervo ciático de ratos (Leal-Cardoso et al., 2004). Sabe-se ainda que o estragol é genotóxico e carcinogênico em roedores em doses altas (4,4 e 5,2 mumoles) (Ning et al., 2017).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

3.1 Manuscrito 1 - Efeito antinociceptivo do óleo essencial das flores de *Ocimum basilicum* Linn em zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Zebrafish

Zebrafish

Journal Name: <http://mc.manuscriptcentral.com/zebrafish>

Antinociceptive effect of the essential oil of *Ocimum basilicum* Linn flowers on adult zebrafish (*Danio rerio*)

Journal:	<i>Zebrafish</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Menezes, Irwin; Regional University of Cariri, Chemical Biology Batista, Francisco Lucas; Universidade Estadual do Ceara, Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia de Araújo, José Ismael; Universidade Estadual do Ceara de Araújo, Sandra Maria; Universidade Estadual do Ceara, Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia de Sousa, Daniela ; Universidade Estadual do Ceara, Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia Sobrinho, Francisco; Universidade Estadual do Ceara, Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia Bezerra, Franciglauber; Universidade Estadual do Ceara, Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia Silva, Maria Gabriely; Regional University of Cariri, Chemical Biology de Oliveira, Maria Rayane; Regional University of Cariri, Chemical Biology da Costa, Roger Henrique; Regional University of Cariri, Chemical Biology Rodrigues, Lindaiane; Regional University of Cariri, Chemical Biology Magalhães, Francisco Ernani; Universidade de Fortaleza, Experimental Biology Centre; Universidade Estadual do Ceara, Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia
Keyword:	Toxicology, Disease Model, Zebrafish
Manuscript Keywords (Search Terms):	essential oil of <i>Ocimum basilicum</i> flowers, antinociception, adult zebrafish (<i>Danio rerio</i>), Mechanism of action

SCHOLARONE™
Manuscripts

Antinociceptive effect of the essential oil of *Ocimum basilicum* Linn flowers on adult zebrafish (*Danio rerio*)

Francisco Lucas A. Batista^{1,2}, José Ismael F. de Araújo², Sandra Maria B. de Araújo², Daniela Braga de Sousa², Francisco Bastos C. Sobrinho², Franciglauber Silva Bezerra², Maria Gabriely de Lima Silva¹, Maria Rayane C. de Oliveira¹, Roger Henrique S. da Costa¹, Lindaiane Bezerra Rodrigues¹, Francisco Ernani A. Magalhães², Irwin Rose Alencar de Menezes^{1*};

¹Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry (LFQM), Regional University of Cariri, Department of Biological Chemistry, Crato, Ceará, Brazil.

²Laboratory of Bioprospecting of Natural Products and Biotechnology (LBPNB), State University of Ceará, Department of Chemistry, Campus CECITEC, Tauá, Ceará, Brazil.

*Address correspondence to:
Irwin Rose Alencar de Menezes, PhD
Regional University of Cariri,
Department of Biological Chemistry,
CEP 63100000, Crato,
Ceará, Brasil.

E-mail: irwinalencar@yahoo.com.br

Abstract

The species *Ocimum basilicum*, popularly known as basil and fragrant basil, is an aromatic shrub, grown and marketed in Brazil for culinary purposes, having a pharmacological potential as a larvicide, repellent, antifungal and antimicrobial agent. This research is the first to analyze the acute antinociceptive effect of the essential oil of *O. basilicum* Linn (OEFOb) flowers on adult zebrafish (*Danio rerio*). The essential oil of the *Ocimum basilicum* flowers was obtained by hydrodistillation and analyzed by GC-MS. The animals (n = 6/group) were treated orally (20 µL) with OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg / mL; 20 µL) or vehicle (0.9% NaCl; 20 µL) and submitted to nociception (formalin, cinnamaldehyde, capsaicin, glutamate, acid saline and hypertonic saline). Possible neuromodulation mechanisms, in addition to motor changes and toxicity, were also evaluated. The analysis of the chemical profile identified fourteen components present in the essential oil, with linalool being the main chemical constituent (56.37%). The oral administration of OEFOb did not show any acute toxicity, did not alter the aZF locomotor system but reduced the nociceptive behavior in all tested models. These effects of the OEFOb were significantly like those of morphine, used as a positive control. The antinociceptive effect of the OEFOb was inhibited by naloxone, L-NAME, methylene blue, ketamine, camphor, ruthenium red, and amiloride. The antinociceptive effect of the OEFOb on the cornea of aZF was inhibited by capsazepine. The OEFOb has a pharmacological potential for the treatment of acute pain, and this effect is modulated by the opioid system, NMDA receptors, and the TRP and ASIC channels. The OEFOb also has pharmacological potential for the treatment of corneal pain, and the TRPV1 pathway modulates this effect. These results lead us to studies aiming to isolate and characterize the bioactive principles of the OEFOb, using adult zebrafish as an experimental model.

Keywords: essential oil of *Ocimum basilicum* flowers, antinociception, adult zebrafish (*Danio rerio*)

1 Introduction

2
3 Pain is ubiquitous in medical diagnoses, mental and socioeconomic disorders, representing a common underlying
4 factor in patients with a high frequency of visits to the emergency public health departments¹. Thereby, pain becomes a
5 significant sign to determine some diseases, as well as to indicate their severity, as mentioned by patients.²

6 It is estimated that between 2% and 40% of the adult population suffer from some type of pain worldwide. Chronic pain
7 has a significant economic impact worldwide³, because when dealing with such problems, one can perceive an increase in
8 medical prescriptions of analgesic drugs (opioids), which have several side effects, such as sedation, constipation, and
9 hyperalgesia.^{4,5}

10 Nociception is the term used to describe how pain becomes a conscious experience. Thus, nociceptors are a highly
11 specialized subset of primary sensory neurons that respond only to pain stimuli and convert them into nerve impulses,
12 which the brain interprets to produce the sensation of pain.⁶ Thus, in the search for new effective analgesic drugs for pain
13 control, research with essential oils from medicinal plants constitute productive and logical strategies.^{7,8}

14 The zebrafish (*Danio rerio*) has orthologs for 86% of 1,318 human drug targets, 71% of human proteins, and 82% of
15 disease-causing human proteins.^{9,10} Therefore, applying the ethical principle of the 3Rs (reduction, refinement of
16 procedures, and replacement), researchers employ zebrafish (*Danio rerio*) as a substitute animal method to the use of
17 mammals.¹⁰ That is due to its low maintenance characteristic, considering that breeding costs associated with zebrafish are
18 much lower than those in mammals, making it a popular platform for the screening of bioactive molecules.^{10,11} Following
19 this principle, Magalhães et al. (2017), Taylor et al. (2017), Batista et al. (2018), do Nascimento et al. (2018), Soares et al.
20 (2019), and Lima et al. (2020) used zebrafish in nociception tests, as well as in corneal nociception tests.¹⁸

21 *Ocimum basilicum* Linn, also known as basil, is an aromatic herb used extensively for its distinctive aroma and taste in
22 food preparations.¹⁹ The essential oils extracted from basil fresh leaves and flowers can be used as food aroma additives
23 and in pharmaceutical and cosmetic products.^{19,20} In addition to their potential use in culinary, basil essential oils are used
24 as a larvicide,²¹ repellents,^{22,23} antifungal,^{24,25} and antimicrobial agents²⁶. Rodrigues et al. (2016) demonstrated the
25 efficacy of the essential oil of *Ocimum basilicum* Linn leaves and their main chemical constituent, estragole, as an anti-
26 inflammatory agent in rodents, as well as that same essential oil complexed with β -cyclodextrin,²⁸ confirming the
27 therapeutic potential of this plant.

28 Based on the above, we investigated the antinociceptive effect of the essential oil of the *Ocimum basilicum* Linn
29 flowers (OEFOB) and possible mechanisms of action in adult zebrafish (*Danio rerio*).

30 Materials and methods

31 *Drugs and reagents*

32
33 The following drugs and reagents were used in this study: Formaldehyde (Dynamic), sodium chloride (NaCl; Synth),
34 saline solution (0.9%; Arboretum), naloxone (Tocris Bioscience), and ketamine (Syntec). Amiloride, capsaicin, camphor,
35 cinnamaldehyde, glutamate, L-NAME, morphine, and ruthenium red were obtained from Sigma Aldrich (Brazil).

36 *Extraction of essential oil*

37
38 The flowers of *Ocimum basilicum* Linn were collected following the methodology proposed by Cartaxo et al. (2010), in
39 the garden of medicinal plants of the Regional University of Cariri-CE (039°24'52.8" W; 07°14'20.2" S). An exsiccate
40 from the plant sample was deposited at the Herbário Carirense Dárdano de Andrade Lima - HCDAL of the Regional
41 University of Cariri - URCA, under registration number 10736. The plant was identified and classified by Prof. Dr. Maria
42 Arlene Pessoa da Silva. The collected (fresh) flowers (2.860 g) were washed in running water and submitted to steam
43 distillation in a Clevenger type device. The final oil product was dried using anhydrous sodium sulfate, stored as 1 mL
44 fractions in an amber flasks, and kept in the refrigerator for further analysis.

45 *Chemical analysis of the essential oil of Ocimum basilicum Linn flowers*

46
47 The oil analysis was performed with the Shimadzu GC/MS QP2010 series equipment (GC/MS system), capillary
48 column RTX - 5MS (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 mm), helium as a carrier gas: 1.5 mL/min, gun temperature 250
49 °C; detector temperature 290 °C, column temperature 60 °C - 180 °C at 5 °C / min, followed by 180 ° - 280 °C at 10
50 °C/min (10 min). Scan speed was 0.5 scan/s of m/z 40 and 350, split rate (1:200). The injected volume was 1 mL of [25
51 μ L (essential oil)/5 μ L of CHCl₃] (1:200), with solvent cutting time = 2.5 min. The mass spectrometer was operated with
52 70 eV ionization energy.³⁰ The identification of individual components was based on their mass spectral fragmentation
53 based on the NIST Mass 08 spectral library, retention indices, and comparison with published data.

54 *Zebrafish*

55
56 All experimental procedures were previously approved by the Animal Use Ethics Committee of the State University of
57 Ceará (CEUA-UECE; # 7210149/2016). The adult zebrafish (*Danio rerio*) (aZF) were obtained from a commercial
58 supplier in the city of Fortaleza (Ceará, Brazil), Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinário LTDA. The animals
59 were kept in groups of 50 animals and acclimated for 24 h in glass aquariums (30 x 15 x 20 cm), containing de-chlorinated
60

1 water (ProtecPlus® and air pumps with submerged filters, at 25 °C and pH 7.0, with a 14:10 h of light/dark cycle. The aZF
2 were of the short-fin phenotype, wild, both males and females aged 60 to 90 days, measuring 3.5 ± 0.5 cm and weight 0.4
3 ± 0.1 g. The fish was fed a commercial diet *ad libitum* 24 h before the experiments. Right after the tests, the aZF were
4 sacrificed by immersion in ice water (2 - 4 °C), for 10 minutes, until the loss of opercular movements was observed.³¹

6 *Evaluation of locomotor activity (Open-Field Test)*

7 The analysis of the locomotor activity in the open-field test was evaluated as to whether or not the motor coordination
8 of the aZF was altered, through the number of crossing lines (CL), using the CL value of the Naive group (without
9 treatment) as the baseline value (100%). The percentage of locomotor activity (LA%) was calculated individually during
10 0-5 minutes, according to Magalhães et al. (2017). The aZF (n = 6/group) groups were treated, orally (*vo*), with the
11 OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 µL; *vo*) or vehicle (Saline 0.9%; 20 µL; *vo*). A group of animals without treatment
12 was also included (Naive). One hour after the treatments, the animals were added to glass Petri dishes (10 x 15 cm),
13 containing the same aquarium water, marked with four quadrants, and thus the locomotor activity was analyzed.

15 *General protocol of the nociception tests*

16 After the aZF were randomly selected, they were transferred to a wet sponge, and treated with the test samples or
17 control vehicle, either orally (*v.o.*)³² or intraperitoneally (*i.p.*). Subsequently, they were placed individually in glass cups
18 (250 mL) containing 150 mL of aquarium water to rest. An insulin syringe (0.5 mL; UltraFine® BD) with 30G gauge
19 needle was used for intraperitoneal (*i.p.*), intramuscular (*i.m.*), or topical treatments, and a 20 µL automatic variable
20 pipette was used for the oral treatments.^{12,33}

22 *Involvement of the nociceptive pathways*

23 In conformity with the tests described by Batista et al. (2018) and Soares et al. (2019), the time to the nociceptive
24 action for each harmful agent (5.0 µL; *i.m.*) and antagonists (20 µL; *i.p.*) was analyzed with the following solutions: 0.1%
25 formalin (TRPA1 agonist), 0.33 µM cinnamaldehyde (TRPA1 agonist), 40.93 µM capsaicin (TRPV1 agonist), 12.5 µM
26 glutamate [glutamatergic receptor agonist (NMDA)], acid saline (ASICs agonist; 0.1% acetic acid dissolved in saline, pH
27 3, 28), hypertonic saline (NaCl; 5 M) (TRPV1 agonist;¹⁸), naloxone (0.2 mg/mL) (opioid antagonist), L-NAME (1.0
28 mg/mL) (inhibitor of nitric oxide synthesis), methylene blue (1.0 mg/mL) (inhibitor of nitric oxide and guanylate cyclase
29 synthesis), ketamine (0.01 mg/mL) [glutamatergic receptor antagonist (NMDA)], camphor (0.76 mg/mL) (TRPA1
30 antagonist), ruthenium red (0.3 mg/mL) (TRPV1 antagonist) or amiloride (5.0 mg/mL) (ASIC antagonist). Right after the
31 treatments, the aZF were placed one at a time, in a glass Petri dish (10 x 15 cm) divided into quadrants and the
32 antinociceptive response was recorded, which was quantified by the increase in line crossings (LC), performed according
33 to each determined time period, specific to each model as subsequently described. The animals' behavior was recorded by
34 calibrated and blinded analyzers, in conformity with rodent models.

36 *Formalin-induced nociceptive behavior*

37 The pretreatment of the aZF (n = 6/group) with the OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 µL; *v.o.*) or morphine
38 (Positive control; 0.2 mg/mL; 20 µL; *v.o.*), or vehicle (Control, 0.9% Saline; 20 µL; *v.o.*) were performed 1 h before the
39 intramuscular injection of 0.1% formalin (TRPA1 agonist; 5.0 µL; *i.m.*) in the tail. A Naive group (without treatment) was
40 also included and the percentage of analgesia (%A) was individually calculated during the neurogenic phase (1st phase; 0-
41 5 min) and in the inflammatory phase (2nd phase; 15 to 30 min).

43 *Cinnamaldehyde-induced nociceptive behavior*

44 The aZF (n = 6/group) were pretreated with the OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 µL; *v.o.*) or morphine (Positive
45 control; 1.0 mg/mL; 20 µL; *v.o.*), or vehicle (control; 0.9% saline; 20 µL; *v.o.*), 1 h before the intramuscular injection of
46 0.33 µM cinnamaldehyde (TRPA1 agonist; 5.0 µL; *i.m.*), applied to the tail. A Naive group (without treatment) was
47 included and the percentage of analgesia (%A) was individually calculated for a period of 0-5 minutes.

48 In a later experiment, aiming to evaluate the possible neuromodulation mechanism, this test was chosen because a
49 bigger potential for the antinociceptive effect of the OEFOb (consult results) was observed. Therefore, the aZF (n =
50 6/group) were pre-treated (20 µL; *i.p.*) 15 minutes before the oral administration of the smallest effective dose of the
51 OEFOb (0.25 mg/mL; 20 µL; *v.o.*) with: naloxone (0.2 mg/mL; opioid antagonist) or L-NAME (1.0 mg/mL; nitric acid
52 synthesis inhibitor) or methylene blue (1.0 mg/mL; nitric acid synthesis inhibitor and guanylate cyclase) or ketamine (0.01
53 mg/mL; NMDA antagonist) or camphor (0.76 mg/mL; TRAPAI antagonist) or ruthenium red (0.3 mg/mL; TRPV1
54 antagonist) or amiloride (5 mg/mL ASIC antagonist).

56 *Capsaicin-induced nociceptive behavior*

57 The aZF (n = 6/group) were pretreated with the OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 µL; *v.o.*) or morphine (Positive
58 control; 1.0 mg/mL; 20 µL; *v.o.*), or vehicle (control; 0.9% saline; 20 µL; *v.o.*), 1 h before the intramuscular injection of

1 40.93 μ M capsaicin (TRPV1 agonist; 5.0 μ L; *i.m.*), applied to the tail. A Naive group (without treatment) was included
2 and the percentage of analgesia (%A) was individually calculated for a period of 10-20 minutes.
3

4 *Glutamate-induced nociceptive behavior*

5 The aZF (n = 6/group) were pretreated with the OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) or morphine (Positive
6 control; 1.0 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*), or vehicle (control; 0.9% saline; 20 μ L; *v.o.*), 1 h before the intramuscular injection of
7 12.5 μ M glutamate [glutamatergic receptor agonist (NMDA); 5.0 μ L; *i.m.*], applied to the tail. A Naive group (without
8 treatment) was included and the percentage of analgesia (%A) was individually calculated for a period of 0-15 minutes.
9

10 *Acid saline solution-induced nociceptive behavior*

11 The aZF (n = 6/group) were pretreated with the OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) or morphine (Positive
12 control; 1.0 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*), or vehicle (control; 0.9% saline; 20 μ L; *v.o.*), 1 h before the intramuscular injection of
13 0.1% acid saline (ASIC agonist; 0.1% acetic acid dissolved in saline, pH 3.28; 5.0 μ L; *i.m.*), applied to the tail. A Naive
14 group (without treatment) was included and the percentage of analgesia (%A) was individually calculated for a period of
15 0-20 minutes.
16

17 *Hypertonic saline-induced corneal nociceptive behavior*

18 The aZF (n = 6/group) were pretreated with the OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) or morphine (Positive
19 control; 1.0 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*), or vehicle (control; 0.9% saline; 20 μ L; *v.o.*), 1 h before the application of the 5.0 M
20 hypertonic saline solution (TRPV1 agonist; 5.0 μ L) to the right eye. A Naive group (without treatment) was included and
21 the percentage of analgesia (%A) was individually calculated for a period of 0-5 minutes.¹⁸
22

23 In a later experiment, aiming to assess the possible neuromodulation mechanism, this test was also chosen to evaluate
24 the possible involvement of TRPV1 channels. Therefore, the aZF (n = 6/group) was pretreated (20 μ L; *i.p.*) 15 minutes
25 before oral administration of the smallest effective dose of the OEFOb (0.25 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) with capsazepine (0.5
26 mg/mL; TRPV1 antagonist; 20 μ L; *i.p.*).
27

28 *Statistical analysis*

29 Differences between the groups were submitted to analysis of variance (unidirectional ANOVA), followed by Tukey
30 test, after confirming the normality of distribution and homogeneity of data. Thus, the results were expressed as mean \pm
31 standard error of the mean for each group of 6 aZF, and all analyses were performed using the GraphPad Prism v
32 software. 6.01, with a level of statistical significance set at 5% ($p < 0.05$).
33

34 **Results**

35 *Chemical analysis of the essential oil of Ocimum basilicum Linn flowers*

36 The GC/MS chromatogram showed the presence of fourteen compounds in the essential oil of the *Ocimum basilicum*
37 Linn flowers, identified in Table 1. The main chemical constituents were linalool (56.37%), estragole (31.72%) and 1.8-
38 cineole (2.17%).
39

40 *Evaluation of locomotor activity (Open-Field Test)*

41 The OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) did not alter the locomotor activity of the adult zebrafish, when
42 compared with the controls ($p > 0.05$ vs. Naive or Vehicle), Fig. 1, as well as did not cause mortality of the adult zebrafish
43 up to 96 h of analysis ($LC_{50} > 2.5$ mg/mL).
44

45 *Nociceptive behavior induced by formalin, cinnamaldehyde, capsaicin, glutamate and acid saline*

46 The OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) significantly inhibited formalin-induced nociceptive behavior in
47 aZF in the first test phase ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$ vs. Control), as well as in the second phase of the test ($p < 0.01$;
48 $p < 0.01$; $p < 0.001$ vs. Control), Table 2.

49 The OEFOb, in all tested concentrations, significantly reduced the nociceptive behavior induced by cinnamaldehyde
50 ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$ vs. Control), capsaicin ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$ vs. Control), glutamate ($p < 0.01$; $p < 0.01$;
51 $p < 0.001$ vs. Control) or acid saline ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$ vs. Control), as shown in Table 2.

52 The highest percentage (82.80%) of nociceptive behavior inhibition was obtained with the OEFOb at a concentration of
53 0.25 mg/mL in the cinnamaldehyde test (Table 2). Therefore, this model was chosen to investigate possible mechanisms
54 of neuromodulation. As a result, the antinociceptive effect of the OEFOb was prevented by naloxone ($p < 0.001$ vs.
55 OEFOb), L-NAME ($p < 0.001$ vs. OEFOb), methylene blue ($p < 0.001$ vs. OEFOb), ketamine ($p < 0.05$ vs. OEFOb), camphor
56 ($p < 0.001$ vs. OEFOb), ruthenium red ($p < 0.001$ vs. OEFOb) and amiloride ($p < 0.001$ vs. OEFOb), Table 3.
57

58 *Hypertonic saline-induced corneal nociceptive behavior*

1 The OEFOb (0.25 or 1.25 or 2.5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) inhibited ($p<0.001$; $p<0.001$; $p<0.05$; vs. Control) the corneal
2 nociception induced by hypertonic saline (5 M; 5 μ L in the right eye), Fig. 2, and this effect was prevented by
3 capsazepine, Fig. 3.

4 Discussion

5
6 Although the anti-inflammatory potential of the essential oil of the *Ocimum basilicum* Linn leaves has already been
7 reported,²⁷ the present is research reports on the evaluation of the essential oil of the *Ocimum basilicum* Linn flowers
8 (OEFOb) capacity to attenuate the pain and corneal pain in adult zebrafish.

9
10 The species *Ocimum basilicum* Linn has a wide variety of chemical substances in its different parts, such as the
11 flowers, leaves, and stems. Rodrigues et al. (2016) detected as the main chemical constituents in the essential oil of the
12 *Ocimum basilicum* Linn leaves, the estragole (60.95%), linalool (27.26%) and 1,8-cineole (4.06%). In that study, linalool
13 was identified as the main component of the OEFOb; however, other compounds have also been identified, such as:
14 estragole (methyl chavicol) and 1,8-cineol (eucalyptol) (Table 1), which are also characteristic chemotypes of this species.

15 The locomotor activity of zebrafish is reduced by harmful chemical stimuli (such as formalin, cinnamaldehyde,
16 capsaicin, glutamate, menthol, and acid saline) eliciting a behavioral response by the fish.¹⁴ The OEFOb reduced the
17 number of nociceptive behaviors induced by formalin, cinnamaldehyde, capsaicin, glutamate, and acid saline (Table 2),
18 without altering locomotor activity (Fig. 1) and without acute toxicity.

19 Fish can suffer side effects when they receive inadequate anesthetic drug doses.³³ Thus, employing the lowest dose
20 (effective dose) of the OEFOb, the cinnamaldehyde test was chosen to investigate the possible mechanism of action of the
21 OEFOb, since the essential oil showed greater antinociceptive potential in this model (Table 2). The antinociceptive effect
22 of OEFOb was prevented by naloxone, L-NAME, methylene blue, ketamine, camphor, ruthenium red, and amiloride.
23 These results indicate that the OEFOb appears to act by modulating opioid nociceptors, nitric oxide, TRP channels,
24 NMDA, and ASICs.

25 It has become evident that the immune and nervous systems are closely integrated, both in steady-state conditions and
26 in pathological states, with soluble mediators, including cytokines, significantly contributing to it. Cytokines are essential
27 to pain mediators, being able to directly activate neurons through their specific nociceptors present in neuronal cells.³⁴ In
28 this context, it has already been reported that opioid nociceptor ligands modulate TRP channels.³⁵ TRPs are present in
29 sensory neurons having a role in nociception, and several of these channels are targets for opioids.³⁶ In zebrafish, TRP
30 orthologs are also found in sensory neurons and are modulated by various chemical and thermal agonists.³⁷ Lima et al.
31 (2020), reported such modulations in zebrafish, analyzing the antinociceptive effect of the essential oil of *S.*
32 *terebinthifolius* leaves (female), which follows a mechanism via the opioid system by naloxone, camphor, capsazepine,
33 and ruthenium red. In their study, Soares et al. (2019), also investigated the antinociceptive effect of oleanolic acid, a main
34 constituent of the essential oil, and demonstrated the same mechanism via the opioid system by capsazepine and
35 ruthenium red. Thus, one can also justify the fact that camphor, capsazepine, naloxone, and ruthenium red prevented the
36 antinociceptive effect of the OEFOb (Table 3).

37 The antinociceptive effect of the OEFOb was also prevented by methylene blue and L-NAME, both antagonists of
38 nitric oxide synthesis (Table 3). Nitric oxide targets opioid nociceptors, which is abundantly expressed by a subpopulation
39 of nociceptors, suggesting that the production of endogenous levels of nitric oxide may activate these nociceptors.³⁸
40 Zebrafish also exhibits a robust response system to nitric oxide, responding to nNOS inhibitors (nNOSI), which are
41 expressed in the developing zebrafish brain marrow, as well as responding to many of the dependent and independent
42 pathway agonists and antagonists.³⁹⁻⁴¹ When analyzing the antinociceptive potential of the essential oil of a natural
43 product, Lima et al. (2020), demonstrated the same action by modulating the nociceptors of nitric oxide synthesis via an
44 L-NAME mechanism. Thus, the OEFOb can bind to opioid nociceptors, decreasing the influx of nitric oxide into cells.

45 N-Methyl-D-aspartate (NMDA) nociceptors are ion channels with binds on excitatory synapses throughout the nervous
46 system, having high affinity for glutamate. The NMDA signaling pathway includes the activation of protein kinase C,
47 which modulates the function of NMDARs, and are prevented by several antagonists, including ketamine, acting in the
48 relief of hyperalgesia in pain models.⁴² Central NMDA nociceptors have already been demonstrated in zebrafish, and such
49 animals are highly sensitive to a broad spectrum of NMDA antagonists, such as ketamine, PCP, MK-801, and kynurenic
50 acid.^{43,44} Lima et al. (2020) in his research, also analyzed the antinociceptive potential of the essential oil of *S.*
51 *terebinthifolius* leaves (female), which was prevented by ketamine, indicating that the essential oil acts by modulating
52 NMDA nociceptors via a ketamine mechanism. Therefore, the fact that the OEFOb action is prevented by ketamine (Table
53 3) is justified, as it acts in the same way as in the signaling pathway of NMDA preventing hyperalgesia.

54 The OEFOb action was also prevented by acid sensing ion channel (ASIC) antagonist amiloride (Table 3). The
55 activation of ASIC channels occurs by the release of inflammatory mediators that result in the sensitization of cutaneous
56 nociceptors.⁴⁵ It is evident that amiloride significantly reduces acid-induced pain, demonstrating acid-induced pain relief,
57 primary and secondary hyperalgesia.^{42,46} The ASICs are found in zebrafish and are present at high levels in the central
58 nervous system and the retina, while their presence in peripheral organs is limited.^{47,48} Lima et al. (2020), reported such
59 modulation of the ASICs in zebrafish when analyzing the antinociceptive effect of the essential oil of the *S.*
60 *terebinthifolius* leaves (female), in which it demonstrated to have an action mechanism via amiloride. This also justifies
61 the fact that the OEFOb can also act as an antagonist for ASICs in aZF. ASIC inhibitors are a useful pharmacological tool
62 in pain therapy.⁴⁵

63 The OEFOb also reduced nociceptive behavior in the corneal nociception model induced by hypertonic saline (Fig. 2).
64 The activation of TRPV1 channels in the human cornea is associated with the hypertonic saline stimulus.⁴⁹ The TRPV1

1 are present in the cells of the neural crest of the heart and face in the zebrafish, acting as a heat sensor, which is activated
2 by high temperatures, as well as being activated by chemical agents.⁵⁰ Therefore, with the objective of investigating the
3 possible modulatory mechanism of TRPV1 receptors on the effect of the OEFOb, the adult zebrafish were pre-treated with
4 capsaizepine, an antagonist of the nociceptor TRPV1. In response, this drug significantly reduced the antinociceptive effect
5 of the OEFOb (Fig. 3). When investigating the antinociceptive potential of the essential oil of the *S. terebinthifolius* leaves
6 (female), Lima et al. (2020) demonstrated that the essential oil was able to reduce corneal nociception in aZF, as well as
7 had its antinociceptive potential blocked by capsaizepine, a TRPV1 antagonist. Thus, this study corroborates the
8 knowledge that the OEFOb is also a potential drug that acts in this pathway.

9 It is noteworthy, that linalool modulates numerous molecular targets by altering their gene expression, signaling
10 pathways or direct interaction,⁵¹ and it has also been reported that 1-8-cineole (eucalyptol), another compound present in
11 the OEFOb, acts by modulating nociceptors TRPs and NMDA.⁵² However, there have been no reports on the
12 antinociceptive effects of estragole, also found in the OEFOb, but the involvement of these chemotypes with the
13 nociceptive pathways would explain the fact that several tested antagonists prevented the antinociceptive effect of the
14 OEFOb.

15 Conclusion

16
17 The study showed that the essential oil of *Ocimum basilicum* Linn showed a pharmacological effect, as a nociception
18 inhibitor in adult zebrafish (*Danio rerio*) without altering locomotion and without causing toxicity to the animals. Our
19 findings, suggest that the antinociceptive effect of the OEFOb on acute pain is modulated by systems via opioid and
20 nitrenergic, glutamatergic receptors (NMDA), and TRP and ASIC channels. It is worth noting that the abovementioned oil
21 also showed a corneal antinociceptive effect in adult zebrafish mediated via TRPV1 channels. Therefore, these findings
22 encourage us to continue the study, aiming to isolate and characterize the active agent of the OEFOb. However, this study
23 adds new scientific evidence highlighting the potential of *O. basilicum* Linn flowers essential oil in the development of
24 conventional drugs with analgesic properties.

25 Acknowledgements

26
27 We would like to thank the State University of Ceará (UECE), the Cearense Foundation for Support for Scientific and
28 Technological Development (FUNCAP), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).
29 To the Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry (LFQM) at the Regional University of Cariri (URCA). To
30 the Biotechnology Research Group on Natural Resources (BIOREN) of the State University of Ceará (UECE-CECITEC),
31 for providing the space for the study to be performed.

32 Authors' contributions

33
34 FLAB, JIFA, SMBA, DBS and FBCS, performed the entire experimental part. FSB, participated in the process of
35 obtaining and transporting the animals for experimentation. MGLS, MRCO, RHSC and LBR, participated in the process
36 of obtaining the sample and proposed the experimental design. FEAM and IRAM, supervised all the work.

37 References

- 38 1. Rash JA, Poulin PA, Shergill Y, Romanow H, Freeman J, Taljaard M, et al. Chronic Pain in the Emergency Department:
39 A Pilot Interdisciplinary Program Demonstrates Improvements in Disability, Psychosocial Function, and Healthcare
40 Utilization. *Pain Res Manag* 2018;2018:1–10.
- 41 2. Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: The IASP
42 Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain* 2019;160(1):19–27.
- 43 3. Carleton RN, Afifi TO, Taillieu T, Turner S, El-Gabalawy R, Sareen J, et al. Anxiety-related psychopathology and chronic
44 pain comorbidity among public safety personnel. *J Anxiety Disord* 2018;55(H):48–55.
- 45 4. Hamann FR, Zago AM, Rossato MF, Beck VR, Mello CF, de Brum TF, et al. Antinociceptive and antidepressant-like
46 effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats. *J Ethnopharmacol* 2016;192:210–6.
- 47 5. Badal S, Turfus S, Rajnarayanan R, Wilson-Clarke C, Sandiford SL. Analysis of natural product regulation of opioid
48 receptors in the treatment of human disease. *Pharmacol Ther* 2018;184:51–80.
- 49 6. Ellison DL. Physiology of Pain. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2017;29(4):397–406.
- 50 7. Leite G de, Fernandes C, de Menezes IR, da Costa JG, Campos A. Attenuation of visceral nociception by α -bisabolol in
51 mice: investigation of mechanisms. *Org Med Chem Lett* 2012;2(1):18.
- 52 8. Saldanha AA, Vieira L, Ribeiro RIM de A, Thomé RG, Santos HB dos, Silva DB, et al. Chemical composition and
53 evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: Effect on edema,
54 leukocyte recruitment, tumor necrosis factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioid. *J*
55 *Ethnopharmacol* 2019;231:325–36. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.017>
- 56 9. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and
57 its relationship to the human genome. *Nature* 2013;496(7446):498–503.

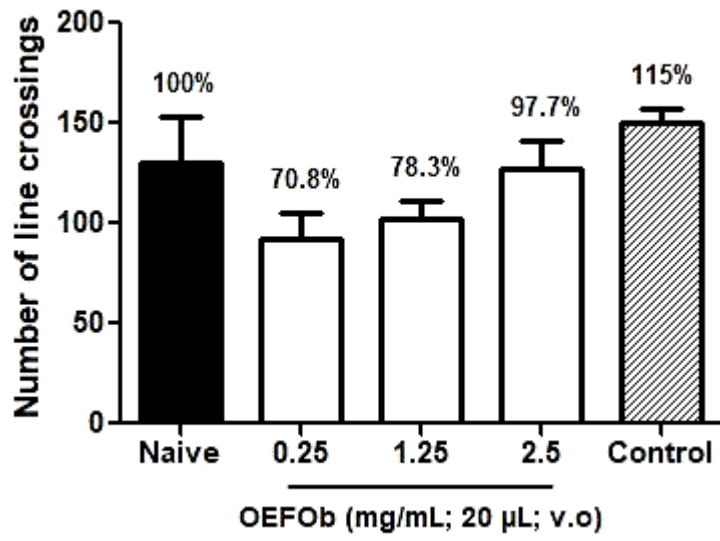
- 1 10. Nakayama J, Makinoshima H. Zebrafish-Based Screening Models for the Identification of Anti-Metastatic Drugs. *Molecules* 2020;1–13.
- 2
- 3 11. Brown HK, Schiavone K, Tazzyman S, Heymann D, Chico TJA. Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for
4 drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2017;12(4):379–89.
- 5 12. Magalhães FEA, De Sousa CÁPB, Santos SAAR, Menezes RB, Batista FLA, Abreu ÂO, et al. Adult Zebrafish (Danio
6 rerio): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish* 2017;14(5):422–9.
- 7 13. Taylor JC, Dewberry LS, Totsch SK, Yessick LR, DeBerry JJ, Watts SA, et al. A novel zebrafish-based model of
8 nociception. *Physiol Behav* 2017;174:83–8.
- 9 14. Batista FLA, Lima LMG, Abrante IA, de Araújo JIF, Batista FLA, Abrante IA, et al. Antinociceptive activity of ethanolic
10 extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion
11 pathways in adult zebrafish (Danio rerio). *Biomed Pharmacother* 2018;108:408–16.
- 12 15. do Nascimento JET, de Moraes SM, de Lisboa DS, de Oliveira Sousa M, Santos SAAR, Magalhães FEA, et al. The
13 orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult
14 zebrafish (Danio rerio). *Biomed Pharmacother* 2018;107:1030–6.
- 15 16. Soares ICR, Santos SAAR, Coelho RF, Alves YA, Vieira-Neto AE, Tavares KCS, et al. Oleonic acid promotes orofacial
16 antinociception in adult zebrafish (Danio rerio) through TRPV1 receptors. *Chem Biol Interact* 2019;299:37–43.
- 17 17. Lima MDCL, De Araújo JIF, Gonçalves Mota C, Magalhães FEA, Campos AR, Da Silva PT, et al. Antinociceptive Effect
18 of the Essential Oil of *Schinus terebinthifolius* (female) Leaves on Adult Zebrafish (Danio rerio). *Zebrafish*
19 2020;17(2):112–9.
- 20 18. Magalhães FEA, Batista FLA, Lima LMG, Abrante IDA, Batista FLA, Abrante IDA, et al. Adult Zebrafish (Danio rerio)
21 As a Model for the Study of Corneal Antinociceptive Compounds. *Zebrafish* 2018;15(6):566–74.
- 22 19. Silva VA, Da Sousa JP, De Luna Freire Pessôa H, De Freitas AFR, Coutinho HDM, Alves LBN, et al. *Ocimum basilicum*:
23 Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Pharm Biol*
24 2016;54(5):863–7.
- 25 20. Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A, Bais HP, Vivanco JM. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.)
26 found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *J Agric Food Chem* 2002;50(21):5878–83.
- 27 21. Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswary M, Yogalakshmi K. Chemical composition and larvicidal activity of essential
28 oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera:
29 Culicidae). *Exp Parasitol* 2013;134(1):7–11.
- 30 22. Hassan MI, Hammad KM, Saeed SM. Repellent Effect of *Ocimum Basilicum* and *Glycyrrhiza Glabra* Extracts Against
31 the Mosquito Vector, *Culex Pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Egypt Soc Parasitol* 2015;45(2):241–8.
- 32 23. Gaddaguti V, Venkateswara Rao T, Prasada Rao A. Potential mosquito repellent compounds of *Ocimum* species against
33 3N7H and 3Q8I of *Anopheles gambiae*. *3 Biotech* 2016;6(1):1–8.
- 34 24. Zhang JW, Li SK, Wu WJ. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum*
35 *basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. *Molecules* 2009;14(1):273–8.
- 36 25. Kumar A, Shukla R, Singh P, Dubey NK. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxicogenic activities of *Ocimum*
37 *sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food Chem Toxicol* 2010;48(2):539–43.
- 38 26. Roldán LP, Díaz GJ, Durringer JM. Composición y actividad antibacteriana de aceites esenciales obtenidos de plantas de la
39 familia Lamiaceae contra bacterias patógenas y benéficas. *Rev Colomb Ciencias Pecu* 2010;23(4):451–61.
- 40 27. Rodrigues LB, Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins A, Cesário FRAS, Ferreira e Castro F, de Albuquerque TR, Martins
41 Fernandes MN, et al. Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the *Ocimum basilicum* essential oil and its main
42 compound estragole: In vivo mouse models. *Chem Biol Interact* 2016;257:14–25.
- 43 28. Rodrigues LB, Martins AOBPB, Ribeiro-Filho J, Cesário FRAS, e Castro FF, de Albuquerque TR, et al. Anti-
44 inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in
45 mice. *Food Chem Toxicol* 2017;109:836–46.
- 46 29. Cartaxo SL, de Almeida Souza MM, de Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-
47 arid northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol* 2010;131(2):326–42.
- 48 30. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, Allured
49 Publishing Corporation, Carol Stream: Illinois, USA. 2012.
- 50 31. Conceia. Conceia. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa Nº 37, de 15 de
51 fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia. Disponível em [www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-](http://www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf)
52 [Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf](http://www.mctic.gov.br/.../concea/...normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf). Acesso. 2018;
- 53 32. Collymore C, Rasmussen S, Tolwani RJ. Gavage adult zebrafish. *J Vis Exp* 2013;(78):1–5.
- 54 33. Ekambaram SP, Perumal SS, Pavada S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of
55 inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. *Inflammopharmacology*
56 2017;25(1):147–58.
- 57 34. Cook AD, Christensen AD, Tewari D, McMahon SB, Hamilton JA. Immune Cytokines and Their Receptors in
58 Inflammatory Pain. *Trends Immunol* 2018;39(3):240–55.
- 59 35. Katsuyama S, Otowa A, Kamio S, Sato K, Yagi T, Kishikawa Y, et al. Effect of plantar subcutaneous administration of

- bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. *Biomed Res* 2015;36(1):47–54.
36. Cortés-Montero E, Sánchez-Blázquez P, Onetti Y, Merlos M, Garzón J. Ligands exert biased activity to regulate sigma 1 receptor interactions with cationic TRPA1, TRPV1, and TRPM8 channels. *Front Pharmacol* 2019;10:1–12.
37. Chen S, Chiu CN, McArthur KL, Fetcho JR, David A, Engineering B. TRP channel mediated neuronal activation and ablation in freely behaving zebrafish. *Nat Methods* 2016;13(2):147–50.
38. Marone IM, De Logu F, Nassini R, De Carvalho Goncalves M, Benemei S, Ferreira J, et al. TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice. *Brain* 2018;141(8):2312–28.
39. Allgood OE, Hamad A, Fox J, Defrank A, Gilley R, Dawson F, et al. General and Comparative Endocrinology Estrogen prevents cardiac and vascular failure in the ‘ listless ’ zebrafish (*Danio rerio*) developmental model. *Gen Comp Endocrinol* 2013;189:33–42.
40. Sykes BG, Steyn PM Van, Vignali JD, Winalski J, Lozier J, Bell WE, et al. The Relationship between Estrogen and Nitric Oxide in the Prevention of Cardiac and Vascular Anomalies in the Developing Zebrafish (*Danio Rerio*). *brain Sci* 2016;6(51):1–19.
41. Vimalraj S, Pichu S, Pankajam T, Dharanibalan K, Djonov V, Chatterjee S. Nitric Oxide Nitric oxide regulates intussusceptive-like angiogenesis in wound repair in chicken embryo and transgenic zebra fi sh models. *Nitric Oxide* 2018;0–1.
42. Khan A, Khan S, Kim YS. Insight into Pain Modulation: Nociceptors Sensitization and Therapeutic Targets. *Curr Drug Targets* 2019;20(7):775–88.
43. Robinson KSL, Michael A, Cachat J, Landsman S, Gebhardt M, Kalueff A V. Psychopharmacological effects of acute exposure to kynurenic acid (KYNA) in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 2013;108:54–60.
44. Kyzar EJ, Kalueff A V. Exploring Hallucinogen Pharmacology and Psychedelic Medicine with Zebrafish Models. *Zebrafish* 2016;00(00):1–12.
45. Zeng WZ, Liu DS, Xu T Le. Acid-sensing ion channels: Trafficking and pathophysiology. *Channels* 2014;8(6):481–7.
46. Gu Q, Lee LY. Acid-Sensing ion channels and pain. *Pharmaceuticals* 2010;3(5):1411–25.
47. Paukert M, Sidi S, Russell C, Siba M, Wilson SW, Gründer S, et al. A Family of Acid-sensing Ion Channels from the Zebrafish. In WIDESPREAD EXPRESSION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM SUGGESTS A CONSERVED ROLE IN NEURONAL COMMUNICATION. *J Biol Chem* 2004;279(18):18783–18791.
48. Levanti, M., Randazzoa, B., Vinã, E., Montalbanoa, G., Garcia-Suarez, O., Germanà, A., Vega, J.A., Abbate F. Acid-sensing ion channels and transient-receptor potential ion channels in zebrafish taste buds. *Ann Anat* 2016;207:32–7.
49. Pan Z, Wang Z, Yang H, Zhang F, Reinach PS. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(1):485–93.
50. Hutson MR, Keyte AL, Hernández-morales M, Gibbs E, Kupchinsky ZA, Argyridis I, et al. Temperature-activated ion channels in neural crest cells confer maternal fever – associated birth defects. *Sci Signal* 2017;4055:1–17.
51. Aprotosoiaie AC, Hãncianu M, Costache II, Miron A. Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr J* 2014;29(4):193–219.
52. Melo Júnior J de M de A de, Damasceno M de BMV, Santos SAAR, Barbosa TM, Araújo JRC, Vieira-Neto AE, et al. Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. *Inflammopharmacology* 2017;25(2):247–54.

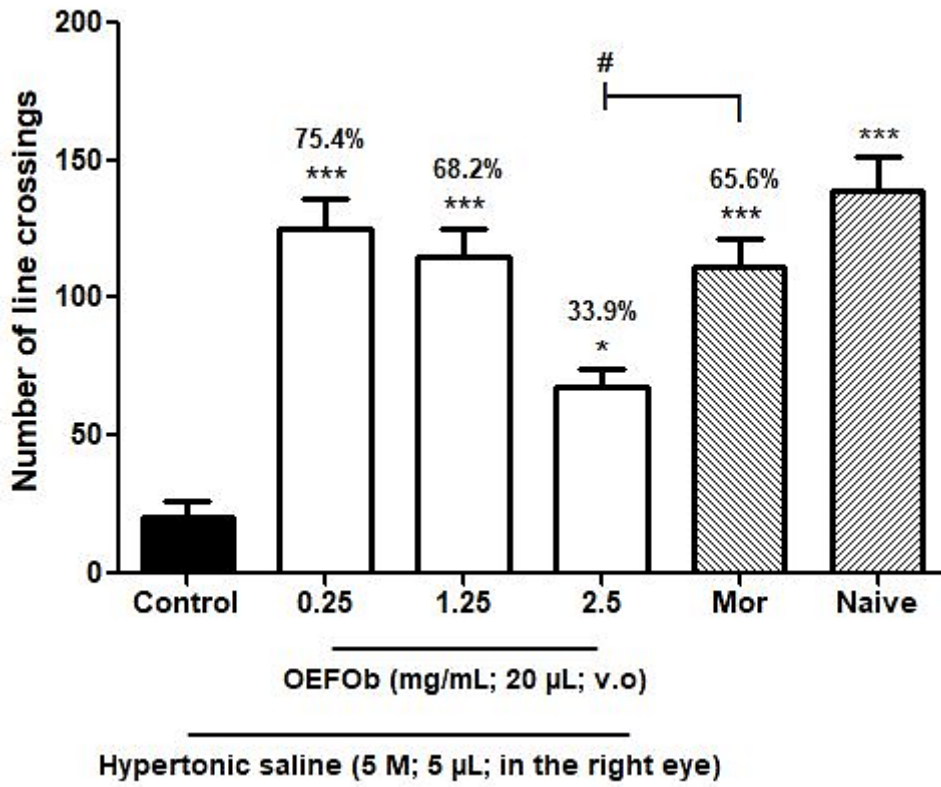
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

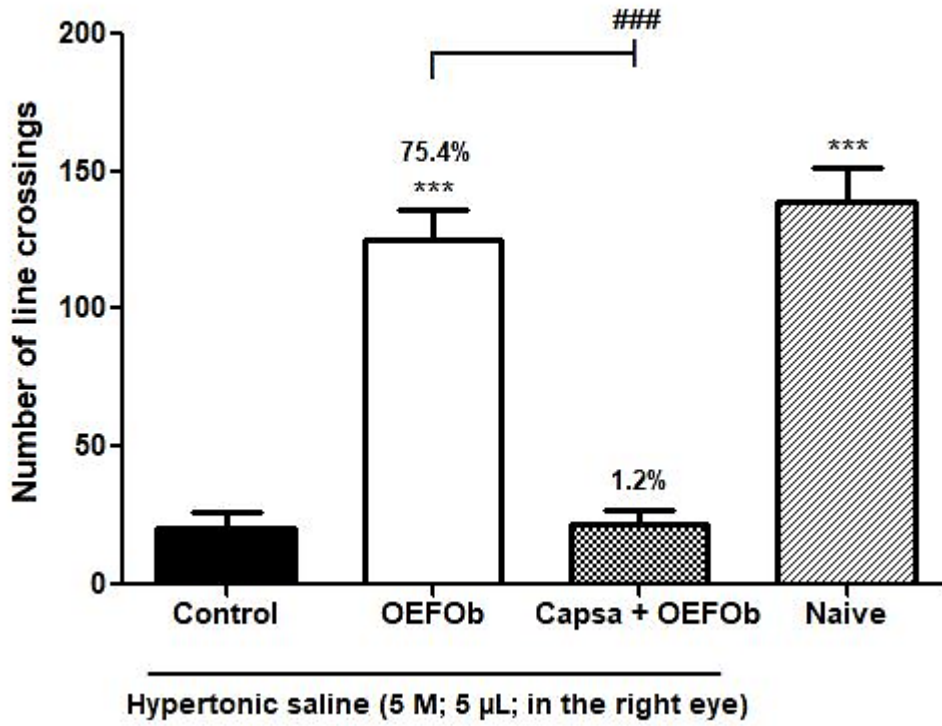
For Peer Review Only; NOT for Distribution

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54



view Only; NOT for Distribution





1
2
3
4
5 **Fig. 1.** Effect of the essential oil of *Ocimum basilicum* Linn flowers (OEFOb) on the
6 locomotor activity of adult zebrafish in the Open Field Test (0-5 min). Each column represents
7 the mean \pm standard error of the mean (n = 6/group). The numbers above the columns indicate
8 the percentage of locomotor activity (%LA). Naive – untreated group. Control – vehicle (0.9%
9 saline; 20 μ L; *v.o.*). One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.
10

11
12
13
14 **Fig. 2.** Effect of the essential oil of *Ocimum basilicum* Linn flowers (OEFOb) on corneal
15 nociception induced by hypertonic saline (5 M NaCl) in adult zebrafish (0-5 min). Each
16 column represents the mean \pm standard error of the mean (n = 6/group). The numbers above
17 the columns indicate the percentage of analgesia (%A). Control – vehicle (0.9% saline; 20 μ L;
18 *v.o.*). Naive – untreated group. Mor – morphine (1.0 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*). One-way ANOVA
19 with Tukey's post-hoc test (* p <0,05; *** p <0,001 vs. Control; # p <0,05 vs. Mor).
20

21
22
23
24 **Fig. 3.** Effect of Capsazepine (Cpsa) on the antinociceptive effect of the essential oil of
25 *Ocimum basilicum* Linn flowers (OEFOb) in adult zebrafish. Nociception was induced with
26 hypertonic saline (5 M; 5 μ L; applied topically in the right eye), for 0-5 min. Each column
27 represents the mean \pm standard error of the mean (n = 6/group). The numbers above the
28 columns indicate the percentage of analgesia (%A). Control – vehicle (0.9% saline; 20 μ L;
29 *v.o.*). Capsa (0.5 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*). Naive – untreated group. One-way ANOVA with
30 Tukey's post-hoc test (*** p <0,001 vs. Control; ### p <0,001 vs. OEFOb).
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

Table 1. Chemical profile of the essential oil of *Ocimum basilicum* Linn flowers (OEFOb).

Constituents	RT (min)	%
β -myrcene	3.56	0.37
1-8-cineole	4.15	2.17
Linalool	4.87	56.37
Camphor	5.63	0.71
terpinen-4-ol	5.98	1.05
Estragole	6.19	31.72
β -element	8.83	1.32
α -bergamotene	9.37	0.88
α -guaiene	9.46	0.34
β -cubebene	10.09	1.65
γ -elemene	10.29	0.39
γ -guaiene	10.37	0.63
γ -cadinene	12.11	1.90
2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-bicycles [4.4.0] decene	12.11	1.90
Total	–	101.4

RT - retention time; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy (Adams, 2012).

Table 2. Antinociceptive effect of OEFOb in adult zebrafish (*Danio rerio*).

Treatment	Groups												
	Concentration (v.o.)	Formalin (first phase) [#]		Formalin (second phase) [#]		Cinnamaldehyde		Capsaicin		Glutamate		Acid saline	
	mg/mL	%A	Line Crossings	% A	Line Crossings	% A	Line Crossings	% A	Line Crossings	% A	Line Crossings	% A	Line Crossings
Control	-	-	17.17 ± 4.31	-	49.67 ± 4.83	-	10.83 ± 3.54	-	24.67 ± 8.52	-	57.83 ± 7.58	-	21.67 ± 6.05
OEFOb	0.25	27.90	60.60 ± 7.46 ^{a*}	29.40	110.2 ± 9.54 ^{**}	82.80	110.00 ± 7.51 ^{***}	59.80	160.80 ± 9.58 ^{***}	41.40	168.80 ± 17.75 ^{**}	62.70	204.50 ± 23.50 ^{***}
OEFOb	1.25	35.10	71.83 ± 9.60 ^{**}	30.60	112.80 ± 7.49 ^{**}	69.70	94.33 ± 4.16 ^{***}	64.00	170.30 ± 12.36 ^{***}	45.20	178.80 ± 20.51 ^{**}	75.00	240.50 ± 17.49 ^{***}
OEFOb	2.5	50.90	96.33 ± 4.46 ^{***}	47.80	148.00 ± 9.45 ^{***}	75.50	101.20 ± 6.94 ^{***}	81.00	209.20 ± 14.10 ^{***}	52.40	198.20 ± 15.75 ^{***}	81.20	258.50 ± 26.39 ^{***}
Morphine	0.2 [#] or 1.0	55.20	103.00 ± 8.21 ^{***}	49.40	151.30 ± 9.38 ^{***}	77.40	103.50 ± 6.08 ^{***}	86.40	221.30 ± 14.84 ^{***}	61.10	221.70 ± 22.63 ^{***}	85.50	271.00 ± 13.37 ^{***}
Naive	-	-	155.5 ± 13.35 ^{***}	-	205.70 ± 15.08 ^{***}	-	119.70 ± 5.84 ^{***}	-	227.80 ± 23.10 ^{***}	-	268.00 ± 25.28 ^{***}	-	291.50 ± 22.22 ^{***}

Control (Vehicle; 0.9% Saline; 20 µL; v.o.); OEFOb – Essential oil from *O. basilicum* flowers; Naive - untreated group; v.o. – oral route; formalin (0.1%); cinnamaldehyde (0.33 µM); capsaicin (40.93 µM); glutamate (12.5 µM); acid saline (0.1%). The harmful agent was applied to the tail (5 µL; intramuscular). The results were expressed as Mean ± Standard error of the mean (n = 6/group); %A – percentage of analgesia (antinociception); Differences between groups were analyzed with one-way ANOVA, followed by Tukey's Test. The level of statistical significance was set at 5% (p<0.05): *p<0.05 vs. Control; **p<0.01 vs. Control; ***p<0.001 vs. Control; a – p<0.05 vs. Morphine;

Table 3. Effect of pre-treatment with naloxone, L-NAME, methylene blue, ketamine, camphor, ruthenium red and amiloride on the antinociceptive effect of OEFOb in adult zebrafish.

Groups ^a	Doses (mg/mL; 20 μ L v.o.)	Number of line crossings (0 – 5 min)	% Analgesia
Control	Saline 0.9% (20 μ L)	10.83 \pm 3.54	–
OEFOb	0.25	110.00 \pm 7.51***	82.8
Naloxone + OEFOb	0.2 + 0.25	20.67 \pm 5.40***	8.2
L-NAME + OEFOb	1.0 + 0.25	17.17 \pm 5.90***	5.3
Methylene blue + OEFOb	1.0 + 0.25	15.00 \pm 5.45***	3.5
Ketamine + OEFOb	0.01 + 0.25	81.17 \pm 6.19 [#]	58.7
Camphor + OEFOb	0.76 + 0.25	17.67 \pm 3.07***	5.7
Red ruthenium + OEFOb	0.3 + 0.25	25.17 \pm 3.59***	12
Amiloride + OEFOb	5.0 + 0.25	21.33 \pm 6.71***	8.7
Naive	No treatment	119.70 \pm 5.84***	–

^aNociception induced by cinnamaldehyde (0.33 μ M; 5 μ L; *i.m.* applied to the tail of the animals). The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (n = 6/group). Control - 0.9% saline (20 μ L; v.o.). OEFOb – essential oil from basil flowers (*Ocimum basilicum*). ANOVA followed by Tukey's Test (*** p <0.001 vs. Control; [#] p <0.05; ** p <0.001 vs. OEFOb).

3.2 Manuscrito 2 - Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina em zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

ZEBRAFISH
Volume 00, Number 00, 2020
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI:

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina em zebrafish (*Danio rerio*) adulto

Francisco Lucas A. Batista¹, Jacqueline Cosmo Andrade², Antonia Thassya L. dos Santos², Jessyca Nayara M. Lima⁴, Maria Gabriely de Lima Silva¹, Maria Rayane C. de Oliveira¹, Roger Henrique S. da Costa¹, Beatriz Gonçalves da Cruz³, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira³, Francisco Assis B. da Cunha⁴, Henrique Douglas M. Coutinho², Francisco Ernani A. Magalhães⁵, Irwin Rose Alencar de Menezes^{1*}

Abstract

A necessidade do crescimento da produção de medicamentos mais eficientes, para o controle de infecções bacterianas, tem despertado a indústria farmacêutica em desenvolver novas drogas a partir de compostos isolados de plantas. Logo, este estudo tem o objetivo investigar atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina em zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa). O estragol foi adquirido da Sigma Aldrich (Brasil), o complexo de inclusão do estragol em β -ciclodextrina foram preparados através do método de co-precipitação e precipitação (3:1 β -ciclodextrina/estragol), e analisados pela técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourie (FTIR). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro*, pelo método adaptado de infecção *in vivo* por *S. aureus* em ZFa, e pelo método adaptado de potencialização da ação antibiótica em ZFa. O ES/ β -CD apresentou complexação mostrando bandas comuns e características do estragol (1511 cm^{-1} e 1238 cm^{-1}), bem como da β -CD (3359, 2926, 1153 e 1029 cm^{-1}). O estragol e o seu complexo ES/ β -CD ambos demonstraram valores de CIM de 1024 $\mu\text{g/mL}$, frente à cepa *S.a.* ATCC 25923 no ensaio *in vitro*. O modelo de infecção *in vivo* por *S. aureus* em ZFa foi estabelecido durante o período de 24 e 48 h após a infecção por inóculo bacteriano. A administração oral do estragol (P1) e de seu complexo ES/ β -CD (P2) não causou mortalidade dos ZFa até 48 h de ensaio, assim como reduziram a infecção induzida por *S.a.* ATCC 25923 nos ZFa, demonstrando efeitos clinicamente relevantes. Na verificação do efeito sinérgico, o estragol e seu complexo ES/ β -CD mostraram-se significativos frente a cepa *S.a.* ATCC 25923, sendo que o complexo ES/ β -CD apresentou resultados mais relevantes quando associados a gentamicina. No entanto, este estudo acresce novas evidências científicas destacando o potencial antimicrobiano das amostras estudadas, e esses resultados nos levam a estudos histopatológicos dos tecidos infectados, bem como estudos comportamentais afim de validar tal efeito farmacológico e assegurar o possível uso terapêutico.

Palavras-chave: antimicrobiano, *Staphylococcus aureus*, estragol, zebrafish adulto.

Introdução

A resistência bacteriana vem representando um risco à saúde pública ao longo dos anos com o seu

avanço,¹ isso é devido a disseminação do uso de antibióticos, levando a desenvolver diversos mecanismos de defesa contra agentes antibacterianos comercialmente disponíveis.² Dessa forma, a busca por

¹Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM), Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Crato, Ceará, Brasil.

²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Crato, Ceará, Brasil.

³Laboratório de Simulações e Espectroscopia Molecular (LaSEMol), Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Crato, Ceará, Brasil.

⁴Laboratório de Bioprospecção do Semi-Árido (LABSEMA), Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica, Crato, Ceará, Brasil.

⁵Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, Departamento de Química, Campus CECITEC, Tauá, Ceará, Brasil.

agentes antimicrobianos de origem natural, que atuam como mecanismo de interação e defesa está cada vez maior, e por apresentarem propriedades biológicas importantes, estes são tidos como fontes medicinais.³

O estragol também é um monoterpene, e amplamente utilizado na indústria de alimentos e bebidas.⁴ Estudos reportam os efeitos ansiolíticos,⁵ anti-inflamatório⁶ e antioxidante⁷ do mesmo em roedores. Já foi relatado que estragol possui muitos efeitos biológicos, incluindo atividades antimicrobianas *in vitro* (contra *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*).⁸

Recentemente, modelos substitutivos vêm sendo empregados, tais como o zebrafish (*Danio rerio*).⁹ O zebrafish (*Danio rerio*) é um teleosteo pequeno, de água doce, da família Cyprinidae, e com baixo custo, fácil manipulação e rápido desenvolvimento, além de possuir homologia genética humana em torno de 70 a 80%.¹⁰

Os zebrafish's (*Danio rerio*) ganharam popularidade em estudos enfocando terapias potenciais, os quais, fornecem informações importantes dos compostos que estão sendo testados, como por exemplo, a especificidade alvo.¹¹ Partindo-se deste princípio, existe um grande número de modelos de doenças usados para testar a eficácia dos compostos de origem naturais em zebrafish (*Danio rerio*),^{12,13} dentre eles estão os estudos de infecções bacterianas avaliando a resposta de muitos patógenos diferentes.¹⁴

Dessa forma, o presente estudo reporta a atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do estragol e de seu complexo em β -ciclodextrina em zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

Materiais e Métodos

Preparação de complexos de inclusão em β -ciclodextrinas (β -CD)

O complexo de inclusão em β -ciclodextrina foi preparado pelo método de co-evaporação e precipitação, de acordo com os procedimentos descritos por Rachmawati, Edityaningrum, & Mauludin (2013), com modificações. Dissolveram-se aproximadamente 7 g de β -CD em 20 mL de água destilada e acetona (3:1 v/v) a 40 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados o estragol em soluções hidro-acetona de β -CD com agitação contínua por 1 h á 300 rpm a 37 °C. Em seguida, a mistura será sonicada por 10 minutos a 4 °C para diminuir o tamanho das partículas e incubada por 12 horas a 4 °C. Após, deixar a mistura em agitação no agitador magnético por 36 hrs a 35 °C em 300 rpm, e após o tempo de agitação, foi deixada a mistura por 24 h no congelador. As amostras foram colocadas no liofilizador sob vácuo a 40 °C por 36 h.

Caracterização dos Complexos de Inclusão Medida de Espectroscopia de Infravermelho do ES/ β -CD

Foi realizada a caracterização química do complexo de inclusão estragol em β -ciclodextrina (ES/ β -CD), assim como da β -ciclodextrina (β -CD) e Estragol separadamente, utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho. Os espectros de absorvância

infravermelho do tipo Reflexão Total Atenuada com Transformada de Fourier (ATR-FTIR: attenuated total reflection Fourier transform infrared), foi obtido utilizando o espectrômetro da marca Agilent, modelo CARY 660 FT-IR, os resultados foram processados usando o software para espectroscopia de infravermelho (OriginPro v.8.5). O espectro ATR - FTIR foi registrado a temperatura ambiente, com uma resolução espectral de 4 cm⁻¹ e realizando 32 varreduras na região de número de onda de 4000 cm⁻¹ a 600 cm⁻¹.¹⁶

Cepa bacteriana

A cepa padrão utilizada nos testes *in vitro* e *in vivo* foi a *Staphylococcus aureus* (S.a ATCC 25923). A cepa foi cultivada durante 24 h a 37 °C em placas de Petri contendo *Brain Heart Infusion Agar* (BHI-agar) (Difco).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) *in vitro*

A CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 poços e em triplicata. O meio BHI caldo foi preparado a 10%, esterilizado e distribuído em eppendorfs® contendo 900 μ L de meio de cultura BHI e 100 μ L de inóculo, e desse conteúdo nos eppendorfs foram transferidos 100 μ L para cada cavidade na microplaca. Após esse processo, realizou-se a microdiluição do estragol e do seu complexo ES/ β -CD com concentração de 1024 μ g/mL, sendo feita a diluição de 100 μ L até penúltima cavidade. Os controles de crescimento (meio + inóculo) foram inclusos nos ensaios, na última cavidade. As placas preenchidas foram incubadas a 35 \pm 2°C por 24 horas.¹⁷ Após a incubação, 20 μ L de reagente colorimétrico (resazurina: 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) foram adicionados em cada cavidade. Após uma hora de reação, os resultados foram interpretados através da mudança de cor da resazurina.¹⁸ Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa)

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos (fenótipo short-fin) com idade de 60 - 90 dias, tamanhos de 3,5 \pm 0,5 cm e peso 0,4 \pm 0,1 g foram obtidos de um fornecedor comercial em Fortaleza (Ceará, Brasil), Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA. Os animais foram mantidos em grupos de 50 animais e aclimatados por 24 h em aquários de vidro (30 x 15 x 20 cm), contendo água desclorada (ProtecPlus®) 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 foram alimentados com ração *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.¹⁹ Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA-URCA; #00225/2018.2).

Infecção bacteriana em zebrafish (*Danio rerio*) adulto

Os ZFa foram infectados com inóculo de *S. aureus*, sob condições assépticas, baseando-se em metodologias propostas por Neely, Pfeifer e Caparon (2002), com adaptações. Inicialmente foi determinado a DL₅₀-48h do inóculo bacteriano. Os ZFa (n=3/grupo) foram selecionados randomicamente, anestesiados com água gelada (12 a 15 °C), contidos em esponja úmida e tratados, via intramuscular (*i.m.*) no dorso, com 10 µL do inóculo de *S. aureus* (10⁸ UFC/mL), utilizando uma seringa de insulina (0,3 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 29G e aclimatados por 4 h em becker's de vidro distintos. Após infectados, os animais foram tratados com veículo do inóculo (Salina; controle negativo; 0,9%; 10 µL; no dorso) ou gentamicina (Controle antibiótico; 1024 µg/mL; 20 µL; *i.p.*) e deixados por 24 h em repouso. Após os tratamentos, os animais foram eutanaziados com água gelada (2-4 °C) e retirado o dorso infectado para ser feito o homogeneizado, que foi posteriormente aplicado com o swab na placa de petri contendo meio BHI-agar (*Brain Heart Infusion Agar*) para a cultura de bactérias. A resposta antimicrobiana foi caracterizada pelo crescimento da cultura de bactérias (CCB), analisadas durante 24 e 48 h. Foi calculado a porcentagem de infecção (%I) de cada placa individualmente, conforme:

$$\%I = \left\{ \frac{[\text{CCB (tratamento)} \times 100\%]}{\text{CCB (controle positivo)}} \right\}$$

onde onde CCB é o número do crescimento da cultura de bactérias.

Atividade antimicrobiana *in vivo*

A atividade antimicrobiana *in vivo* do estragol e seu complexo em β-CD foi avaliada em ZFa infectado conforme metodologia proposta por Lotha et al. (2018), com adaptações. Inicialmente foi determinado a DL₅₀-48h das amostras testadas. Os animais infectados (n=3/grupo) com 10 µL do inóculo de *S. aureus* (10⁸ UFC/mL; *i.m.*; no dorso), foram tratados via oral (*v.o.*) ou via intraperitoneal (*i.p.*) com estragol ou seu complexo ES/β-CD (conforme melhor dose do teste *in vitro*), ou veículo das amostras (Salina; controle negativo) ou gentamicina (Controle antibiótico; 1024 µg/mL; 20 µL; *i.p.*) após 4 h de infecção e aclimatados em becker's de vidro distintos. Após 24 h dos tratamentos, os animais foram eutanaziados com água gelada (2-4 °C) e retirado o dorso infectado para ser feito o homogeneizado, que foi posteriormente aplicado com o swab na placa de petri contendo meio BHI-agar (*Brain Heart Infusion Agar*) para a cultura de bactérias. Foi utilizado uma seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 31G para os tratamentos via intraperitoneal (*i.p.*). A resposta antimicrobiana foi caracterizada pelo crescimento da

cultura de bactérias (CCB), analisadas durante 24 e 48 h.

Potencialização da ação antibiótica *in vivo*

Para avaliar se as substâncias modificaram a ação dos antibióticos frente às bactérias padrão, seguiu-se o método proposto por Lotha et al. (2018), com adaptações. Os animais infectados (n=3/grupo) com 10 µL do inóculo de *S. aureus* (Controle positivo; 10⁸ UFC/mL; *i.m.*; no dorso), foram tratados via oral (*v.o.*) ou via intraperitoneal (*i.p.*) com a associação do estragol (1024 µg/mL) com gentamicina (1024 µg/mL) (1:1) (denominada amostra P1), ou a associação do complexo ES/β-CD (1024 µg/mL) com gentamicina (1024 µg/mL) (1:1) (denominada amostra P2), ou veículo das amostras (Salina; controle negativo) ou gentamicina (Controle antibiótico; 1024 µg/mL; 20 µL; *i.p.*) após 4 h de infecção e aclimatados em becker's de vidro distintos. Após 24 h dos tratamentos, os animais foram eutanaziados com água gelada (2-4 °C) e retirado o dorso infectado para ser feito o homogeneizado, que foi posteriormente aplicado com o swab na placa de petri contendo meio BHI-agar (*Brain Heart Infusion Agar*) para a cultura de bactérias. Foi utilizado uma seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 31G para os tratamentos via intraperitoneal (*i.p.*). A resposta antimicrobiana foi caracterizada pelo crescimento da cultura de bactérias (CCB), analisadas durante 24 e 48 h.

Análise estatística

Para os testes *in vivo*, os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M). Todas as análises estatísticas serão aplicadas usando ANOVA Oneway ou ANOVA two-way seguido pelo teste de Tukey's ou Teste *Post Hoc* de Bonferroni's, respectivamente, usando o software GraphPad Prism 6.0, e valores de $p < 0,05$ serão considerados diferenças significativas.

Resultados

Caracterização dos Complexos de Inclusão Medida de Espectroscopia de Infravermelho do ES/β-CD

Os espectros de infravermelho obtidos por reflexão total atenuada (ATR-FTIR), mostraram bandas comuns e específicas do ES/β-CD, β-ciclodextrina e Estragol, apresentados na Figura 1-A/B/C. Essa caracterização nos permitiu obter informações de grande importância na confirmação da identidade das substâncias analisadas, como na identificação dos grupos funcionais.

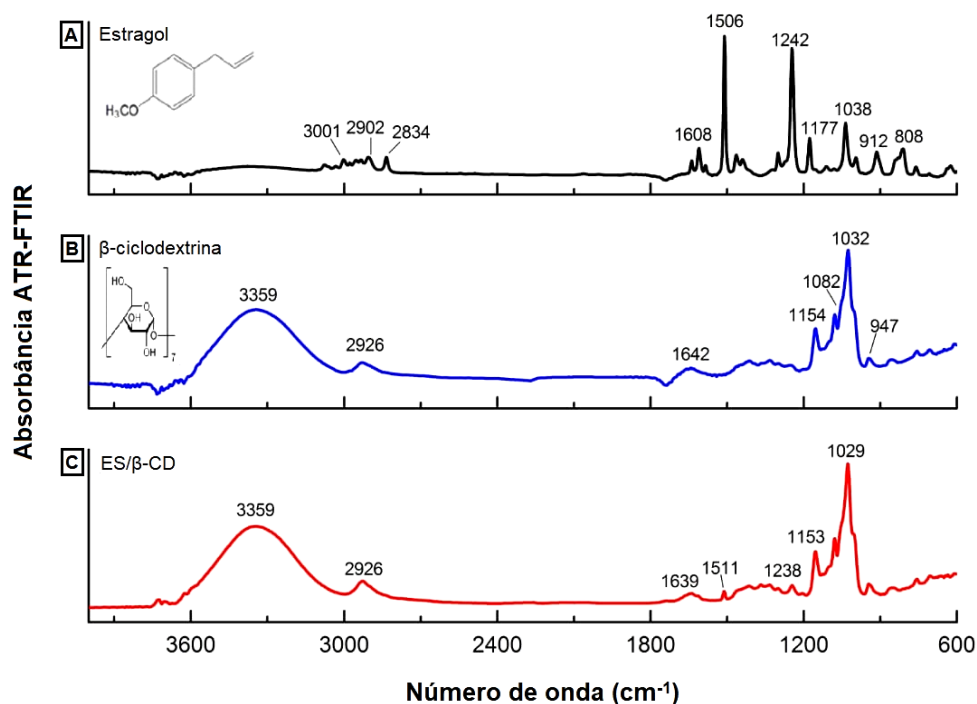


FIG. 1-A/B/C. Espectro na região do infravermelho: (A) Estragol; (B) β -ciclodextrina; (C) ES/ β -CD.

A partir da análise do espectro de absorvância foram identificadas bandas características do Estragol, o modo evidenciado em 3001 cm^{-1} são estiramentos de ligações simples entre carbono e hidrogênio (C-H) pertencentes ao anel aromático, bandas fracas na região de $2800\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ podem indicar o estiramento axial da ligação do grupo CH. Na faixa de $1600\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ estão localizados os modos vibracionais de ligação dupla (C=C) do anel, no espectro infravermelho do estragol essas vibrações foram identificadas em 1608 cm^{-1} e 1506 cm^{-1} . A banda de alta intensidade observada em 1242 cm^{-1} trata-se de uma vibração de ligação simples entre C-O-C e o número de onda de 808 cm^{-1} é atribuída a uma deformação angular do anel aromático.

O espectro de absorção da β -ciclodextrina mostrou bandas características dessa substância, é possível observar no número de onda 3359 cm^{-1} uma banda larga típica de estiramento do grupo hidroxila (O-H), a banda evidenciada em 2926 cm^{-1} trata-se de um estiramento do (C-H). O número de onda 1642 cm^{-1} trata-se de uma deformação angular entre H-O-H, e na região de $1260\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ são as vibrações de estiramento dos grupos de ligação carbono e hidrogênio, no espectro foi

observado esse modo vibracional nas bandas em 1154 cm^{-1} (estiramento do C-O) e em 1032 cm^{-1} (estiramento do C-O-C).

No espectro do complexo ES/ β -CD observou-se picos característicos e uma forte semelhança com o espectro da β -CD. Em especial, as bandas 3359 , 2926 , 1153 e 1029 cm^{-1} ficaram bem evidentes no complexo formado, com destaque também para as bandas 1511 cm^{-1} e 1238 cm^{-1} características do estragol, que apresentou uma redução de intensidade comparada ao espectro isolado (1505 cm^{-1} e 1242 cm^{-1} , respectivamente) e teve um pequeno deslocamento de número de onda, sugerindo que estas ligações possivelmente estão implicadas na formação destes complexos.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) in vitro

Os resultados obtidos (Tabela 1) da concentração inibitória mínima (CIM), mostraram que o Estragol e seu complexo ES/ β -CD, demonstraram valores de CIM de $1024\text{ }\mu\text{g/mL}$ para ambos, frente à cepa *S.a.* ATCC 25923.

TABELA 1. VALORES DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) DO ESTRAGOL E SEU COMPLEXO ES/ β -CD CONTRA CEPA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (*S.a.* ATCC 25923).

Substância	Bactéria
	<i>S.a.</i> ATCC 25923
Estragol	1024
ES/ β -CD	1024

Os valores representam a média geométrica \pm E.P.M. (erro padrão da média). ATCC – Deformação padrão; *S.a.* - *Staphylococcus aureus*; ES/ β -CD – Estragol/ β -ciclodextrina.

Infecção bacteriana em zebrafish (*Danio rerio*) adulto

O modelo de infecção *in vivo* por *Staphylococcus aureus* (S.a ATCC 25923) em zebrafish (*Danio rerio*) adulto foi bem estabelecido durante período de 24 h

quando a gentamicina inibiu significativamente (** $p < 0,001$ vs CP) a infecção induzida por *S. aureus*, conforme observado na Figura 2-A/B, porém com 48 h não foi mais observado a inibição da infecção pela gentamicina, ocorrendo um aumento significativo da infecção.

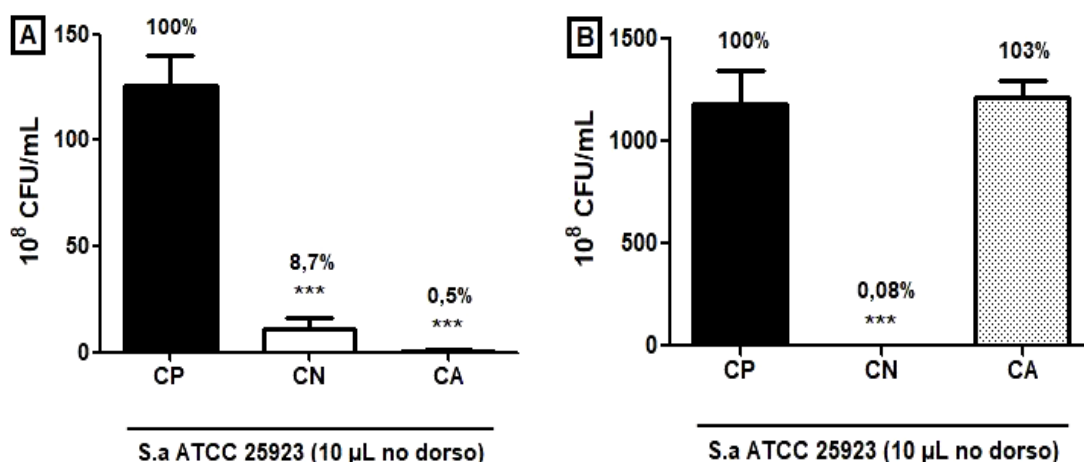


FIG. 2-A/B. Infecção bacteriana por *Staphylococcus aureus* em zebrafish (*Danio rerio*) adulto durante 24 (A) e 48 h (B). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média ($n=3$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de infecção (%I). CP - Controle positivo (Inóculo 10^8 UFC/mL; 10 μ L no dorso); CN - Controle negativo (Salina 0,9%; 10 μ L no dorso); CA - Controle antibiótico (Gentamicina; 1024 μ g/mL; 20 μ L; *i.p.*). ANOVA seguida do Teste Tukey's (** $p < 0,001$ vs CP).

Atividade antimicrobiana *in vivo*

P1 (Estragol; 20 μ L; *v.o.*) inibiu significativamente (** $p < 0,001$ vs CP) a infecção induzida por *Staphylococcus aureus* (S.a ATCC 25923) apenas durante o período de 24 h com percentual de infecção

de 15,6%, enquanto que P2 (Complexo ES/ β -CD; 20 μ L; *v.o.*) inibiu significativamente (** $p < 0,001$ vs CP) a infecção durante o período de 24 e 48h com percentuais de infecção de 9,8% e 39,2% respectivamente, conforme pode ser verificado na Figura 3-A/B.

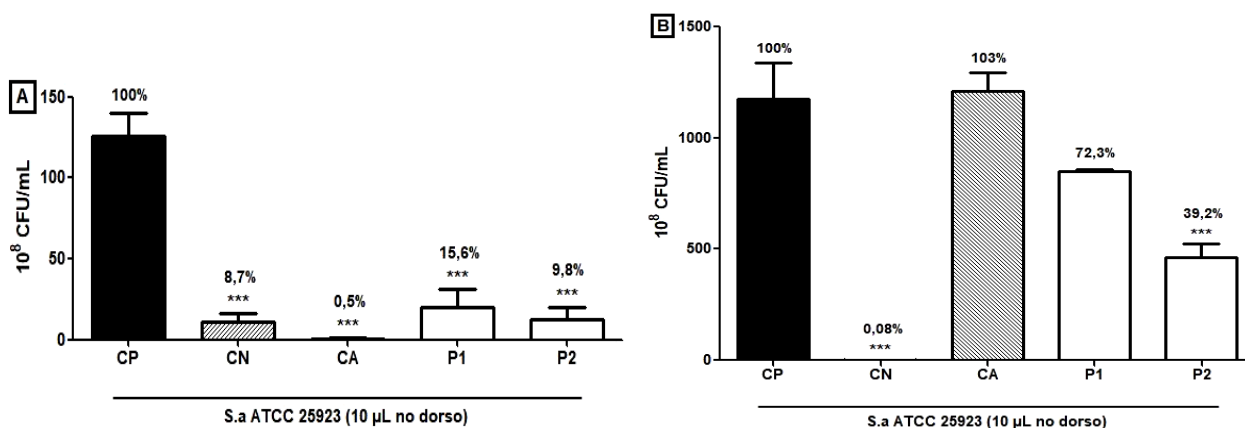


FIG. 3-A/B. Efeito antimicrobiano do Estragol e seu complexo ES/ β -CD contra *Staphylococcus aureus* em zebrafish (*Danio rerio*) adulto durante 24 (A) e 48 h (B). Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média ($n=3$ /grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de infecção (%I). CP - Controle positivo (Inóculo 10^8 UFC/mL; 10 μ L no dorso); CN - Controle negativo (Salina 0,9%; 10 μ L no dorso); CA - Controle antibiótico (Gentamicina; 1024 μ g/mL; 20 μ L; *i.p.*); P1 - Estragol (20 μ L; *v.o.*); P2 - Complexo ES/ β -CD (20 μ L; *v.o.*). ANOVA seguida do Teste Tukey's (** $p < 0,001$ vs CP).

Potencialização da ação antibiótica *in vivo*

A ação da gentamicina quando associada ao Estragol (P1+GEN; 20 μ L; *i.p.*), foi potencializada contra a *Staphylococcus aureus* (S.a ATCC 25923) ao inibir significativamente (** $p < 0,001$ vs CP) a infecção no

período de 24 e 48 h, com percentuais de infecção de 3,2% e 43,3% respectivamente. Por outro lado, a ação da gentamicina quando associada ao complexo ES/ β -CD (P2+GEN; 20 μ L; *i.p.*) mostrou um potencial ainda melhor, inibindo significativamente (** $p < 0,001$ vs CP) a infecção no período de 24 e 48 h, com percentuais de

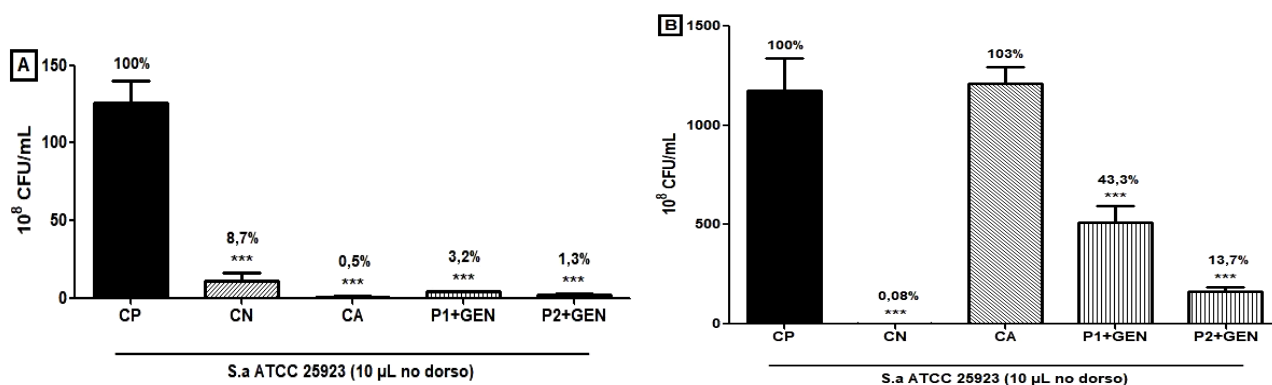


FIG. 4-A/B. Efeito modulatório do Estragol e seu complexo ES/β-CD quando associado com Gentamicina contra *Staphylococcus aureus* em zebrafish (*Danio rerio*) adulto durante 24 (A) e 48 h (B). Cada coluna representa a média ± erro padrão da média (n=3/grupo). Os números acima das colunas indicam porcentagem de infecção (%I). CP - Controle positivo (Inóculo 10⁸ UFC/mL; 10 μL no dorso); CN - Controle negativo (Salina 0,9%; 10 μL no dorso); CA - Controle antibiótico (Gentamicina; 1024 μg/mL; 20 μL; *i.p*); P1+GEN - Associação Estragol com Gentamicina (1:1; 20 μL; *i.p*); P2+GEN - Associação Complexo ES/β-CD com Gentamicina (1:1; 20 μL; *i.p*). ANOVA seguida do Teste Tukey's (**p<0,001 vs CP).

de infecção de 1,3% e 13,7% respectivamente, conforme pode ser verificado na Figura 4-A/B.

Discussões

Apesar do potencial antimicrobiano do estragol já ter sido reportado *in vitro*,²²⁻²⁴ o presente estudo é o primeiro a relatar a avaliação do potencial antimicrobiano em *in vivo* do estragol e de seu complexo em β-ciclodextrina (ES/β-CD), atenuando a infecção induzida por *Staphylococcus aureus* e potencializando a ação antibiótica em zebrafish adulto.

A espectroscopia de infravermelho por meio da técnica de FT-IR, engloba as frequências de vibrações moleculares do tipo estiramento e dobramento das ligações, o que permite obter informações fundamentais sobre a estrutura molecular de substâncias orgânicas ou inorgânicas.^{16,25} Dessa forma, a análise por meio da técnica de FT-IR nesse estudo, nos permitiu a confirmação da complexação do estragol com a β-ciclodextrina (β-CD), através do deslocamento das bandas, apresentando picos comuns e característicos do estragol, bem como da β-CD com uma forte semelhança, conforme pode ser observado na Figura 1-A/B/C.

Nos estudos de Fonseca et al. (2019), também foi confirmado a evidência da formação do complexo de inclusão entre estragol e β-CD através do método de ATR-FTIR, demonstrando claramente o encapsulamento do estragol com β-CD, sugerindo que a complexação com ciclodextrinas pode ser uma forma eficaz de melhorar a estabilidade da amostra. No entanto, os espectros de ATR-FTIR nos fornecem perfis peculiares para as amostras estudadas, e esta técnica pode ser considerada uma ferramenta rápida para a avaliação química bruta.²⁷

Partindo-se do fato de que não houve mortalidade do zebrafish adulto até 48 h após a infecção do inóculo bacteriano, foi possível estabelecer o modelo de infecção *in vivo* por *S. aureus* (S.a ATCC 25923) em zebrafish (*Danio rerio*) adulto durante o período de 24 e

48 h (Figura 1-A/B). Neely, Pfeifer & Caparon (2002) estabeleceram o primeiro modelo de infecção em zebrafish (*Danio rerio*) adulto, utilizando os patógenos *Streptococcus iniae* e *Streptococcus pyogenes* para infecção, confirmando o uso do zebrafish adulto como um modelo de infecção *in vivo* acessível para experimentação animal. Recentemente, o zebrafish adulto também foi usado em um modelo de infecção induzida por *S. aureus* do tipo Endoftalmite,²⁸ no qual foi possível observar que não houve desenvolvimento de endoftalmite nos zebrafish's adultos e o mesmo responde atuando rapidamente contra o patógeno. Logo, nossos resultados são considerados importantes, pois corroborando com os acima mencionados.

Os processos infecciosos vêm gerando consequências para saúde humana, assim os produtos naturais de plantas medicinais se tornaram alternativas interessantes por possuírem constituintes químicos capazes de eliminarem as infecções ocasionadas por microrganismos patogênicos.²⁹ Diante disso, além de demonstrarem efeito antimicrobiano *in vitro* (Tabela 1), o estragol e seu complexo ES/β-CD também demonstraram efeitos clinicamente relevantes ao inibirem a infecção induzida por *S. aureus* em zebrafish adulto nas primeiras 24 h, porém somente o complexo ES/β-CD foi eficaz até as 48h de análise, apresentando assim melhor efeito (Figura 2-A/B). Zhang et al. (2019) utiliza o zebrafish adulto para resposta imune após infecção por *S. aureus*, uma vez que essa atua alterando a expressão genica que estão envolvidas principalmente na imunidade antibacteriana do zebrafish adulto.

Em seus estudos Lotha et al. (2018), além de induzir a infecção em zebrafish, utilizou nanopartículas de prata de extratos de *Capsicum annuum* (pimenta cera húngara e pimentão verde) na tentativa de produzir um efeito anti-biofilme, demonstrando que os mesmos exerceram efeitos menos tóxicos e mais relevantes contra o patógeno *S. aureus*, reduzindo o crescimento planctônico em um modelo de infecção em zebrafish adulto. Dessa forma, o uso do zebrafish adulto em estudos que envolvam a infecção *in vivo* por micro-

organismos patógenos, serve de modelo viável para a busca de novos agentes terapêuticos com potencial antimicrobiano.²¹

Inúmeros compostos químicos, sintéticos ou de origem natural, têm atividade direta contra várias espécies de bactérias, potencializando a atividade de um antibiótico específico quando associado, revertendo a resistência natural, promovendo a eliminação de plasmídeos e inibindo as funções de transporte da membrana plasmática das bactérias¹⁸ Nesse estudo, o estragol e seu complexo ES/ β -CD ambos apresentaram relevante atividade antibacteriana quando associados com a gentamicina, potencializando a ação da mesma contra a *S. aureus* em zebrafish adulto, e tendo melhores efeitos para o complexo ES/ β -CD (Figura 3-A/B). Isso é devido, os complexos de inclusão em β -ciclodextrina auxiliarem na biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e aumentar a meia-vida biológica das amostras.³¹ Assim, tais propriedades nos propicia a origem de novas oportunidades de formulação de medicamentos com potencial antimicrobiano em pesquisas farmacêuticas.

Conclusão

Nesse estudo, foi confirmado a formação do complexo de inclusão entre estragol e β -ciclodextrina, bem como foi possível estabelecer o modelo de infecção *in vivo* por *S. aureus* em zebrafish adulto durante o período de 24 e 48 h por infecção de inoculo bacteriano. Na atividade antimicrobiana, a administração oral do estragol e seu complexo ES/ β -CD demonstraram efeitos clinicamente relevantes ao inibirem a infecção induzida por *S. aureus* nos zebrafish's adultos, e que quando associados com a gentamicina, foi observado que ambos se mostraram significativos frente a cepa de *S. aureus*, sendo que o complexo ES/ β -CD mostrou-se mais relevante na associação ao antibiótico. Este estudo acresce novas evidências científicas destacando o potencial antimicrobiano das amostras estudadas e, portanto, estudos histopatológicos dos tecidos infectados, bem como estudos comportamentais seriam fundamentais na validação deste efeito farmacológico assegurando o possível uso terapêutico.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Universidade Regional do Cariri. A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Ao Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Ao Laboratório de Simulações e Espectroscopia Molecular (LaSEMol) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Ao Zebrafish Interlab da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Contribuição dos autores

FLAB, JCA, ATLS, JNML, MGLS, MRCO, RHSC, realizaram toda a parte experimental e propuseram o design experimental. BGC e AMRT, participaram do processo de preparação e análise dos complexos de inclusão. FABC, participou do processo de obtenção e translo dos animais para a experimentação. FEAM, IRAM, supervisionaram todo o trabalho.

Referências

1. Da Costa ALP, Silva Junior ACS. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)* 2017;7(2):45.
2. Coutinho HDM, de Morais Oliveira-Tintino CD, Tintino SR, Pereira RLS, de Freitas TS, da Silva MAP, et al. Toxicity against *Drosophila melanogaster* and antiedematogenic and antimicrobial activities of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). *Environ Sci Pollut Res* 2018;25(11):10353–61.
3. da Silva Santos, C.H., Piccoli, R.H., Tebaldi VMR. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2017;76:e1719.
4. De Souza Silva-Comar FM, Wiirzler LAM, Silva-Filho SE, Kummer R, Pedroso RB, Spironello RA, et al. Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. *Evidence-based Complement Altern Med* 2014;2014.
5. Cosentino RM, Norte MCB, Lazarini CA. Estragole-induced behavioural changes in rats. *Phyther Res* 2004;18(11):921–4.
6. Ponte EL, Sousa PL, Rocha MVAP, Soares PMG, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH, et al. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. *Pharmacol Reports* 2012;64(4):984–90.
7. De Morais SM, Catunda FEA, Da Silva ARA, Neto JSM, Rondina D, Leal Cardoso JH. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Quim Nova* 2006;29(5):907–10.
8. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot* 2002;65(10):1545–60.
9. Challal S, Buenafe OEM, Queiroz EF, Maljevic S, Marcourt L, Bock M, et al. Zebrafish bioassay-guided microfractionation identifies anticonvulsant steroid glycosides from the Philippine medicinal plant *Solanum torvum*. *ACS Chem Neurosci* 2014;5(10):993–1004.
10. Curtright A, Rosser M, Goh S, Keown B, Wagner E, Sharifi J, et al. Modeling nociception in zebrafish: A way forward for unbiased analgesic discovery. *PLoS One* 2015;10(1):1–18.
11. Kanungo J, Cuevas E, Ali S, Paule M. Zebrafish

- Model in Drug Safety Assessment. *Curr Pharm Des* 2014;20(34):5416–29.
12. Santoriello C, Zon LI. Science in medicine Hooked ! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* 2012;122(7):2337–43.
 13. MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(10):721–31.
 14. Prajsnar TK, Hamilton R, Garcia-Lara J, Mcvicker G, Williams A, Boots M, et al. A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of staphylococcus aureus in a zebrafish model. *Cell Microbiol* 2012;14(10):1600–19.
 15. Rachmawati H, Edityaningrum CA, Mauludin R. Molecular inclusion complex of curcumin- β -cyclodextrin nanoparticle to enhance Curcumin skin permeability from hydrophilic matrix gel. *AAPS PharmSciTech* 2013;14(4):1303–12.
 16. Skoog, DA, Holler, JF, Crouch S. Principles of Instrumental Analysis. 6^a ed. Bookman: Porto Alegre. 2009.
 17. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CSLI document M07-A10. *Clin Infect Dis* 2015;35(2). www.clsi.org.
 18. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant Escherichia coli by Mentha arvensis L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* 2008;54(4):328–30.
 19. CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa N^o 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diretrizes da Prática de Eutanásia. www.mctic.gov.br/.../concea/.../normativas/RN-37-Eutanasia-secao-1-22_02_18.pdf. 2018;
 20. Neely, MN, Pfeifer, JD, Michael C. Streptococcus-Zebrafish Model of Bacterial Pathogenesis. *Infect Immun* 2002;70(7):3904–14.
 21. Lotha R, Shamprasad BR, Sundaramoorthy NS, Ganapathy R, Nagarajan S, Sivasubramanian A. Zero valent silver nanoparticles capped with capsaicinoids containing Capsicum annum extract, exert potent anti-biofilm effect on food borne pathogen Staphylococcus aureus and curtail planktonic growth on a zebrafish infection model. *Microb Pathog* 2018;124:291–300.
 22. Osei-Safo D, Addae-Mensah I, Garneau FX, Koumaglo HK. A comparative study of the antimicrobial activity of the leaf essential oils of chemo-varieties of Clausena anisata (Willd.) Hook. f. ex Benth. *Ind Crops Prod* 2010;32(3):634–8.
 23. Song YR, Choi MS, Choi GW, Park IK, Oh CS. Antibacterial activity of cinnamaldehyde and estragole extracted from plant essential oils against Pseudomonas syringae pv. Actinidiae causing bacterial canker disease in kiwifruit. *Plant Pathol J* 2016;32(4):363–70.
 24. Naksang P, Tongchitpakdee S, Thumanu K, Oruna-Concha MJ, Niranjana K, Rachtanapun C. Assessment of antimicrobial activity, mode of action and volatile compounds of Etilingera pavieana essential oil. *Molecules* 2020;25(14).
 25. Correia RM, Domingos E, Tosato F, Dos Santos NA, Leite JDA, Da Silva M, et al. Portable near infrared spectroscopy applied to abuse drugs and medicine analyses. *Anal Methods* 2018;10(6):593–603.
 26. Fonseca, L, Rocha, MS, Brito, LCF, Sousa, ES, Reinaldo, FS, Pereira, FMM, Santos, FEP, de Lima S. Artigo Characterization of Inclusion Complex of Croton zehntneri Essential Oil and β -Cyclodextrin Prepared by Spray Drying and Freeze Drying Caracterização do Complexo de Inclusão do Óleo Essencial de Croton zehntneri e β -Ciclodextrina Preparados Atravé. *Rev Virtual Quim* 2019;11(2):529–42.
 27. Siano F, Moccia S, Picariello G, Russo GL, Sorrentino G, Di Stasio M, et al. Comparative study of chemical, biochemical characteristic and ATR-FTIR analysis of seeds, oil and flour of the edible Fedora cultivar hemp (Cannabis sativa L.). *Molecules* 2019;24(1):1–13.
 28. Mei F, Rolain M, Yi Zhou X, Kumar Singh P, Thummel R, Kumar A. Zebrafish are resistant to staphylococcus aureus endophthalmitis. *Pathogens* 2019;8(4).
 29. Siebra ALA, Oliveira LR, Martins AOBPB, Siebra DC, Albuquerque RS, Lemos ICS, et al. Potentiation of antibiotic activity by Passiflora cincinnata Mast. front of strains Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Saudi J Biol Sci* 2018;25(1):37–43.
 30. Zhang QL, Dong ZX, Luo ZW, Jiao YJ, Guo J, Deng XY, et al. MicroRNA profile of immune response in gills of zebrafish (Danio rerio) upon Staphylococcus aureus infection. *Fish Shellfish Immunol* 2019;87(November 2018):307–14.
 31. Crini G, Fourmentinn S, Lichtfouse E. Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis. 2018. 262 p.

Address correspondence to:
 Irwin Rose Alencar de Menezes, PhD
 Regional University of Cariri,
 Department of Biological Chemistry,
 CEP 63100000, Crato,
 Ceará, Brasil.

E-mail: irwinalencar@yahoo.com.br

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nessa pesquisa nos permitiram concluir que:

- OEFOb possui diferentes químiotipos em sua composição, com maiores percentuais para o linalol, estragol e 1,8-cineol com, nessa ordem. Logo, esse rendimento pode ser maior em diferentes períodos de coleta;
- O OEFOb não alterou a atividade locomotora e não causou mortalidade do zebrafish adulto até 96 h de análise ($DL_{50} > 2,5$ mg/mL), e reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido por formalina, cinamaldeído (maior percentual de 82,80 %), capsaicina, glutamato e salina ácida, e esse efeito antinociceptivo do OEFOb foi prevenido pela naloxona, L-NAME, azul de metileno, ketamina, cânfora, vermelho de rutênio e amilorida, bem como também inibiu a nocicepção corneal induzida por salina hipertônica, e este efeito antinociceptivo foi prevenido pela capsazepina;
- OEFOb apresenta potencial farmacológico para o tratamento de dor aguda e esse efeito é modulado pelo sistema opióide e nitrérgico, receptores glutamatérgicos (NMDA) e canais TRP's e ASICs. Esses resultados demonstram o primeiro relato sobre o potencial antinociceptivo do óleo essencial estudado;
- A complexação do complexo ES/ β -CD foi confirmado demonstrando bandas comuns e características do estragol (1511 cm^{-1} e 1238 cm^{-1}), bem como da β -CD (3359 , 2926 , 1153 e 1029 cm^{-1});
- Na avaliação da atividade antimicrobiana, foi possível estabelecer o modelo de infecção *in vivo* por *S. aureus* em ZFa durante o período de 24 e 48 h após a infecção por inóculo bacteriano;
- O estragol e o seu complexo ES/ β -CD ambos demonstraram valores de CIM de $1024\text{ }\mu\text{g/mL}$, frente à cepa S.a. ATCC 25923 no ensaio *in vitro*, já nos ensaios *in vivo*, a administração oral do estragol (P1) e de seu complexo ES/ β -CD (P2) não causou mortalidade dos ZFa até 48 h ($DL_{50} > 1024\text{ }\mu\text{g/mL}$), reduzindo a infecção induzida por S.a. ATCC 25923 nos ZFa, demonstrando efeitos clinicamente relevantes;
- Na verificação do efeito sinérgico, foi observado que estragol e seu complexo ES/ β -CD se mostraram significativos frente a cepa S.a. ATCC 25923, sendo que o complexo ES/ β -CD demonstrou efeito mais relevante quando associado a gentamicina. Esses resultados além de demonstrarem o primeiro relato sobre o potencial antimicrobiano das amostras estudadas, os mesmos foram significativos em relação ao efeito farmacológico.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque, A. A. C., Sorenson, A. L., & Leal-Cardoso, J. (1995). Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *Journal of Ethnopharmacology*, *49*(1), 41–49. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01301-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01301-6)
- Alves, J. E. D. O., Silveira, M. D., Vieira, E. M. P., & Vidal, L. W. de M. (2017). Mecanismos Fisiopatológicos Da Nocicepção E Bases Da Analgesia Perioperatória Em Pequenos Animais. *Acta Biomédica Brasiliensia*, *8*(1), 56. <https://doi.org/10.18571/acbm.122>
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., ... Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, *483*(1–2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, *33*(8), 1582–1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Badal, S., Turfus, S., Rajnarayanan, R., Wilson-Clarke, C., & Sandiford, S. L. (2018). Analysis of natural product regulation of opioid receptors in the treatment of human disease. *Pharmacology and Therapeutics*, *184*(October 2017), 51–80. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.021>
- Bais, H. P., Walker, T. S., Schweizer, H. P., & Vivanco, J. M. (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *40*(11), 983–995. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01460-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01460-2)
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bantis, F., Ouzounis, T., & Radoglou, K. (2016). Artificial LED lighting enhances growth characteristics and total phenolic content of *Ocimum basilicum*, but variably affects transplant success. *Scientia Horticulturae*, *198*, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.014>
- Batista, F. L. A., Lima, L. M. G., Abrante, I. A., de Araújo, J. I. F., Batista, F. L. A., Abrante, I. A., ... Magalhães, F. E. A. (2018). Antinociceptive activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion pathways in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *108*(June), 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.160>
- Bilensoy, E. (2011). *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*. *Cyclodextrins in Pharmaceutics, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications*. <https://doi.org/10.1002/9780470926819>
- Brasil. (2018). Resolução Normativa N° 37, de 15 de Fevereiro de 2018. Dispõe sobre a diretriz da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação

Animal - Conceia. *Diário Oficial Da União*, 36, 1–49.

- Brittijn, S. A., Duivesteyn, S. J., Belmamoune, M., Bertens, L. F. M., Bitter, W., De Bruijn, J. D., ... Richardson, M. K. (2009). Zebrafish development and regeneration: New tools for biomedical research. *International Journal of Developmental Biology*, 53(5–6), 835–850. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082615sb>
- Carleton, R. N., Afifi, T. O., Taillieu, T., Turner, S., El-Gabalawy, R., Sareen, J., & Asmundson, G. J. G. (2018). Anxiety-related psychopathology and chronic pain comorbidity among public safety personnel. *Journal of Anxiety Disorders*, 55(November 2017), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2018.03.006>
- Carvalho, R., de Sonnevile, J., Stockhammer, O. W., Savage, N. D. L., Veneman, W. J., Ottenhoff, T. H. M., ... Spaink, H. P. (2011). A high-throughput screen for tuberculosis progression. *PLoS ONE*, 6(2), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016779>
- Ch, M., Naz, S., Sharif, A., Akram, M., & Saeed, M. (2015). Biological and Pharmacological Properties of the Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). *British Journal of Pharmaceutical Research*, 7(5), 330–339. <https://doi.org/10.9734/bjpr/2015/16505>
- Challal, S., Buenafe, O. E. M., Queiroz, E. F., Maljevic, S., Marcourt, L., Bock, M., ... Crawford, A. D. (2014). Zebrafish bioassay-guided microfractionation identifies anticonvulsant steroid glycosides from the Philippine medicinal plant *Solanum torvum*. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(10), 993–1004. <https://doi.org/10.1021/cn5001342>
- Chilajwar, S. V., Pednekar, P. P., Jadhav, K. R., Gupta, G. J. C., & Kadam, V. J. (2014). Cyclodextrin-based nanosponges: A propitious platform for enhancing drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(1), 111–120. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.865013>
- Coelho-de-Souza, A. N., Barata, E. L., Magalhães, P. J. C., Lima, C. C., & Leal-Cardoso, J. H. (1997). Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. *Phytotherapy Research*, 11(4), 299–304. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199706\)11:4<299::AID-PTR99>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199706)11:4<299::AID-PTR99>3.0.CO;2-A)
- Collymore, C., Rasmussen, S., & Tolwani, R. J. (2013). Gavaging adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, (78), 1–5. <https://doi.org/10.3791/50691>
- Concheiro, A., & Alvarez-Lorenzo, C. (2013). Chemically cross-linked and grafted cyclodextrin hydrogels: From nanostructures to drug-eluting medical devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1188–1203. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.04.015>
- Cook, A. D., Christensen, A. D., Tewari, D., McMahon, S. B., & Hamilton, J. A. (2018). Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. *Trends in Immunology*, 39(3), 240–255. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.12.003>
- Correa, N., Soares, M. C. F., & Muccillo-Baisch, A. L. (2018). Conhecimento do tema plantas medicinais e fitoterápicos como instrumento tecnológico na formação dos acadêmicos de enfermagem. *VITTALLE - Revista de Ciências Da Saúde*, 30(2), 38–46. <https://doi.org/10.14295/vittalle.v30i2.7496>
- Correia, A. D., Cunha, S. R., Scholze, M., & Stevens, E. D. (2011). A novel behavioral fish model of nociception for Testing Analgesics. *Pharmaceuticals*, 4(4), 665–680.

<https://doi.org/10.3390/ph4040665>

- Cortés-Montero, E., Sánchez-Blázquez, P., Onetti, Y., Merlos, M., & Garzón, J. (2019). Ligands exert biased activity to regulate sigma 1 receptor interactions with cationic TRPA1, TRPV1, and TRPM8 channels. *Frontiers in Pharmacology*, *10*(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00634>
- Cosentino, R. M., Norte, M. C. B., & Lazarini, C. A. (2004). Estragole-induced behavioural changes in rats. *Phytotherapy Research*, *18*(11), 921–924. <https://doi.org/10.1002/ptr.1583>
- Coutinho, H. D. M., de Moraes Oliveira-Tintino, C. D., Tintino, S. R., Pereira, R. L. S., de Freitas, T. S., da Silva, M. A. P., ... dos Santos, J. F. S. (2018). Toxicity against *Drosophila melanogaster* and antiedematogenic and antimicrobial activities of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(11), 10353–10361. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9366-x>
- Crawford, A. D., Liekens, S., Kamuhabwa, A. R., Maes, J., Munck, S., Busson, R., ... de Witte, P. A. M. (2011). Zebrafish bioassay-guided natural product discovery: Isolation of angiogenesis inhibitors from East African medicinal plants. *PLoS ONE*, *6*(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014694>
- Crini, G., Fourmentinn, S., & Lichtfouse, E. (2018). *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-76159-6>
- Cui, C., Benard, E. L., Kanwal, Z., Stockhammer, O. W., van der Vaart, M., Zakrzewska, A., ... Meijer, A. H. (2011). *Infectious Disease Modeling and Innate Immune Function in Zebrafish Embryos. Methods in Cell Biology* (Third Edit, Vol. 105). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381320-6.00012-6>
- Curtright, A., Rosser, M., Goh, S., Keown, B., Wagner, E., Sharifi, J., ... Dhaka, A. (2015). Modeling nociception in zebrafish: A way forward for unbiased analgesic discovery. *PLoS ONE*, *10*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116766>
- Da Costa, A. L. P., & Silva Junior, A. C. S. (2017). Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, *7*(2), 45. <https://doi.org/10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57>
- Da Costa, J. G. M., Rodrigues, F. F. G., Angélico, E. C., Pereira, C. K. B., De Souza, E. O., Caldas, G. F. R., ... Dos Santos, P. F. (2008). Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *18*(4), 583–586. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400015>
- Davis, E. E., Frangakis, S., & Katsanis, N. (2014). Interpreting human genetic variation with in vivo zebrafish assays. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(10), 1960–1970. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.024>
- Davis, J. M., Clay, H., Lewis, J. L., Ghori, N., Herbomel, P., & Ramakrishnan, L. (2002). Real-time visualization of Mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*, *17*(6), 693–702. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00475-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00475-2)

- De Morais, S. M., Catunda, F. E. A., Da Silva, A. R. A., Neto, J. S. M., Rondina, D., & Leal Cardoso, J. H. (2006). Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. *Quimica Nova*, 29(5), 907–910. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000500004>
- De Souza Silva-Comar, F. M., Wiirzler, L. A. M., Silva-Filho, S. E., Kummer, R., Pedroso, R. B., Spironello, R. A., ... Cuman, R. K. N. (2014). Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/784689>
- De Vincenzi, M., Silano, M., Maialetti, F., & Scazzocchio, B. (2000). Constituents of aromatic plants: II. Estragole. *Fitoterapia*, 71(6), 725–729. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00153-2)
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- do Nascimento, J. E. T., de Morais, S. M., de Lisboa, D. S., de Oliveira Sousa, M., Santos, S. A. A. R., Magalhães, F. E. A., & Campos, A. R. (2018). The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107(August), 1030–1036. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.089>
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors : the sensors of the pain pathway Find the latest version : Review series Nociceptors : the sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843.3760>
- Ekambaram, S. P., Perumal, S. S., & Pavadai, S. (2017). Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. *Inflammopharmacology*, 25(1), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0303-2>
- Ellett, F., Pase, L., Hayman, J. W., Andrianopoulos, A., & Lieschke, G. J. (2011). Phagocytes, Granulocytes, and Myelopoiesis mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood*, 27(4), e49–e56. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314120.The>
- Ellison, D. L. (2017). Physiology of Pain. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(4), 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.001>
- FERNANDES, B. H. P., & GOMES, C. R. de G. (2011). Anatomic Mechanisms and Aspects of Pain. *Revista Saúde e Pesquisa*, 4(2), 237–246.
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1545–1560. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.10.1545>
- Gaddaguti, V., Venkateswara Rao, T., & Prasada Rao, A. (2016). Potential mosquito repellent compounds of *Ocimum* species against 3N7H and 3Q8I of *Anopheles gambiae*. 3 *Biotech*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0346-x>

- Gebauer, D. L., Pagnussat, N., Piato, Â. L., Schaefer, I. C., Bonan, C. D., & Lara, D. R. (2011). Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *99*(3), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.021>
- Gheno, E. M., Rosemberg, D. B., Souza, D. O., & Calabró, L. (2016). Zebrafish in Brazilian Science: Scientific Production, Impact, and Collaboration. *Zebrafish*, *13*(3), 217–225. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1183>
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., & Yogalakshmi, K. (2013). Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology*, *134*(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.018>
- Gu, Q., & Lee, L. Y. (2010). Acid-Sensing ion channels and pain. *Pharmaceuticals*, *3*(5), 1411–1425. <https://doi.org/10.3390/ph3051411>
- H. Meijer, A., & P. Spaink, H. (2011). Host-Pathogen Interactions Made Transparent with the Zebrafish Model. *Current Drug Targets*, *12*(7), 1000–1017. <https://doi.org/10.2174/138945011795677809>
- Hadian, Z., Maleki, M., Abdi, K., Atyabi, F., Mohammadi, A., & Khaksar, R. (2018). Preparation and characterization of nanoparticle β -Cyclodextrin:Geraniol inclusion complexes. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *17*(1), 39–51. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2018.2153>
- Hamann, F. R., Zago, A. M., Rossato, M. F., Beck, V. R., Mello, C. F., de Brum, T. F., ... Rubin, M. A. (2016). Antinociceptive and antidepressant-like effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *192*, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.045>
- Hassan, M. I., Hammad, K. M., & Saeed, S. M. (2015). Repellent Effect of *Ocimum Basilicum* and *Glycyrrhiza Glabra* Extracts Against the Mosquito Vector, *Culex Pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, *45*(2), 241–248. <https://doi.org/10.12816/0017569>
- Hugo, H., Andrade, N. De, Braga, R. M., & Badr, N. (2020). Antinociceptive Activity of Chemical Components of Essential Oils That Involves Docking Studies : A Review, *11*(May). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00777>
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. P., & Vivanco, J. M. (2002). Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(21), 5878–5883. <https://doi.org/10.1021/jf020487q>
- Jindal, B. A. K., Pandya, M. K., & Khan, M. I. D. (2015). Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Medical Journal Armed Forces India*, *71*(2), 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.04.011>
- Joca, H. C., Cruz-Mendes, Y., Oliveira-Abreu, K., Maia-Joca, R. P. M., Barbosa, R., Lemos, T. L., ... Leal-Cardoso, J. H. (2012). Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels. *Journal of Natural Products*, *75*(9), 1511–1517. <https://doi.org/10.1021/np300050g>

- Kannan, R. R., Iniyan, A. M., & Prakash Vincent, S. G. (2014). Production of a compound against methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA) from streptomyces rubrolavendulae ICN3 & its evaluation in zebrafish embryos. *Indian Journal of Medical Research*, 139(JUN), 913–920.
- Kanungo, J., Cuevas, E., Ali, S., & Paule, M. (2014). Zebrafish Model in Drug Safety Assessment. *Current Pharmaceutical Design*, 20(34), 5416–5429. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205145658>
- Katsuyama, S., Otowa, A., Kamio, S., Sato, K., Yagi, T., Kishikawa, Y., ... Nakamura, H. (2015). Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. *Biomedical Research (Japan)*, 36(1), 47–54. <https://doi.org/10.2220/biomedres.36.47>
- Kfoury, M., Auezova, L., Ruellan, S., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2015). Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 118, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.073>
- Khan, A., Khan, S., & Kim, Y. S. (2019). Insight into Pain Modulation: Nociceptors Sensitization and Therapeutic Targets. *Current Drug Targets*, 20(7), 775–788. <https://doi.org/10.2174/1389450120666190131114244>
- Khosravi, A. R., Sharifzadeh, A., Nikaein, D., Almaie, Z., & Gandomi Nasrabadi, H. (2018). Chemical composition, antioxidant activity and antifungal effects of five Iranian essential oils against Candida strains isolated from urine samples. *Journal de Mycologie Medicale*, 28(2), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.01.005>
- Klaumann, P. R., Wouk, A. F. P. F., & Sillas, T. (2008). Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2013.05.003>
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., & Dubey, N. K. (2010). Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of Ocimum sanctum L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.028>
- Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(1), 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>
- Lamont, L. A., Tranquilli, W. J., & Grimm, K. A. (2000). Physiology of pain. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 30(4), 703–728.
- Leal-Cardoso, J. H., Matos-Brito, B. G., Lopes-Junior, J. E. G., Viana-Cardoso, K. V., Sampaio-Freitas, A. B., Brasil, R. O., ... Albuquerque, A. A. C. (2004). Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(8), 1193–1198. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000800009>
- Leite, G. de, Fernandes, C., de Menezes, I. R., da Costa, J. G., & Campos, A. (2012). Attenuation of visceral nociception by α -bisabolol in mice: investigation of mechanisms. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2(1), 18. <https://doi.org/10.1186/2191-2858-2-18>

- Liakos, I. L., Iordache, F., Carzino, R., Scarpellini, A., Oneto, M., Bianchini, P., ... Holban, A. M. (2018). Cellulose acetate - essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *172*, 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.069>
- LIESCHKE, G., RENSHAW, S., LOYNES, C., TRUSHELL, D., ELWORTHY, S., INGHAM, P., & WHYTE, M. (2006). A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. Commentary. *Blood*, *108*(13), 3976–3979. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024075>.The
- Lopez-Luna, J., Al-Jubouri, Q., Al-Nuaimy, W., & Sneddon, L. U. (2017). Reduction in activity by noxious chemical stimulation is ameliorated by immersion in analgesic drugs in zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, *220*(8), 1451–1458. <https://doi.org/10.1242/jeb.146969>
- Lotha, R., Shamprasad, B. R., Sundaramoorthy, N. S., Ganapathy, R., Nagarajan, S., & Sivasubramanian, A. (2018). Zero valent silver nanoparticles capped with capsaicinoids containing Capsicum annum extract, exert potent anti-biofilm effect on food borne pathogen Staphylococcus aureus and curtail planktonic growth on a zebrafish infection model. *Microbial Pathogenesis*, *124*(August), 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.053>
- MacRae, C. A., & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *14*(10), 721–731. <https://doi.org/10.1038/nrd4627>
- Magalhães, Francisco Ernani A., Batista, F. L. A., Serpa, O. F., Moura, L. F. W. G., Lima, M. da C. L., da Silva, A. R. A., ... Campos, A. R. (2018). Orofacial antinociceptive effect of Mimosa tenuiflora (Willd.) Poiret. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *97*(November 2017), 1575–1585. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.001>
- Magalhães, Francisco Ernani Alves, Batista, F. L. A., Lima, L. M. G., Abrante, I. D. A., Batista, F. L. A., Abrante, I. D. A., ... Campos, A. R. (2018). Adult Zebrafish (Danio rerio) As a Model for the Study of Corneal Antinociceptive Compounds. *Zebrafish*, *15*(6), 566–574. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1633>
- Magalhães, Francisco Ernani Alves, De Sousa, C. Á. P. B., Santos, S. A. A. R., Menezes, R. B., Batista, F. L. A., Abreu, Â. O., ... Campos, A. R. (2017). Adult Zebrafish (Danio rerio): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish*, *14*(5), 422–429. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1436>
- Mahady, G. B., Huang, Y., Doyle, B. J., & Locklear, T. (2008). Natural products as antibacterial agents. *Studies in Natural Products Chemistry*, *35*(C), 423–444. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80011-7](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80011-7)
- Malafoglia, V., Bryant, B., Raffaelli, W., Giordano, A., & Bellipanni, G. (2013). The zebrafish as a model for nociception studies. *Journal of Cellular Physiology*, *228*(10), 1956–1966. <https://doi.org/10.1002/jcp.24379>
- Malafoglia, V., Colasanti, M., Raffaelli, W., Balciunas, D., Giordano, A., & Bellipanni, G. (2014). Extreme thermal noxious stimuli induce pain responses in zebrafish larvae. *Journal of Cellular Physiology*, *229*(3), 300–308. <https://doi.org/10.1002/jcp.24447>
- Mantzourani, I., Panopoulou, M., Theodoridou, I., Tsirogiannis, I., Papaemmanouil, V.,

- Johnson, B., ... Bezirtzoglou, E. (2015). Comparative Antimicrobial Susceptibility Profiling of Tigecycline and Other Antibiotics against Clinical and Environmental Isolates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4(4), 384–396. Retrieved from <http://www.ijcmas.com>
- Marchand, S. (2008). The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 34(2), 285–309.
- Marone, I. M., De Logu, F., Nassini, R., De Carvalho Goncalves, M., Benemei, S., Ferreira, J., ... Materazzi, S. (2018). TRPA1/NOX in the soma of trigeminal ganglion neurons mediates migraine-related pain of glyceryl trinitrate in mice. *Brain*, 141(8), 2312–2328. <https://doi.org/10.1093/brain/awy177>
- McCormick, T., & Law, S. (2016). Assessment of acute and chronic pain. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 17(9), 421–424. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2016.06.007>
- Melo Júnior, J. de M. de A. de, Damasceno, M. de B. M. V., Santos, S. A. A. R., Barbosa, T. M., Araújo, J. R. C., Vieira-Neto, A. E., ... Campos, A. R. (2017). Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. *Inflammopharmacology*, 25(2), 247–254. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0324-5>
- Melody N. Neely, J. D. P. and M. C. (2002). Streptococcus-Zebrafish Model of Bacterial Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 70(7), 3904–3914. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3904>
- Menezes, P. P., Serafini, M. R., Santana, B. V., Nunes, R. S., Quintans, L. J., Silva, G. F., ... Araújo, A. A. S. (2012). Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. *Thermochimica Acta*, 548, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2012.08.023>
- Nakayama, J., & Makinoshima, H. (2020). Zebrafish-Based Screening Models for the Identification of Anti-Metastatic Drugs. *Molecules*, (Figure 1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules25102407>
- Ngankeu Pagning, A. L., Tamokou, J. D. D., Lateef, M., Tapondjou, L. A., Kuate, J. R., Ngnokam, D., & Ali, M. S. (2016). New triterpene and new flavone glucoside from *Rhynchospora corymbosa* (Cyperaceae) with their antimicrobial, tyrosinase and butyrylcholinesterase inhibitory activities. *Phytochemistry Letters*, 16, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.03.011>
- Nguyen, P. M., & Niemeyer, E. D. (2008). Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8685–8691. <https://doi.org/10.1021/jf801485u>
- Ning, J., Lousse, J., Spenkeliink, B., Wesseling, S., & Rietjens, I. M. C. M. (2017). Study on inter-ethnic human differences in bioactivation and detoxification of estragole using physiologically based kinetic modeling. *Archives of Toxicology*, 91(9), 3093–3108. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1941-x>
- Okazaki, K., Nakayama, S., Kawazoe, K., & Takaishi, Y. (1998). Antiaggregant effects on human platelets of culinary herbs. *Phytotherapy Research*, 12(8), 603–605. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199812\)12:8<603::AID-PTR372>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199812)12:8<603::AID-PTR372>3.0.CO;2-G)
- Okeke, I. N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z. A., Duse, A. G., Jenkins, P., Brien, T. F. O., &

- Pablos-mendez, A. (2005). AMR Resistance in developing countries p1. *Lancet Infect Dis*, 5(August), 481–493. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70189-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70189-4)
- Oxenham, S. K., Svoboda, K. P., & Walters, D. R. (2005). Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology*, 153(3), 174–180. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00952.x>
- Pan, Z., Wang, Z., Yang, H., Zhang, F., & Reinach, P. S. (2011). TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(1), 485–493. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5801>
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Cyclodextrin-based hydrogels toward improved wound dressings. *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(4), 328–337. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.794413>
- Piras, A., Gonçalves, M. J., Alves, J., Falconieri, D., Porcedda, S., Maxia, A., & Salgueiro, L. (2018). *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils. *Industrial Crops and Products*, 113(October 2017), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.024>
- Ponte, E. L., Sousa, P. L., Rocha, M. V. A. P., Soares, P. M. G., Coelho-de-Souza, A. N., Leal-Cardoso, J. H., & Assreuy, A. M. S. (2012). Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. *Pharmacological Reports*, 64(4), 984–990. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70895-2](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70895-2)
- Prajsnar, T. K., Cunliffe, V. T., Foster, S. J., & Renshaw, S. A. (2008). A novel vertebrate model of *Staphylococcus aureus* infection reveals phagocyte-dependent resistance of zebrafish to non-host specialized pathogens. *Cellular Microbiology*, 10(11), 2312–2325. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01213.x>
- Prajsnar, T. K., Hamilton, R., Garcia-Lara, J., Mcvicker, G., Williams, A., Boots, M., ... Renshaw, S. A. (2012). A privileged intraphagocyte niche is responsible for disseminated infection of *staphylococcus aureus* in a zebrafish model. *Cellular Microbiology*, 14(10), 1600–1619. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01826.x>
- Purushothaman, B., Prasannasrinivasan, R., Suganthi, P., Ranganathan, B., Gimbut, J., & Shanmugam, K. (2018). A comprehensive review on *Ocimum basilicum*. *Journal of Natural Remedies*, 18(3), 71–85. <https://doi.org/10.18311/jnr/2018/21324>
- Rachmawati, H., Edityaningrum, C. A., & Mauludin, R. (2013). Molecular inclusion complex of curcumin- β -cyclodextrin nanoparticle to enhance Curcumin skin permeability from hydrophilic matrix gel. *AAPS PharmSciTech*, 14(4), 1303–1312. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0023-5>
- Radulović, N. S., Blagojević, P. D., & Miltojević, A. B. (2013). α -Linalool - a marker compound of forged/synthetic sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3292–3303. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6175>
- Rash, J. A., Poulin, P. A., Shergill, Y., Romanow, H., Freeman, J., Taljaard, M., ... Smyth, C. E. (2018). Chronic Pain in the Emergency Department: A Pilot Interdisciplinary Program Demonstrates Improvements in Disability, Psychosocial Function, and Healthcare

Utilization. *Pain Research and Management*, 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/1875967>

- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., de Melo, N. R., dos Santos, F. R., de Araújo Neves, I., de Carvalho, M. G., & Sanches-Silva, A. (2017). Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging. *Industrial Crops and Products*, 97, 201–210.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., de Melo, N. R., dos Santos, F. R., Neves, I. de A., de Carvalho, M. G., & Sanches-Silva, A. (2017). Biological activities and major components determination in essential oils intended for a biodegradable food packaging. *Industrial Crops and Products*, 97, 201–210.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.006>
- Rocha, A. P. C., Kraychete, D. C., Lemonica, L., Carvalho, L. R. de, Barros, G. A. M. de, Garcia, J. B. dos S., & Sakata, R. K. (2007). Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 57(1), 94–105.
<https://doi.org/10.1590/S0034-70942007000100011>
- Rodrigues, L. B., Martins, A. O. B. P. B., Ribeiro-Filho, J., Cesário, F. R. A. S., e Castro, F. F., de Albuquerque, T. R., ... de Menezes, I. R. A. (2017). Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with β -cyclodextrin (β -CD) in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 836–846.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.027>
- Rodrigues, L. B., Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins, A., Cesário, F. R. A. S., Ferreira e Castro, F., de Albuquerque, T. R., Martins Fernandes, M. N., ... Alencar de Menezes, I. R. (2016). Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the *Ocimum basilicum* essential oil and its main compound estragole: In vivo mouse models. *Chemico-Biological Interactions*, 257, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.026>
- Roldán, L. P., Díaz, G. J., & Düringer, J. M. (2010). Composición y actividad antibacteriana de aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia Lamiaceae contra bacterias patógenas y benéficas. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(4), 451–461. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79955416898&partnerID=tZOtx3y1>
- Saldanha, A. A., Vieira, L., Ribeiro, R. I. M. de A., Thomé, R. G., Santos, H. B. dos, Silva, D. B., ... Soares, A. C. (2019). Chemical composition and evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: Effect on edema, leukocyte recruitment, tumor necrosis factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioid. *Journal of Ethnopharmacology*, 231, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.017>
- Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Science in medicine Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2337–2343.
<https://doi.org/10.1172/JCI60434.combines>
- Schaible, H.-G., Schmelz, M., & Tegeder, I. (2006). Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(2), 323–342.
- Semestral RESBCAL São Paulo, P. (2016). RESBCAL REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO Volume 4-Número

2-2016 São Paulo-SP, 4, 85–154. Retrieved from www.poloprinter.com.br

- Sharma, N., & Baldi, A. (2016). Exploring versatile applications of cyclodextrins: An overview. *Drug Delivery*, 23(3), 739–757. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.938839>
- Siebra, A. L. A., Oliveira, L. R., Martins, A. O. B. P. B., Siebra, D. C., Albuquerque, R. S., Lemos, I. C. S., ... Kerntopf, M. R. (2018). Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.019>
- Silva, J. C., Raquel, S., Lima, G. De, Gonçalves, R., Júnior, D. O., & Guedes, R. (2013). Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais : uma revisão. *Rev. Bras. Farm*, 94(1), 18–23.
- Silva, V. A., Da Sousa, J. P., De Luna Freire Pessôa, H., De Freitas, A. F. R., Coutinho, H. D. M., Alves, L. B. N., & Lima, E. O. (2016). *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Pharmaceutical Biology*, 54(5), 863–867. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1088551>
- Simoës, S., Veiga, F., Torres-Labandeira, J., Ribeiro, A., Concheiro, A., & Alvarez-Lorenzo, C. (2014). Syringeable Self-Assembled Cyclodextrin Gels for Drug Delivery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(4), 494–509. <https://doi.org/10.2174/1568026613666131219124308>
- Snoussi, M., Dehmani, A., Noumi, E., Flamini, G., & Papetti, A. (2016). Chemical composition and antibiofilm activity of *Petroselinum crispum* and *Ocimum basilicum* essential oils against *Vibrio* spp. strains. *Microbial Pathogenesis*, 90, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.004>
- Soares, I. C. R., Santos, S. A. A. R., Coelho, R. F., Alves, Y. A., Vieira-Neto, A. E., Tavares, K. C. S., ... Campos, A. R. (2019). Oleanolic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors. *Chemico-Biological Interactions*, 299, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.018>
- Soares, P. M. G., Lima, R. F., de Freitas Pires, A., Souza, E. P., Assreuy, A. M. S., & Criddle, D. N. (2007). Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. *Life Sciences*, 81(13), 1085–1093. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.08.027>
- Souto-Maior, F. N., Da Fonsêca, D. V., Salgado, P. R. R., Monte, L. de O., De Sousa, D. P., & De Almeida, R. N. (2017). Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpene linalool oxide. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 63–67. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1228682>
- Souza, G. R., Silva, J. C., de Oliveira Júnior, R. G., de Lima-Saraiva, S. R. G., Guimarães, A. L., de Oliveira, A. P., & da Silva Almeida, J. R. G. (2015). Atividade antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, 36(1), 137–142.
- Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. *Trends in*

Neurosciences, 37(5), 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>

- Świeboda, P., Filip, R., Prystupa, A., & Drozd, M. (2013). Assessment of pain: types, mechanism and treatment. *Pain*, 2(7).
- Tagousop, C. N., Tamokou, J. D. D., Ekom, S. E., Ngnokam, D., & Voutquenne-Nazabadioko, L. (2018). Antimicrobial activities of flavonoid glycosides from *Graptophyllum grandulosum* and their mechanism of antibacterial action. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2321-7>
- Tatsimo, S. J. N., Tamokou, J. D. D., Lamshöft, M., Mouafo, F. T., Lannang, A. M., Sarkar, P., ... Spiteller, M. (2015). LC-MS guided isolation of antibacterial and cytotoxic constituents from *Clausena anisata*. *Medicinal Chemistry Research*, 24(4), 1468–1479. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1233-4>
- Taylor, J. C., Dewberry, L. S., Totsch, S. K., Yessick, L. R., DeBerry, J. J., Watts, S. A., & Sorge, R. E. (2017). A novel zebrafish-based model of nociception. *Physiology and Behavior*, 174, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.009>
- Tebou, P. L. F., Tamokou, J. D. D., Ngnokam, D., Voutquenne-Nazabadioko, L., Kuate, J. R., & Bag, P. K. (2017). Flavonoids from *Maytenus buchananii* as potential cholera chemotherapeutic agents. *South African Journal of Botany*, 109, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.019>
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587–595.
- Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., ... Wang, S. J. (2019). Chronic pain as a symptom or a disease: The IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*, 160(1), 19–27. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>
- van der Sar, A. M., Musters, R. J. P., van Eeden, F. J. M., Appelmelk, B. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Bitter, W. (2003). Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections. *Cellular Microbiology*, 5(9), 601–611. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00303.x>
- Van Soest, J. J., Stockhammer, O. W., Ordas, A., Bloemberg, G. V., Spink, H. P., & Meijer, A. H. (2011). Comparison of static immersion and intravenous injection systems for exposure of zebrafish embryos to the natural pathogen *Edwardsiella tarda*. *BMC Immunology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-58>
- Vergunst, A. C., Meijer, A. H., Renshaw, S. A., & O’Callaghan, D. (2010). *Burkholderia cenocepacia* creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. *Infection and Immunity*, 78(4), 1495–1508. <https://doi.org/10.1128/IAI.00743-09>
- Waleczek, K. J., Cabral Marques, H. M., Hempel, B., & Schmidt, P. C. (2003). Phase solubility studies of pure (-)- α -bisabolol and camomile essential oil with β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(2), 247–251. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00166-2](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00166-2)

- Wang, X., Yuan, Y., & Yue, T. (2015). The application of starch-based ingredients in flavor encapsulation. *Starch/Staerke*, 67(3–4), 225–236. <https://doi.org/10.1002/star.201400163>
- Wright, G. D. (2003). Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5), 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.004>
- Yamamoto, C., Neoh, T. L., Honbou, H., Furuta, T., Kimura, S., & Yoshii, H. (2012). Formation of a Polymer-Coated Inclusion Complex of D-Limonene and β -Cyclodextrin by Spray Drying. *Drying Technology*, 30(15), 1714–1719. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.699487>
- Yang, Z., Yao, X., Xiao, Z., Chen, H., & Ji, H. (2016). Preparation and release behaviour of the inclusion complexes of phenylethanol with β -cyclodextrin. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(3), 206–216. <https://doi.org/10.1002/ffj.3302>
- Zeng, W. Z., Liu, D. S., & Xu, T. Le. (2014). Acid-sensing ion channels: Trafficking and pathophysiology. *Channels*, 8(6), 481–487. <https://doi.org/10.4161/19336950.2014.958382>
- Zhang, J. W., Li, S. K., & Wu, W. J. (2009). The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. *Molecules*, 14(1), 273–278. <https://doi.org/10.3390/molecules14010273>
- Zhu, Y. J., & Lu, T. J. (2010). A multi-scale view of skin thermal pain: from nociception to pain sensation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1912), 521–559.

ANEXO A - Documento de identificação da espécie, emitido pelo Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri (URCA)



Herbário Caririense Dárdano de Andrade – Lima
Universidade Regional do Cariri - URCA

Número de Herbário

Remetente: N° 23.2014


HERBÁRIO CARIRIENSE DÁRDANO DE ANDRADE-LIMA (HCDAL/URCA)
Contato: Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva (herbario@urca.br)
Universidade Regional do Cariri - URCA
Departamento de Ciências Biológicas
Rua: Cel. Antonio Luiz, 1161
Campus Pimenta
Crato – Ceará - Brasil
CEP: 63.105-100

Destinatário: Data: 13.08.2014

Laboratório de Farmacologia e Química Molecular
Contato: Lindaiane Rodrigues e Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Universidade Regional do Cariri (URCA)

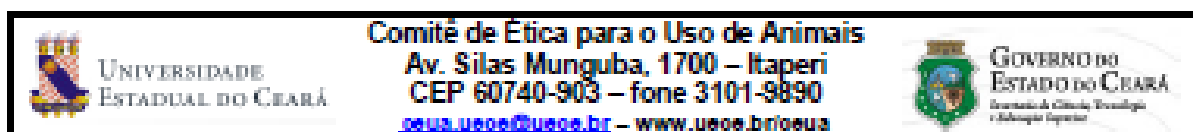
N° Amostras: 01 Tipo de Operação: Número de Herbário

	N° HERBÁRIO	NOME POPULAR	FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO	RESPONSÁVEL
01	10.736	Manjeriçã	Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Tiago Rodrigues Leite


Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva
Curadora do HCDAL

Recebido: Lindaiane Bezerra Rodrigues
26/08/2014

ANEXO B - Declaração da Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) – Manuscrito 1



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa Intitulado "USO DO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTINOCICEPTIVO, ANSIOLÍTICO E ANTICONVULSIVANTE DE PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE BRASILEIRO" registrado sob o número 7210149/2016, tendo como pesquisador principal Francisco Ernani Alves Magalhães, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE), tendo sido aprovado em 16 de dezembro de 2016. Este certificado expira-se em 16 de dezembro de 2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled "USO DO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, ANTINOCICEPTIVO, ANSIOLÍTICO E ANTICONVULSIVANTE DE PLANTAS MEDICINAIS DO NORDESTE BRASILEIRO" registered with the protocol 7210149/2016, under the supervision of Francisco Ernani Alves Magalhães is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire in december 16, 2020.

RESUMO

Vigência do projeto	01/01/2017 a 16/12/2020
Espécie/linhagem	Zebrafish (Danio rerio)
Número de animais	500
Peso/idade	0,3 a 0,6 gr/ três meses
Sexo	250 Machos e 250 Fêmeas
Origem	Obtidos de um fornecedor comercial de Fortaleza

Fortaleza, 18 de janeiro de 2017.

Maria Erivalda Farias de Aragão
Presidente CEUA-UECE

ANEXO C - Declaração da Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da
Universidade Regional do Cariri (URCA) – Manuscrito 2

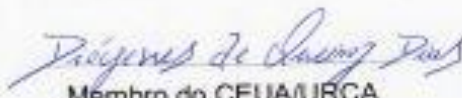


UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil
proppg@urca.br - www.urca.br/ceua



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado "Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do estragol e do seu complexo em β -ciclodextrina em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto", Processo N° 00225/2018.2, foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA.


Membro do CEUA/URCA
(Portaria nº 120/2018-GR)

CRATO-CE
2018