

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IGOR VICTOR FERREIRA DOS SANTOS

ESTUDO DA TOXICIDADE DA FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE
LEITE DE JANAGUBA (*Himatanthus drasticus*, Plumel 1990) EM MODELO
DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*, Hamilton 1822)

MACAPÁ

2016

IGOR VICTOR FERREIRA DOS SANTOS

**ESTUDO DA TOXICIDADE DA FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE
LEITE DE JANAGUBA (*Himatanthus drasticus*, Plumel 1990) EM MODELO
DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*, Hamilton 1822)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal
do Amapá-UNIFAP, na área de
concentração em Biologia Farmacêutica
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Tit. José Carlos Tavares
Carvalho.

Macapá

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.1

S237e Santos, Igor Victor Ferreira dos.

Estudo da toxicidade da fitopreparação popular a base de leite de janaguba (*Himatanthus drasticus*, Plumel 1990) em modelo de Zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822) / Igor Victor Ferreira dos Santos; orientador, José Carlos Tavares Carvalho. – Macapá, 2016.
114 f.

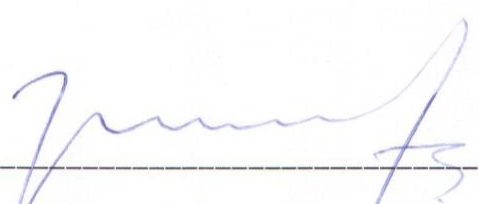
Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

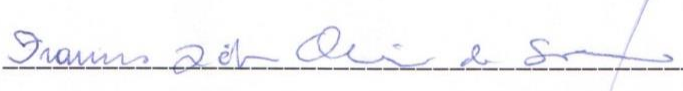
IGOR VICTOR FERREIRA DOS SANTOS

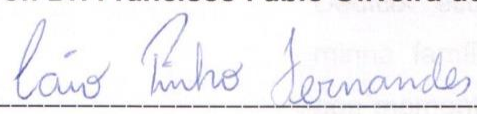
**ESTUDO DA TOXICIDADE DA FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE
LEITE DE JANAGUBA (*Himatanthus drasticus*, Plumel 1990) EM MODELO
DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*, Hamilton 1822)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, na área de concentração em Biologia Farmacêutica, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data de aprovação: 15 / 01 / 2016


Orientador: Prof.º Tit. José Carlos Tavares Carvalho


Prof. Dr. Francisco Fabio Oliveira de Sousa


Prof. Dr. Caio Pinho Fernandes

Dedico esta dissertação a toda
minha família, por ter me apoiado
nos momentos mais difíceis durante
esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido o dom da vida e ter me iluminado em todas as escolhas até hoje.

À minha família, por todo incentivo, apoio e compreensão durante este período.

À Universidade Federal do Amapá, pelo ótimo Programa de Ciências Farmacêuticas.

Ao meu orientador. Prof. Tit. José Carlos Tavares de Carvalho por toda amizade, incentivo e é “claro puxões de orelha” para que pudesse me tornar um pós-graduando melhor.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro aos projetos.

A toda equipe do laboratório de pesquisa em fármacos, pela amizade e apoio nos momentos em que precisei.

À Gisele Custódio pelo apoio nas análises histológicas.

Aos colegas da turma de 2014 do PPGCF.

Aos professores do PPGCF, pelas excelentes disciplinas ministradas.

A técnica do laboratório Adriana Maciel pelo auxílio e paciência na operação do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização deste trabalho.

*“O senhor é o meu pastor, nada me
faltará.” Salmo 23:1- Bíblia Sagrada*

RESUMO

A fitopreparação popular a base de leite de janaguba (*Himatanthus drasticus*) (FPLJ) é utilizada no nordeste brasileiro para o tratamento de câncer de pulmão, câncer linfático, vermes intestinais, febre e úlceras gástricas. Entretanto, poucos estudos suportam o uso desta fitopreparação para tais fins. No que se refere a estudos toxicológicos nenhuma investigação foi realizada. Os estudos toxicológicos, tradicionalmente utilizam modelos murinos, porém a crescente pressão dos grupos de defesa dos animais, comitês de ética e elevado custo tem dificultado o uso destes animais. Sendo assim, novos modelos animais vêm sendo empregados nestes estudos, um deles é o zebrafish (*Danio rerio*). Portanto, o objetivo deste trabalho, foi estudar a toxicidade aguda da FPLJ sobre modelo de zebrafish. Foram determinadas: a) concentração letal para 50% (CL₅₀); b) os efeitos sobre o comportamento; c) os efeitos da administração aguda da FPLJ (48 horas) nas concentrações (500, 750, 1000 e 1500 µg/mL), sobre os parâmetros histopatológicos das brânquias, rins e fígado. A CL₅₀ da FPLJ foi de 1188,54 µg/mL, sendo que as concentrações de 500 e 750 µg/mL não provocaram mortes. O comportamento foi afetado em maior escala pelas duas maiores concentrações da FPLJ. As concentrações de 1000 e 1500 µg/mL, provocaram maiores danos ao tecido branquial, porém nenhuma concentração foi capaz de ocasionar danos segundo o valor médio de alteração (VMA). No fígado as concentrações de 1000 e 1500 µg/mL, causaram alto índice de alterações histológicas, com VMA compatível com alterações de leve a moderadas. Os rins apresentaram maiores alterações significativas com os tratamentos nas concentrações de 750, 1000 e 1500 µg/mL, tendo VMA indicando alterações de leve a moderadas nestas concentrações. A partir desses resultados e com base no conteúdo de sólidos da FPLJ que foi de 1,85%, a CL₅₀ equivale a dose de 475 mg/kg. De acordo com a indicação popular, que é de 6 colheres de sopa/dia, é possível inferir que apenas 0,5 gramas de principio ativo são ingeridas por um usuário adulto por dia, correspondendo a dose de 7,14 mg/kg, sendo muito distante da dose letal, e das doses que produziram lesões histopatológicas, sugerindo a baixa toxicidade da FPLJ.

Palavras-chave: *Danio rerio*, modelo zebrafish, *Himatanthus drasticus*, toxicidade, histopatologia.

ABSTRACT

“Leite de Janaguba” (*Himatanthus drasticus*) (FPLJ) is a popular fitopreparation used in northeastern Brazil to treatment of lung cancer, lymphatic cancer, intestinal worms, fever, and stomach ulcers. However, few studies support the use of this fitopreparation. Despite this use no toxicological studies was performed. Toxicological studies, traditionally use murine models, but the increasing pressure from animal rights groups, ethics committees and high cost has hindered the use of these animals. Thus, new animal models have been used in these studies, one of them is the zebrafish (*Danio rerio*). Therefore, the aim of this work was to study the acute toxicity of FPLJ on zebrafish model. Were determined: a) lethal concentration to 50% (LC50); b) the effects on behavior; c) the effects of acute administration of FPLJ (48 hours) in the concentrations (500, 750, 1000 and 1500 ug / ml) on the histopathological parameters of the gills, kidneys and liver. The LC50 FPLJ was 1188.54 mg / ml, with concentrations of 500 and 750 ug / ml did not cause death. The behavior was affected on a larger scale by the two largest concentrations of FPLJ. The concentrations of 1000 and 1500 mg / ml, caused major damage to the gill tissue, but neither concentration was capable of causing damage in the median value change (VMA). In Liver concentrations of 1000 and 1500 mg /ml caused high rate of histological changes, with VMA compatible with mild to moderate changes. The kidneys showed higher significant alterations at concentrations of 750, 1000 and 1500 mg / mL, and VMA indicated mild to moderate changes in these concentrations. From these results and based on the content of solids FPLJ which was 1.85%, the LC50 is equivalent to a dose of 475 mg / kg. According to the popular statement, which is 6 tablespoons / day, it can be inferred that only 0.5 grams of active ingredient are ingested by an adult per day, corresponding to a dose of 7.14 mg / kg, far from lethal dose, and the doses that produced histopathological lesions, suggesting low toxicity FPLJ

Keywords: *Danio rerio*, *Himatanthus drasticus*, toxicity, histopathology, zebrafish model.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 TOXICIDADE EM MODELO DE ZEBRAFISH E SEU USO NA DESCOBERTA DE NOVAS DROGAS.....	15
3.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE EFEITOS TÓXICOS EM <i>D.rerio</i> ...	17
3.2.1 Brânquias.....	18
3.2.2 Fígado.....	20
3.2.3 Rim.....	23
3.3 USO DE ZF (DANIO RERIO) EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS COM PRODUTOS NATURAIS.	26
3.3.1 Produtos naturais e suas perspectivas.....	26
3.4 VANTAGEM DO ZF COMO ORGANISMO MODELO.....	28
3.5 AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZANDO O ZF COMO MODELO EXPERIMENTAL	31
3.6 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS E COMPONENTES ISOLADOS DE PLANTAS UTILIZANDO ZF COMO MODELO EXPERIMENTAL	33
3.6.1 Avaliação da atividade angiogênica em modelo de ZF.....	33
3.6.2 Avaliação da atividade antitrombótica em modelos de ZF.....	34
3.6.3 Atividade Anticonvulsivante em modelos de ZF	34
3.6.4 Atividade anti-inflamatória em modelos de ZF	35
3.6.5 Atividade antilipêmica em modelos de ZF	36
3.6.6 Atividade Melanogênica em modelos de ZF	36
3.6.7 Estudos toxicológicos de produtos naturais em modelos de ZF	37
3.6.8 Estudos relacionados a doenças neurodegenerativas em modelo de ZF.....	38
3.7 FAMÍLIA APOCYNACEAE	39
3.8 Gênero <i>Himatanthus</i>	40
3.9 <i>Himatanthus drasticus</i> (Plumel, 1990).....	41
3.10 GÊNERO <i>Himatanthus</i> - CONSTITUINTES FITOQUÍMICOS E AÇÕES FARMACOLÓGICAS.....	42

3.10.1 <i>Himatanthus articulatus</i> (Woodson, 1937)	43
3.10.2 <i>Himatanthus bracteatus</i> (Woodson, 1937)	44
3.10.3 <i>Himatanthus fallax</i> (Plumel,1990)	45
3.10.4 <i>Himatanthus lancifolius</i> (Woodson,1937)	45
3.10.5 <i>Himatanthus obovatus</i> (Woodson,1937)	46
3.10.6 <i>Himatanthus phagedaenicus</i> (Woodson,1937)	47
3.10.7 <i>Himatanthus sucuuba</i> (Woodson,1937)	47
3.10.8 <i>Himatanthus drasticus</i> (Plumel,1990).....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 OBTENÇÃO E CONTÉUDO DE SÓLIDOS DA FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE LEITE DE JANAGUBA (<i>H. drasticus</i>).....	50
4.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	50
4.2.1 Animais experimentais	50
4.2.2 Avaliação dos parâmetros comportamentais de <i>D. rerio</i> sob tratamento com FPLJ.....	50
4.2.3 Determinação da CL ₅₀	51
4.2.4 Avaliação dos parâmetros comportamentais	52
4.2.5 Monitoramento da mortalidade	52
4.2.6 Avaliação dos parâmetros histopatológicos	53
4.2.7 Método de análise do material preparado.....	55
4.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 CONTÉUDO DE SÓLIDOS DA FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE LEITE DE JANAGUBA	62
5.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE <i>D. rerio</i> SOB TRATAMENTO COM FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE LEITE DE JANAGUBA.....	62
5.3 DETERMINAÇÃO DA CL ₅₀	65
5.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS	67
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de grandes proporções seus 8,5 milhões de km² ocupam quase metade da América do Sul e possui diversas zonas climáticas- como o trópico úmido no norte, o semiárido no nordeste e áreas temperadas no sul. Evidentemente, estas diferenças climáticas levam a grandes variações ecológicas, formando zonas biogeográficas ou biomas distintos, que possuem espécies vegetais muito diversificadas.

A medicina popular no Brasil é beneficiada com esta grande diversidade natural. Sendo assim, em todas as regiões do país existem inúmeras formas de tratar as mais diversas patologias, utilizando produtos vegetais. O uso dessa fonte se baseia no conhecimento popular. No nordeste e também no norte, por exemplo, a fitopreparação popular a base de leite de Janaguba (*Himatanthus drasticus*, Plumel 1990) (FPLJ), ou simplesmente leite de Janaguba, é um exemplo de produto natural utilizado pela medicina popular.

A maioria dos produtos naturais usados na medicina popular carece de investigações que possam esclarecer seu mecanismo de ação e assegurar o seu uso. A FPLJ não possui estudos toxicológicos que possam mensurar seus possíveis danos à saúde humana.

Os estudos biomédicos, principalmente voltados à toxicologia, atualmente buscam diminuir o número de animais de laboratório em especial mamíferos (ratos e camundongos). Esta tendência vem sendo adotada devido a grande pressão dos comitês de ética e de órgãos de proteção de animais, que cada vez mais restringem o uso de mamíferos.

A busca por modelos experimentais mais baratos, rápidos e de alta eficiência estatística, também estimulam a procura por outros animais que possam servir de modelo. A mosca *Drosophila melanogaster* já foi utilizada como modelo experimental alternativo, porém mostra-se distante geneticamente dos mamíferos. Entretanto, o zebrafish (ZF) é o exemplo mais notável de modelo experimental alternativo de grande sucesso.

O ZF então vem sendo adotado como modelo experimental para a redução do uso de mamíferos. Este peixe possui larga utilização pela comunidade científica, tendo grande número de artigos citando-o anualmente. Além disso, diversas características relacionadas ao seu ciclo de vida,

reprodução, semelhança genética aos humanos, e o custo barato de manutenção, estimulam o uso do ZF como modelo experimental.

Apesar das diversas vantagens do modelo ZF este também possui desvantagens. Uma delas é que os testes realizados em ZF necessitam de experimentos adicionais em outros modelos para ser diretamente correlacionados aos seres humanos.

A partir dessas considerações propôs-se pesquisar o seguinte problema: A utilização de diferentes concentrações da FPLJ promovem toxicidade aguda em *D. rerio*? Neste contexto foi possível formular as seguintes hipóteses: H_0 : As diferentes concentrações da FPLJ não são capazes de provocar efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda (48 horas) em *D. rerio*. H_1 : As diferentes concentrações da FPLJ são capazes de provocar efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda (48 horas) em *D. rerio*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o possível efeito toxicológico agudo da FPLJ sobre *D. rerio*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a concentração letal (CL₅₀)
- ✓ Avaliar os efeitos da administração aguda das diferentes concentrações da FPLJ sobre os parâmetros comportamentais, e observação da mortalidade de *D. rerio* de ambos os sexos;
- ✓ Avaliar os efeitos da administração aguda (48 horas) das diferentes concentrações da FPLJ sobre os parâmetros histopatológicos, brânquias, fígado e rins, de *D. rerio* de ambos os sexos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 TOXICIDADE EM MODELO DE ZEBRAFISH E SEU USO NA DESCOBERTA DE NOVAS DROGAS

O termo toxicidade refere-se à capacidade da substância química, produto, conjunto ou medicamento, possui de provocar efeitos danosos ao organismo com os quais entra em contato. Estes efeitos podem ser desde alterações comportamentais, danos em órgãos específicos (rins, fígado e coração), alterações no crescimento ou reprodução.

Segundo Oga (2003) a toxicidade é a propriedade de agentes tóxicos de promoverem injúrias, por meio de interações físico-químicas. Além disso, o autor afirma que a toxicidade raramente pode ser entendida como um evento molecular único; preferencialmente esta deve ser entendida como um evento que envolve várias cascatas de sinalização.

As modificações em tais cascatas começam no momento da exposição, em seguida ocorre a biotransformação, culminando na interação com macromoléculas e expressão de um *end point* (OGA, 2003).

Os testes toxicológicos são classificados de acordo com o tempo de exposição a drogas, como o teste de toxicidade aguda (geralmente de 24 a 48 horas) ou toxicidade crônica (6 meses a 2 anos, variando de acordo com a espécie estudada). Além disso, a concentração letal para 50% (CL₅₀) é a concentração do agente tóxico que causa mortalidade em 50% dos organismos expostos num intervalo de 24 a 96 horas, também é um parâmetro estimado durante estes testes.

A crescente pressão dos grupos de proteção dos animais tem restringido cada vez mais, o acesso da maioria dos grupos de pesquisa em toxicologia a mamíferos como roedores e coelhos. Além disso, leis, discussões, projetos e comitês visam à diminuição do número de animais usados em experimentos toxicológicos, forçando uma reflexão acerca do tema e a implementação de testes preliminares que permitam realizar inferências que possibilitem a redução do uso de animais.

Nesse contexto o ZF, *Danio rerio* (Hamilton, 1822), surge como modelo experimental alternativo. Esse pequeno peixe tropical de água doce é originário

da Ásia, mede no máximo 5 cm de comprimento, onívoro, pacífico. muito ativo e possui ciclo de vida curto em média 3 anos (KNIE; LOPES, 2004). Passou a ser utilizado como modelo experimental em toxicologia a partir dos anos 90.



Figura 1 Imagem *D.rerio* em um mini tanque de reprodução, machos à direita e fêmea à esquerda.

Fonte: Própria

A utilização do ZF como modelo experimental em toxicologia possui diversas vantagens. Geneticamente, ele é muito similar aos seres humanos, aproximadamente 70% dos genes codificadores de proteínas humanas tem ortólogos em ZF e mais de 80% dos genes associados a doenças humanas possuem homólogos em ZF (HOWE, et al., 2013).

Segundo Bugel e colaboradores (2015) o ZF provocou uma revolução nas triagens de alto rendimento *in vivo*. A maioria destes testes eram realizados em linhagens celulares, com variáveis específicas, que não reproduziam as interações multi-orgãos presentes em organismos vivos. Já a alta fecundidade, pequeno espaço requerido e baixo custo de manutenção do ZF, o torna um modelo experimental excelente para a realização de triagem de grande número de composto químico em um único ensaio. Contudo, o ZF também vem sendo adotado pela indústria farmacêutica para aceleração e economia durante a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas.

A importância do ZF pode ser observada quando analisamos o custo para lançar um novo medicamento no mercado americano, que em 2010 foi estimada em 1,8 bilhões de dólares. Além disso, aproximadamente 9 anos de estudos, pesquisa e desenvolvimento são requeridos. A descoberta de novas drogas também exige diversos ensaios *in vitro*, testes em animais e testes clínicos antes de receber aprovação regulatória se forem consideradas seguras e eficazes (PAUL et al., 2010).

O custo efetivo para lançar uma droga no mercado está associado com a experimentação animal. Os testes de segurança, toxicidade e estudo de farmacocinética, para determinar taxas de absorção, metabolismo e excreção, são realizados em modelos mamíferos caros. Então para reduzir o uso de mamíferos durante o processo de descoberta de drogas, especialmente durante as fases iniciais ou ensaios de segurança/toxicidade *in vivo*, o uso do modelo ZF tem obtido sucesso. Este sucesso é devido especialmente ao baixo custo e rapidez nas análises (ZON e PETERSON, 2005; BUGEL, TANGUAY e PLANCHART, 2015).

Um caso notável da aplicação do modelo ZF embrionário foi a descoberta da prostangladina E₂ 16,16- dimetilada, em testes de bioatividade com ZF, como um importante modulador da homeostase de células-tronco hematopoiéticas de vertebrados. Esta nova substância está em fase de ensaio clínico de fase II para o tratamento de malignidades hematológicas. Contudo, visando aproveitar esta grande economia obtida com o modelo ZF, um consorcio de empresas farmacêuticas multinacionais começou o processo de validação para a utilização deste na sua linha de descoberta e pesquisas (NORTH et al., 2007; BALL et al., 2014; BUGEL, TANGUAY e PLANCHART, 2015).

3.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE EFEITOS TÓXICOS EM *D. rerio*

A análise histopatológica é um excelente método para o diagnóstico de efeitos diretos e indiretos que afetem tecidos animais. Quando associados a outros métodos de análise, estudos histopatológicos podem auxiliar a compreensão de efeitos tóxicos. Sendo assim, é crucial a escolha dos órgãos alvos do estudo para a relevância dos dados obtidos (HEATH, 1995).

Lins e colaboradores (2010), afirma que os órgãos de contato direto com toxicantes são as brânquias, fígado e rins, sendo que estes dois últimos representam órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos. Podendo indicar alterações de ação crônica desses agentes em tecidos animais.

3.2.1 Brânquias

A respiração nos peixes é realizada através do fluxo de água pela cavidade bucal e conseqüentemente, para o interior da faringe e através das brânquias. A respiração branquial possui função efetiva quando a água se move em uma direção unilateral sobre as membranas branquiais. A maioria dos peixes bobeiam água através das suas brânquias alternando concentração e relaxamento da cavidade bucal (anterior às brânquias) e cavidade opercular (posterior as brânquias) (HUGHES, 1980; HELFMAN, 1997; HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

Um segundo método para promover o fluxo de água é nadando com a boca aberta (ventilação forçada) forçando a água através da faringe, sobre as brânquias e para fora da cavidade opercular e fendas branquiais (HUGHES, 1980; HELFMAN, 1997; HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

Semelhante aos organismos terrestres, o oxigênio é requerido pelos peixes para a produção de ATP e metabolismo básico corporal. Entretanto, os peixes vivem em um ambiente pobre em oxigênio. As brânquias são as estruturas que permitem os peixes executarem uma extração de oxigênio dissolvido na água para utilização em suas reações metabólicas (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

As brânquias do ZF são compostas por quatro arcos bilaterais, que podem ser vistos na orofaringe. Além disso, são sustentadas por ossos, tecido cartilaginoso e contém músculos esqueléticos. Elas são ricamente innervadas pelos nervos facial, glossofaríngeo e vago cranial. Estas estruturas são cobertas por epitélio mucoso contínuo como o da orofaringe. Estendendo-se de cada arco branquial há dois pares de filamentos branquiais primários (lamela primária) (Figura 2) (LAURENT e DUNEL, 1980; JONZ e NURSE, 2008; HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

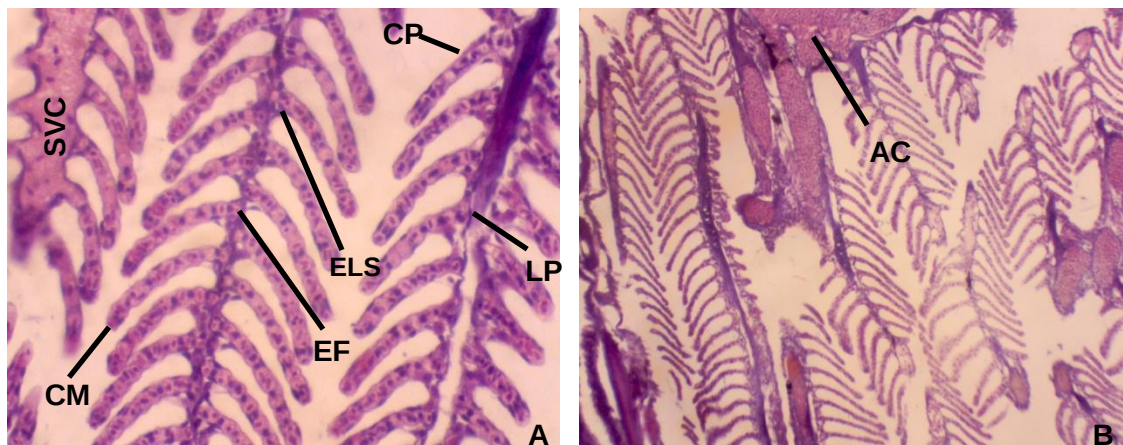


Figura 2. **A)** Brânquia de *D. rerio* (400x), observar CM- canal marginal; CP- célula pilar; EF- epitélio estratificado do filamento; ELS- epitélio pavimentoso das lamelas secundárias; LP- lamela secundária; LP- lamela primária; SVC- seio venoso central. **B)** brânquia de *D. rerio* (100x) observar o aspecto normal das lamelas primárias e secundárias e o arco cartilaginoso (AC)

Fonte: Própria

As lamelas primárias são sustentadas por cartilagem conhecido como arco cartilaginoso. Outra estrutura facilmente visualizada na lamela primária é o seio venoso central. Além disso, de cada lamela primária projetam-se delgados filamentos denominados lamelas secundárias (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

As lamelas secundárias proporcionam uma vasta superfície de absorção de oxigênio e liberação de gás carbônico e amônia para o ambiente externo. As lamelas secundárias são ligadas, a lamela primária, por células escamosas finas conhecidas como células pavimentosas. Estas células possivelmente executam uma importante função na manutenção da circulação sanguínea neste filamento. Estudos apontam que elas possuem habilidade contrátil e receptores de endotelinas. Ocasionalmente, células mucosas também pode ser vistas nas lamelas secundárias, proporcionando a estes filamentos uma camada protetora. Outro tipo celular presente neste filamento são as células de cloreto responsável pela receptação adequada de sal (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012) (Figura 2).

As brânquias devido o seu contato direto com a água durante as trocas gasosas são particularmente sensíveis a substâncias tóxicas presentes no meio (BARRETO, 2007). Sendo assim, este órgão possui a maioria dos estudos histopatológicos voltados a avaliação de impactos ambientais, e

atualmente também tem sido avaliado para a triagem toxicológica de nanocompostos.

Vélez (2013) realizou o estudo toxicológico da vermiculita, material utilizado como absorvente de produtos orgânicos na água. As maiores concentrações (100, 150 e 200 mg/mL), provocaram alterações histopatológicas nas brânquias como: aneurisma, deslocamento do epitélio lamelar, hiperplasia das células mucosas e fusão lamelar.

Outro estudo realizado por Freitas e colaboradores (2013) investigou os efeitos dos combustíveis fósseis nas brânquias do ZF. Os animais foram submetidos a diferentes concentrações de gasolina e óleo diesel, entre 6,25% a 100%. Os resultados demonstraram que tais compostos em suas composições pura ou comum são letais, provocando nas brânquias: necrose, hipertrofia das células, aneurisma e edemas.

As nanopartículas metálicas de prata, titânio e cobre quando testadas sobre modelos de ZF produziram aumento da celularidade no espaço interlamelar. Entretanto, as mudanças na largura dos filamentos branquiais variaram significativamente de acordo com a forma e o metal, visto que o autor também realizou tratamentos com os metais em sua forma comum (GRIFFIT et al., 2009).

Griffit e colaboradores (2013) buscaram caracterizar as alterações histopatológicas nas brânquias do ZF, perante o tratamento crônico com concentrações subletais de nanopartículas de prata. Porém, neste estudos alterações no epitélio como hiperplasia e fusão das lamelas secundárias, não foram observadas.

3.2.2 Fígado

O fígado é formado de uma evaginação do intestino em desenvolvimento, durante as fases embrionárias. Situa-se ventralmente ao esôfago e bulbo intestinal. Assim como nos mamíferos não é um órgão discreto e possui um formato de U em torno do intestino. Este órgão é intimamente associado com o tecido pancreático e vesícula biliar (CAILLIET, LOVE e EBELING, 1986; HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

O fluxo sanguíneo hepático do ZF é similar ao dos mamíferos. O sangue entra no fígado pela veia porta e artéria hepática. Após sua entrada, o sangue flui pelos ramos menores destes importantes vasos, que acabam numa série de sinusóides, os quais são revestidos por células endoteliais. As células de Kupffer, que estão ligadas nas células endoteliais hepáticas dos mamíferos, provavelmente não existem em ZF. Dos sinusóides, o sangue é coletado para o interior das veias centrais e então vai para o coração através da veia hepática (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

Os lóbulos hepáticos distintos presentes em mamíferos com uma veia central e tríade portal não estão presentes no ZF. Entretanto, muitos tipos celulares presentes no fígado de mamíferos estão presentes em ZF. Os hepatócitos são o tipo celular mais abundante e são caracterizados como células epiteliais, de forma poligonal com núcleo central (Figura 3). Eles cercam os sinusóides formando cordões hepáticos como vistos em vertebrados. Em alguns peixes, como o ZF, o citoplasma dos hepatócitos contém glicogênio abundante facilmente visualizado com coloração PAS (*Periodic acid-Schiff*). Assim como nos vertebrados, a função dos hepatócitos é estocar lipídeos, glicogênio e ferro. Além disso, eles produzem uma variedade de proteínas, aminoácidos e contribuem para o processo de detoxificação. Outra característica do fígado é que as veias podem ser claramente visualizadas e nelas se encontram hemácias nucleadas. Devido a presença de lóbulos hepáticos não identificáveis, não é possível distinguir entre os ramos das veias porta e hepática em coloração de HE (HAMPTON, McCUSKEY e HINTON, 1985; HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

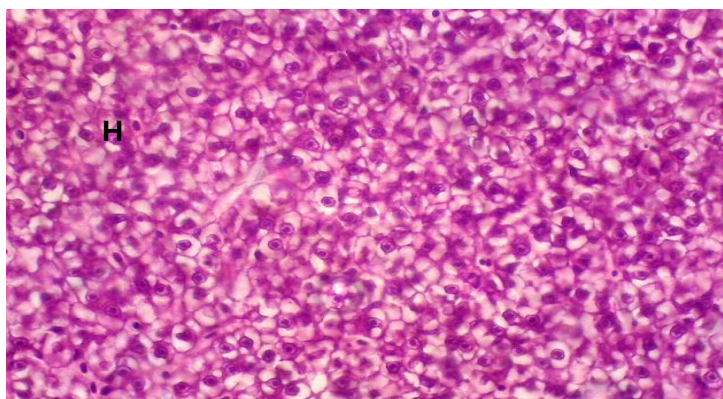


Figura 3. Aspecto histológico do fígado de ZF. Notar os hepatócitos (H).
Fonte: Própria

O fígado do ZF, assim como o dos mamíferos, possui função de produzir bile. Entre os hepatócitos estão pequenos ductos biliares (canalículos), formados por epitélio cuboidal, que conduzem a bile produzida pelos hepatócitos para a vesícula biliar. Os canalículos trazem a bile para o interior dos grandes ductos biliares intra-hepáticos, que são facilmente visualizados em preparações de rotina. Os grandes ductos biliares são formados pela anastomose de diversos canalículos biliares, que saem do fígado como um ducto extra-hepático (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012) (Figura 4). Em algumas preparações histológicas de fígado de ZF é possível notar áreas contendo pigmentação característica de agregado de macrófagos. Estes possuem pigmentos granulocíticos, que podem representar macrófagos materiais não digeridos, possivelmente com a finalidade de apresentação de antígenos para outras células do sistema imune (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

A complexidade e importância das funções do fígado, tornam a hepatotoxicidade uma das principais preocupações durante o desenvolvimento de novas drogas. Para avaliá-la ensaios com roedores geralmente são realizados, mas em geral possuem um elevado custo e grande tempo para execução. Além disso, outro problema como pequena amostragem é característico deste tipo de teste (McGRATH e LI, 2008). O ZF em estágios embrionários e adulto podem ser utilizados para a triagem de hepatotoxicidade de novas drogas ou investigações. As razões para a utilização deste peixe é motivada pela sua transparência, velocidade de desenvolvimento, grandes tamanhos amostrais e baixo custo. Portanto, os estudos de hepatotoxicidade em ZF são realizados mais cedo, facilitando a tomada de decisões para a aceleração do desenvolvimento de novos medicamentos (McGRATH e LI, 2008).

Já quanto a histopatologia hepática do ZF, alterações específicas foram

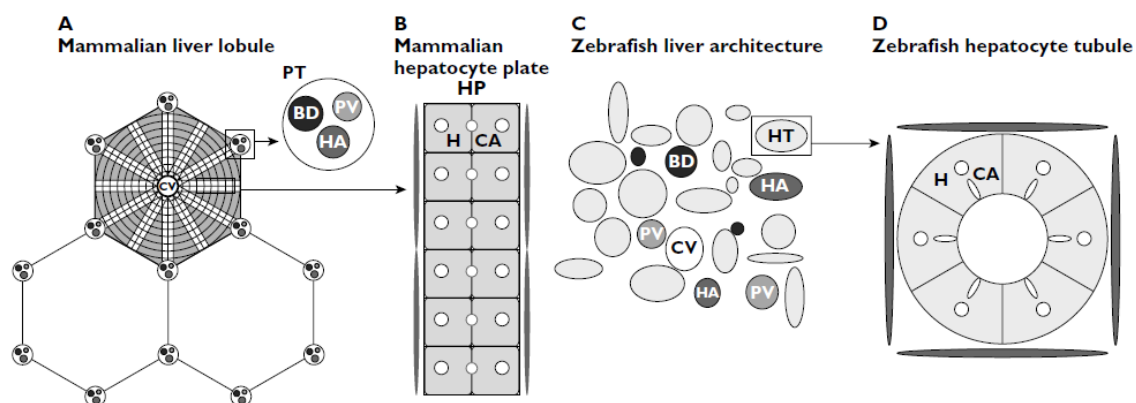


Figura 4 Representação esquemática da arquitetura hepática de mamíferos e ZF. (A) O lóbulo hepático de mamíferos é composto de placas de hepatócitos irradiadas externamente de uma veia central (CV). Nos cantos de cada lóbulo estão as tríades portal (PT) a veia portal (PV) uma artéria hepática (HA) e um ducto biliar (BD). (B) Placa de hepatócitos em camada dupla presente em mamíferos. Os canálculos bicelulares (CA) estão situados adjacentes aos hepatócitos (H) na placa de hepatócitos (HP). A membrana basal dos hepatócitos permite o transporte de oxigênio, proteínas e diversas macromoléculas para o interior destas células. O sangue que entra no fígado através da veia porta e da artéria hepática, segue para a CV pelos vasos sinusóides, localizados entre as placas. (C) Arquitetura hepática do ZF. A PV, BD, CV e túbulo de hepatócito (HT) estão espalhados por todo o parênquima. (D) Os hepatócitos de ZF (H) são dispostos em túbulos ao redor de pequenos ductos biliares, os quais recebem a bile provida dos canálculos de hepatócitos (CA). Os sinusóides estão localizados na periferia destes túbulos.

Fonte: VLIEGENTHART et al., 2014

reportadas. North e colaboradores (2010) reportaram necrose hepática em ZF após tratamento com paracetamol. Assim como para outros mamíferos o tratamento hexaclorociclohexano resulta em alterações hepáticas como acúmulo de gotículas de triglicerídeo macrovesiculadas, diminuição do glicogênio hepático e alterações no formato mitocondrial (BRAUNBECK et al., 1990). A exposição de ZF a tioacetamida provoca esteatose hepática acompanhada de acúmulo de gotículas de gordura e apoptose (AMALI et al., 2006). Outro relato diz respeito à exposição de ZF a etanol, que provoca esteatose hepática, assim como é visto na doença hepática alcoólica humana (PASSERI et al., 2009).

3.2.3 Rim

Nos vertebrados superiores (repteis, aves e mamíferos) o desenvolvimento do rim ocorre em três estágios. O primeiro estágio do rim em fase embrionária é o pronefron. Este é caracterizado por um par de glomérulos e dois ductos pronefricos separados que drenam produtos residuais para o

interior da cloaca. A cloaca nos teleósteos é uma pequena estrutura embrionária, que é perdida na fase adulta. Em seguida, durante a embriogênese os pronefrons são substituídos pelos mesonefrons, que por sua vez são substituídos por metanefrons ou rim adulto. Nos teleósteos, o desenvolvimento do rim termina com a formação dos mesonefrons (PETERSEN, 1986; HELFMAN, COLLETE e FACEY, 1997; HOAR, 1955; HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

No ZF, os pronefrons consistem de dois néfrons, que tem origem de um par de glomérulos centralmente fundidos. Posteriormente no desenvolvimento, os néfrons que formam os pronefrons degeneram. Entretanto, sua estrutura permanece como a porção anterior do rim e torna-se o sítio do sistema imune e esteroidogênico, além de conter células cromafins, que são homólogas à glândula adrenal dos mamíferos. Os mesonefrons tornam-se o rim adulto do ZF e contém os néfrons responsáveis por filtrar o sangue com resíduos e pela reabsorção de sal e água (PETERSEN, 1986; HELFMAN, HOAR, 1955; HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

A parte anterior do rim é conhecida como “cabeça do rim” contém células linfóides, hematopoiéticas, esteroidogênicas e endócrinas. Esta porção do rim é o sítio dominante de hematopoiese e é composto predominantemente por elementos hematopoiéticos. As células hematopoiéticas imaturas situam-se entre os túbulos dos néfrons. Além disso, áreas distintas de linfopoiese e formação de hemácias são observáveis. A parte posterior do rim ou “cauda do rim” contém néfrons com tecido linfóide ao seu redor (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

Os néfrons do ZF são compostos por glomérulos, túbulos proximal/distal e ductos coletores. Os glomérulos são facilmente visualizados como um grupo de capilares lobulados cercados pela cápsula de Bowman. O sangue é filtrado pelos glomérulos e então entra no espaço da cápsula de Bowman de onde segue para os túbulos proximais. Estes túbulos podem ser facilmente identificados em cortes histológicos de rotina como túbulos com coloração eosinófila e borda em escova. Sódio, cloro, água e glicose são absorvidos nos túbulos proximais. A borda em escova é o reflexo de inúmeras microvilosidades apicais nesta região dos néfrons. Já nos túbulos distais

continuam a ser absorvidos sódio e cloreto, porém água não é absorvida nesta porção (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012).

O ZF, assim como outros peixes teleósteos, excreta urina diluída. A função mais importante do rim nestes peixes é eliminar o grande volume de água que entra no corpo destes através das brânquias. Além disso, não existe estrutura comparável com alça de Henle, estrutura responsável pela concentração da urina, como encontrada nos vertebrados. Contudo, peixes de água doce não necessitam concentrar sua urina (HOLDEN, LAYFIELD e MATTHEWS, 2012) (Figura 5).

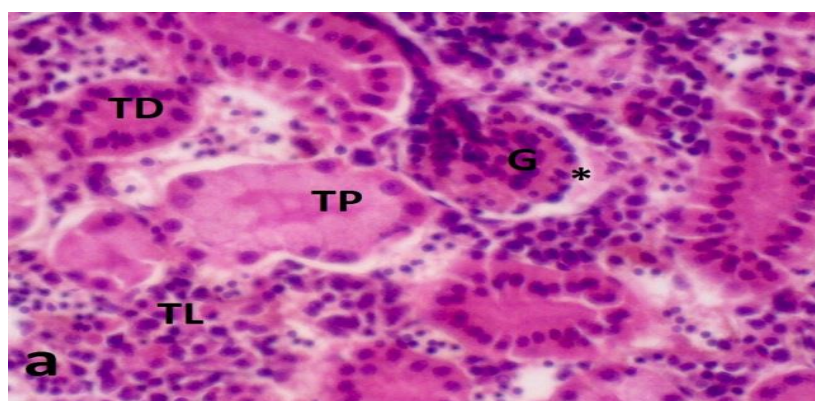


Figura 5. Rim normal em corte longitudinal de *D. rerio*. Notar a presença de um glomérulo (G). O asterisco mostra o espaço intercapsular. Observar o tecido linfóide (TL), o túbulo contorcido distal (TD), o túbulo contorcido proximal (TP) (400x).

Uma vez no túbulo distal, a urina flui para o interior do ducto coletor. É difícil distinguir túbulos coletores e túbulos distais em cortes histológicos de rotina. Estes túbulos não possuem coloração eosinófilica e não possuem borda em escova. A principal função do ducto coletor é conduzir a urina para o interior da bexiga urinária (MOCHIZUKI, FUKUTA e TADA, 2005).

A literatura até o mostra-se escassa quanto a estudos relacionados à histopatologia renal em ZF. Entretanto, outros autores já analisaram as alterações renais em outros peixes teleósteos. Camargo e Martinez (2007) ao realizar estudos toxicológicos ambientais em um ribeirão urbano contaminado (Londrina-Paraná), reportou alterações como: aumento do glomérulo, redução do espaço de Bowman, oclusão da luz tubular, degeneração granular e degeneração hialina, na espécie *Prochilodus lineatus*.

Cardoso e colaboradores (2009) realizaram análise histopatológicas em órgãos de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) expostos a mercúrio, coletadas na praia de Itaipu-Niterói, Rio de Janeiro. Os achados nos rins incluem metaplasia cartilaginosa e ninho de corpos melanomacrofágicos.

Souza (2015) estudou a toxicidade da nanoemulsão de álcool perílico sobre ZF e conclui que as concentrações de 25,35 e 50 µg/L ocasionaram alterações no tecido hepático como: necrose, ruptura dos vasos sanguíneos e degeneração glomerular, entre outras.

3.3 USO DE ZF (DANIO RERIO) EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS COM PRODUTOS NATURAIS.

O uso de ZF já está estabelecido como uma plataforma poderosa de pesquisa para a descoberta de novos fármacos, além de ser um modelo útil em outras áreas da ciência. A facilidade com que produtos naturais e pequenas moléculas podem ser analisados em ZF já o torna um modelo para triagem de bioatividade de extratos e componentes deles derivados. O grande número de testes que podem ser realizados com ZF é um dos atrativos dos modelos, já que não é possível realizar um número tão grande de testes em outros modelos experimentais. Os ensaios com base em ZF podem auxiliar no isolamento de grande número de moléculas bioativas provenientes de extratos vegetais, identificadas em triagens de larga escala, aumentando a relevância biológica de tais descobertas, e outro fator positivo na utilização do modelo ZF para triagem em larga escala é a quantidade diminuta de extratos ou produtos isolados requeridos para a realização dos testes. Portanto, a importância dos modelos de ZF é comprovada pelo número crescente de publicações e dos diversos testes realizados.

3.3.1 Produtos naturais e suas perspectivas

O termo produtos naturais, refere-se a pequenas moléculas produzidas por organismos vivos (particularmente metabólitos secundários), que ainda são uma excelente fonte química subutilizada para a descoberta de novos medicamentos. Componentes bioativos isolados de plantas, fungos e bactérias

deram origem a uma vasta gama de compostos terapêuticos para humanos. Além disso, outros são ferramentas em farmacologia, bioquímica e biologia celular (CRAWFORD et al., 2008).

O aprimoramento da química computacional nos anos 90 e o desenvolvimento de novas tecnologias, provocaram o declínio no campo da pesquisa de drogas derivadas de produtos naturais (CRAWFORD, ESGUERRA e WITTE, 2008). É válido lembrar que algumas empresas farmacêuticas eliminaram suas pesquisas com drogas derivadas de produtos naturais. A pesquisa com produtos naturais possui outros desafios inerentes como a dificuldade do isolamento de compostos puros de extratos brutos, identificação do mecanismo de ação e síntese de estruturas complexas, muitas vezes em quantidades tão pequenas, que não tem a sua atividade detectada através de triagem de alto rendimento (CLARDY e WALSH, 2004).

Apesar dos maciços investimentos em novas tecnologias para o desenvolvimento de compostos químicos, a quantidade de novos fármacos lançados no mercado não tem aumentado proporcionalmente. Sendo assim, a química computacional e combinatória não consegue atingir seu objetivo de ser uma fonte primária de novos compostos bioativos candidatos a fármacos inovadores (YUNES et al., 2001).

Neste contexto, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos. Há uma crescente valorização dos produtos naturais, pois estes possuem estruturas, que foram evolutivamente selecionadas com base em sua habilidade de interagir com macromoléculas biológicas (KOEHN e CARTER, 2005; MCCHESENEY, VENKATARAMAN, HENRI, 2007). Portanto, a pesquisa com produtos naturais vai continuar a se expandir, tendo estes como fonte inspiradora para o desenvolvimento de novas drogas.

A pesquisa com produtos naturais enfrenta outra grande dificuldade, a reduzida complexidade das análises das triagens de alto rendimento, que utiliza testes *in vitro* para a triagem da atividade farmacológica de milhares de moléculas candidatas a fármacos, sendo uma avaliação para um único alvo. Entretanto, esta análise gera muitas vezes compostos com pouca/nenhuma efetividade *in vivo* (VANDERGREEF e MCBURNEY, 2005). Entretanto, a

consequência desta deficiência tem sido estimulador a busca por novas metodologias de bioensaios para triagem da atividade farmacológica, que sejam mais eficientes nessa avaliação e independentes do alvo (CRAWFORD, ESGUERRA e WITE, 2008).

O ZF (ZF) devido diversas características biológicas pode ser utilizado em testes de triagem de alto rendimento, promovendo um aumento na relevância biológica, que é difícil de ser correspondida *in vitro* (LIN et al., 2013).

3.4 VANTAGEM DO ZF COMO ORGANISMO MODELO

O ZF é um pequeno peixe teleósteo, tropical de água doce, que mede de três a quatro centímetros pertencente à família Cyprinidae, sendo uma espécie muito conhecida pelo seu uso ornamental. Entretanto, a cada dia este pequeno peixe vem sendo utilizado pela comunidade científica como modelo experimental (Figura 6).

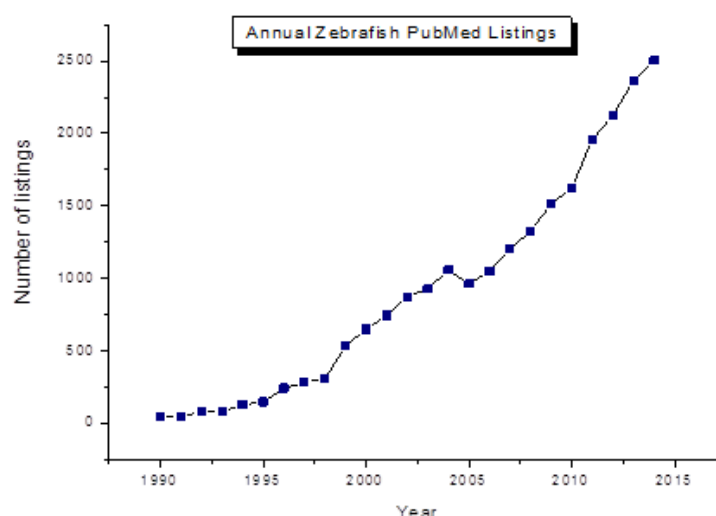


Figura 6 Uso do ZF como modelo experimental para pesquisa. É retratado pelo crescente número de citações na base de dados PubMed (1990-2014). Apenas o termo “ZF” foi utilizado para pesquisa na base de dados PubMed.

Fonte: Própria

A chave de todo sucesso do ZF, como modelo experimental, reside no fato deste possuir características favoráveis como: pequeno custo e espaço requerido para manutenção, desenvolvimento rápido e externo ao corpo da fêmea (*ex utero*), ciclo biológico curto, grande prole (centenas de ovos por acasalamento). Os embriões do ZF são translúcidos e pequenos (1-5 mm

dependendo do estágio de desenvolvimento) adequados à manipulação e microinjeção (LELE; KRONE, 1996; BAILEY; OLIVERI; LEVIN, 2013). É válido lembrar que a maioria dos testes realizados utilizam embriões e larvas.

A vantagem chave no teste de bioatividade de pequenas moléculas, utilizando larvas e embriões de ZF é que os compostos podem ser simplesmente diluídos em água não estéril, e as moléculas de baixo peso molecular são rapidamente absorvidas pela pele e brânquias, promovendo aumento da capacidade de análise centenas de moléculas por dia (ZON e PETERSON, 2005; LANGHEINRICH, 2003).

O ZF possui similaridades farmacológicas e fisiológicas com seres humanos e mamíferos superiores, que o torna adequado para identificação de produtos naturais bioativos com potencial terapêutico. As características biológicas do ZF combinadas o tornam um modelo *in vivo* adequado e ideal para triagem fenotípica em placas de microtitulação (CRAWFORD, ESGUERRA e WITTE, 2008). As placas de 96 poços são as mais utilizadas pelos investigadores para a triagem de drogas e produtos químicos (RENNEKAMP e PETERSON, 2015).

A maioria das triagens de bioatividade de fármacos utilizam ZF em estágios iniciais de vida, larvas e embriões, e um dos grandes questionamento no uso do modelo é: até que ponto os resultados poderiam ser extrapolados para seres humanos e outros mamíferos superiores? Os testes genéticos e farmacológicos usando ZF revelaram-se altamente representativos para outros organismos, incluindo seres humanos. Além disso, genes identificados na organogênese de ZF tem sido consistentemente validados em seres humano e camundongos. As homologias farmacológicas notáveis entre humanos e ZF podem ser estendidas para fenótipos de doenças modificadas descobertas através de ensaios (PETERSON e MACRAE, 2012).

Outro aspecto importante do ZF é a sua utilização como modelo de estudos genéticos, tendo sido estabelecido nos anos 70 por Streisinger, que estudou o desenvolvimento embrionário do ZF (STREISINGER, 1981). Nos anos 2000, ocorreu um progresso considerável na genética e genômica do ZF. Em 2001, o Instituto Sanger iniciou o sequenciamento total do genoma do ZF e em 2013 o genoma do ZF foi totalmente sequenciado, mostrando que 70 % de seus 26 mil genes são semelhantes aos genes humanos (STERN, ZON, 2003;

HOWE et al., 2013), o genoma mitocondrial do ZF encontra-se totalmente sequenciado desde outubro de 2001 (BROUGHTON, MILAM, ROE, 2001), e comparando as sequências do genoma humano e do ZF, muito genes como os do ciclo celular, crescimento, diferenciação, funções teciduais, supressores tumorais e oncogênese permanecem conservados, tornando o ZF um organismo modelo fidedigno para a triagem de bioatividade de drogas e produtos químicos (AMATRUDA et al., 2002; CRAWFORD, ESGUERRA e WITTE, 2008).

As pesquisas genéticas com ZF produziram uma gama de linhagens mutantes, que podem ser utilizadas para a realização de estudos das mais diversas patologias. Alguns exemplos de linhagens de ZF mutantes com defeito: no desenvolvimento de cartilagem, hematopoese, desenvolvimento cardiovascular. Atualmente, ensaios genéticos incluem testes de função gastrointestinal, desenvolvimento vascular, epilepsia e diabetes (CRAWFORD, ESGUERRA e WITTE, 2008; SETH et al., 2013). Houve também o desenvolvimento de uma linhagem mutante de ZF totalmente transparente utilizada para pesquisas relacionadas ao câncer e células tronco, anteriormente limitada somente às larvas e embriões (WHITE et al., 2008). As linhagens mutantes de ZF possuem como função, na pesquisa toxicológica, esclarecer os papéis de genes específicos e suas interações com vias de sinalização na patogênese causada por lesões induzidas por toxicante. Além disso, ZF com mutações duplas ou triplas podem elucidar as interações de conjunto de genes. mutantes de ZF podem ser produzidos de forma mais econômica e eficiente do que em murinos (SPITSBERGEN e KENT 2003; HILL et al., 2005).

Além das diversas linhagens mutantes, o ZF tem se mostrado um modelo vertebrado versátil para estudos de genética reversa. “Antisense morpholino” oligonucleotídeos, comumente referidos apenas como “*morpholinos*”, é a técnica mais utilizada para a produção de ZF nocautes. Esta técnica bloqueia especificamente a função de um gene em embrião de ZF. Os “*morpholinos*” estão disponíveis em bibliotecas, e sua microinjeção é realizada de maneira dose-dependente em embriões nos primeiros estágios de desenvolvimentos. Dois tipos de “*morpholinos*” são mais utilizados para interferir na expressão gênica das proteínas “ATG-morpholino” (bloqueia a tradução dos ribossomos e deixa o embrião sem uma proteína) e o “splice-

morpholino”, se liga e interfere no *splicing* do RNA, resultando numa proteína de forma truncada que é utilizado para o estudo de um domínio da proteína específico. Contudo, numerosos genes já foram funcionalmente analisados desta maneira, incluindo diversos identificados no contexto de triagens genéticas reversas de alta escala (BILL et al., 2009; HEASMAN, 2002, BILL et al., 2009; DOITSIDOU et al., 2002; PICKART et al., 2002; ESGUERRA et al., 2007).

Os métodos de transgenia em ZF estão bem estabelecidos, permitindo que a geração direta de linhagens transgênicas expressem fluorescência sob o controle de promotores específicos teciduais, e nos últimos anos houve vários avanços na capacidade de gerar linhagens transgênicas de ZF, reduzindo radicalmente o tempo para gerar novas linhagens. Tradicionalmente, ZF transgênicos eram gerados por microinjeção de plasmídeo linearizado de DNA, contendo a sequência codificação de uma proteína conhecida (tipicamente GFP- *Grenn Fluorescent Protein*), imediatamente incorporada a um promotor para o gene de interesse. No entanto, esta abordagem sofreu uma série de limitações, em particular devido à baixa integração com a linhagem germinativa. Os avanços tecnológicos incluem a introdução de sistemas Gateway e produção de plasmídeos compatíveis que podem ser usados em ZF; clonagem I-SceI, que quando introduzido em sítios de meganucleases aumentam a eficiência da integração com a linhagem germinativa. Mais recentemente, melhoria tem sido alcançada por cromossomos bacterianos recombinantes, onde são introduzidos fluoróforos e sítios de transposases Tol 2 em um cromossomo bacteriano contendo o gene ou o promotor de interesse (HAMMOND e MORO, 2012).

3.5 AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZANDO O ZF COMO MODELO EXPERIMENTAL

A utilização do ZF como modelo *in vivo* para a descoberta de pequenas moléculas candidatas a drogas foi primeiramente proposta há 50 anos, este estudo já utilizava os embriões e larvas de ZF para a triagem de drogas sintéticas e produtos naturais (JONES e HUFFMAN, 1957). Porém, apenas em 2000 foi descrito o primeiro experimento utilizando placas de múltiplos poços.

Desde então, mais de 60 trabalhos reportaram o uso do ZF para a realização de projetos inteiros visando à descoberta de medicamentos (RENNEKAMP e PETTERSON 2015).

O ZF tem sido largamente utilizado para estudos de toxicidade ambiental caracterizando os danos provocados por diversos poluentes e é considerado o padrão ouro para avaliação de toxicidade ambiental e qualidade da água (2013; SCHOLZ et al., 2008). Diversas substâncias consumidas por humanos como flavonoides, drogas de abuso, alcaloides já foram testados quanto ao seu potencial teratogênico e embriotóxico sobre ZF (JONES et al., 1964; THOMAS, 1975; KIM et al., 2009; STEWART e KALUEFF, 2014; LU et al., 2014). Com a expansão da nanotecnologia o ZF vem ganhando espaço como modelo experimental para testes de segurança ambiental e de saúde dos mais variados nanomaterias e nanocompostos (LIN et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008).

O uso de ZF adultos para o “screening” de drogas é menos comum sendo reportado na literatura apenas um registro de utilização de ZF para um grande experimento (OPPEDAL e GOLDSMITH, 2010). Porém, ZF adultos podem ser utilizados com outras finalidades como: confirmar a propriedade piscicida de lignanas extraídas de *Phyllanthus piscatorum*, uma planta utilizada pela tribo indígena amazônica Yanomami, como piscicida e antifúngico (GERTSCH et al., 2004; GERTSCH et al., 2003). Outro estudo recente utilizou ZF adultos para determinar os efeitos neurotóxicos de uma formulação medicinal chinesa de *Azadirachta indica* A., chamada de neem ou nim, através de modelos comportamentais (BERNADI, DIAS e BARBOSA, 2013).

ZF adultos podem ser utilizados para a triagem de atividade anti-inflamatória, especialmente de produtos naturais, através de um modelo recém estabelecido por Huang e colaboradores (2014) que baseia-se na administração intraperitoneal de λ - carragenina. Os autores descrevem um aumento significativo do edema abdominal e proteínas pro-inflamatórias (TNF- α e enzima oxido nítrico sintase induzida) em ZF induzido por carragenina.

3.6 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS E COMPONENTES ISOLADOS DE PLANTAS UTILIZANDO ZF COMO MODELO EXPERIMENTAL

No que se refere à descoberta de produtos naturais, a triagem em larga escala de produtos naturais tem se expandido nos últimos anos. Além disso, os estudos utilizando o ZF como modelo experimental *in vivo* para teste de extratos de vegetais tem se tornado mais comum. Os ensaios com ZF *in vivo* para descoberta de atividade de frações de extrato tem se mostrado bastante útil e muito explorado.

Atualmente, o ZF já foi utilizado para a triagem de diversas atividades de extratos de vegetais como: angiogênica/ anti-angiogênica, antitrombótica, anticonvulsivante, anti-inflamatória, antilipêmica, melanogênica. Além disso, a toxicidade de extratos e a ação destes sobre doenças neurodegenerativas, tais como (Síndrome de Parkinson e Síndrome de Alzheimer). Os tópicos a seguir apresentam alguns trabalhos descritos na literatura sobre o tema e ao final apresentamos um quadro citando referências relevantes.

3.6.1 Avaliação da atividade angiogênica em modelo de ZF

A avaliação da atividade angiogênica, em modelo de ZF, é mais estudada quando se trata de extratos vegetais. Um dos primeiros relatos neste sentido foi realizado por Lam e colaboradores (2008), o trabalho utilizou ZF transgênicos para caracterizar as propriedades pró-angiogênicas da planta medicinal do Leste Asiático *Angelica sinensis* (*dong quai*), mas não mencionou o isolamento de nenhum composto bioativo (LAM et al., 2008). Posteriormente, diversos estudos no mesmo sentido foram publicados. Outra citação realizada por LIU e colaboradores (2011) usou ZF transgênicos para investigar a atividade angiogênica do extrato aquoso bruto de *Rehmannia glutinosa* e esta publicação apontou o isolamento de um composto bioativo o norviburtinal (LIU et al., 2011). Posteriormente, YU e colaboradores (2013) demonstraram o efeito anti-angiogênico do extrato etanólico 95% de *Herba epimedii*, planta medicinal do leste asiático, utilizando testes de ZF transgênico *in vivo* (YU et al., 2013). Bohni e colaboradores (2013) desenvolveram uma plataforma de

teste biomonitoramento, que combinam triagem da bioatividade em embriões de ZF transgênicos com fracionamento rápido por cromatografia analítica em camada delgada e elucidação estrutural inicial por espectrometria de massa de electrospray. Em seguida, utilizando estes procedimentos identificou inibidores angiogênicos provenientes de extratos brutos de duas plantas medicinais do leste africano *Oxygonum sinuatum* e *Plectranthus barbatus* e este trabalho descrevem o isolamento de dois compostos com bioatividade emodina e coleona AL (BOHNI, et al., 2013).

3.6.2 Avaliação da atividade antitrombótica em modelos de ZF

A atividade antitrombótica de substâncias isoladas de extratos vegetais já foi avaliada usando o modelo ZF. SHI e colaboradores (2015), extraíram do extrato metanólico de *Piperwallichii* (Miq.) Hand.-Mazz., planta medicinal chinesa, diversos compostos como: neolignanas, glicosídeos aromáticos, fenil propil aldeídos e bifenilas. Em seguida, estes compostos foram testados quanto a sua atividade antitrombótica em modelo de ZF e uma lignana conhecida, (–)-siringaresinol, demonstrou boa atividade antitrombótica (SHI et al., 2015). SONG e colaboradores (2012) extraíram do extrato etanólico das folhas de *Crataegus pinnatifida*, quatro novos compostos fenólicos e testaram conjuntamente com outros compostos conhecidos para a atividade antitrombótica sobre ZF transgênico. Entre os compostos isolados eriodectiol demonstrou ser um potente inibidor da formação de trombos (SONG et al., 2012).

3.6.3 Atividade Anticonvulsivante em modelos de ZF

O ZF já foi utilizado para a confirmação da atividade anticonvulsivante de extratos ou substâncias isoladas de: *Curcuma longa*, *Salvia miltiorrhiza*, *Bunge* e *Solanum torvum* Sw. (Solanaceae). Berghmans e colaboradores (2007) investigaram o efeito anticonvulsivante do extrato de *Curcuma longa*, planta utilizada na medicina tradicional do sul Asiático- para o tratamento de epilepsia, em ZF, induzindo as convulsões com pentilenotetrazol, este demonstrou efeito antiepilético (BERGHMANS et al., 2007). Orellana-Paucar e colaboradores

(2012) buscaram isolar o composto com maior atividade anticonvulsante de *Curcuma longa* em convulsões induzidas com pentilenotetrazol em ZF, concluindo que sesquiterpenóides bisabolenos (α -ar-, α,β -turmerona e α -atlantona) extraídos do óleo de *Curcuma longa*, além do próprio óleo, possuem atividade anticonvulsante significativa (Orellana-Paucar et al., 2012). O extrato acetônico de *Salvia miltiorrhiza*, Bunge, planta utilizada na medicina tradicional chinesa, foi testada sobre convulsões induzidas com pentilenotetrazol, e os resultados demonstraram inibição da atividade convulsionante provocada por pentilenotetrazol. Em seguida, o fracionamento do extrato acetônico de *Salvia miltiorrhiza*, Bunge, resultou no isolamento de quatro tanshinones bioativos majoritários, o tanshinones II A provocou redução da expressão de c-fos no cérebro de larvas de ZF expostos a pentilenotetrazol (Buenafe et al., 2013).

3.6.4 Atividade anti-inflamatória em modelos de ZF

A atividade anti-inflamatória de alguns extratos de vegetais já foi testada sobre o modelo de ZF. KAO e colaboradores (2010) comprovaram que extrato de semente de uva reduziu a atividade de diidrofolato redutase e consequentemente o crescimento de *S. aureus*. Em seguida, ZF foram infectados com *S.aureus*, pré-incubados com extrato de semente de uva, e observou-se a diminuição significativa da resposta inflamatória e mortalidade de ZF infectados com *S. aureus* (KAO et al., 2010). Outro trabalho de BOHNI e colaboradores (2013), utilizaram o ensaio de inflamação em ZF para a triagem de bioatividade anti-inflamatória de mais de 80 extratos metanólicos de plantas medicinais do leste africano, e o extrato metanólico de *Rhynchosia viscosa* (Roth) DC. (Fabaceae) inibiu a migração leucocitária em caudas seccionadas de ZF (4 dias pós-fertilização). Com isso, isolaram cinco compostos bioativos do extrato metanólico de *R.viscosa* (rhynchovisina, genisteína, sophoroisoflavona A, licoisoflavona A e 3'-o-methylorobol) e comprovou que genisteína e sophoroisoflavona A possuem efeitos anti-inflamatórios e anti-angiogênicos. O trabalho publicado por Wang e colaboradores (2013) em que utilizaram o modelo ZF e linhagem celular RAW 264.7, para caracterizar efeitos, dos compostos anti-inflamatórios extraídos de extrato etanólico das raízes "Qin-Jiao"- *Gentiana dahurica* (Gentianaceae), planta medicinal utilizada

na medicina tradicional chinesa. Os resultados obtidos em ZF tratados com forbol (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), demonstraram a não citotoxicidade de todos os compostos e intensa atividade de inibição de dois compostos o ácido robórico e de liriiodendrina (lignana) (WANG et al., 2013).

3.6.5 Atividade antilipêmica em modelos de ZF

O modelo de ZF foi utilizado para comprovar a atividade hipolipidêmica de extratos. Um exemplo foi o trabalho publicado Jin e colaboradores (2011) que utilizou extrato aquoso de cúrcuma e louro (*Lourus nobilis L.*) sobre modelo de hipercolesterolemia em ZF. Os resultados obtidos demonstraram que o consumo dos extratos de louro e cúrcuma exibiram atividade hipolipidêmica e antioxidante sobre modelo hipercolesterolemia em ZF. Além disso, Jin e Cho (2011) estudaram o efeito de extrato aquoso de canela e cravo da Índia sobre modelo de hipercolesterolemia em ZF. O referido trabalho conclui que extrato aquoso de canela ou cravo exibiu atividade hipolipidêmica. Os autores também concluíram que os componentes hidrofílicos do cravo da Índia e canela exibiram potente atividade para supressão da aterosclerose, diabetes via atividade antioxidante, prevenção de glicação de apoA-L e LDL-fagocitose, inibição de CETP e atividade hipolipidêmica. Outro relato realizado Littleton e colaboradores (2013) que estabeleceram uma plataforma automatizada *in vivo* para a descoberta de tratamentos por alimentos funcionais contra hiperlipidemia; através da implementação deste método a habilidade do extrato metanólico de *Cratageus laevigata* sobre a hiperlipidemia e seus efeitos cardiovasculares periféricos. Os resultados obtidos demonstraram efeitos positivos sobre a hiperlipidemia e propriedades inotrópicas (LITTLETON et al., 2011).

3.6.6 Atividade Melanogênica em modelos de ZF

A fácil observação fenotípica do processo de pigmentação de larvas de ZF faz com que este organismo seja utilizado para estudos relacionados à atividade melanogênica. Kim e colaboradores (2007) utilizaram o ZF como modelo para a investigação da atividade anti-melanogênica de hanginina A,

uma isoflavona isolada dos ramos de *Lespedeza cyrtobotrya*. Os autores concluíram que hanginina A promove efeito semelhante a PTU (1-phenyl-2-thiourea), um inibidor de tirosinase, de maneira dose dependente (KIM et al., 2008). Park e colaboradores (2013) investigaram o efeito anti-melanogênico de arctigenina, composto isolado do extrato aquoso dos frutos de *Arctii*- sobre embriões de ZF, linhagem celular B16BL6 e Melan-A. Os resultados obtidos comprovaram que o tratamento arctigenina (10 μ M) reduziu de maneira moderada a deposição de pigmentação em ZF 15 dpf (15 dias pós-fertilização) (PARK et al., 2013). Outro trabalho realizado por Kim e colaboradores (2014), utilizou a rengiolona, composto obtido do extrato *Eurya emarginata*, sobre o modelo de ZF. Obteve como resultado a inibição da pigmentação corporal de ZF, além da redução dos níveis de melanina e atividade de tirosinase (KIM et al., 2014).

3.6.7 Estudos toxicológicos de produtos naturais em modelos de ZF

O ZF tem se mostrado muito útil para a avaliação da toxicidade de nanomateriais e nanocompostos, mas o ZF já foi utilizado como modelo experimental para teste de extratos ou produtos deles isolados. Liu e colaboradores (2010), investigaram os efeitos tóxicos do Celastrol, terpenóide isolado de *Tripterygium wilfordii* Hook F. Os resultados obtidos demonstraram que o Celastrol afeta o desenvolvimento normal de embriões de ZF em concentrações μ M (LIU et al., 2010). Ding e Chen (2012) analisaram a nefrotoxicidade por ácido aristolóquico, composto isolado do extrato *Asarum*. *Aristolochia*, e concluíram que o ácido aristolóquico induz nefropatia, defeitos na circulação e mal formações cardíacas mediadas por inflamação. Outro relato na mesma direção foi descrito por Zhang e colaboradores (2014) que avaliaram a toxicidade dos constituintes químicos do extrato acetônico do caule de *Kadsura oblongifolia*. Isolaram e identificaram 20 componentes químicos, e a toxicidade de 10 destes compostos foram testadas sobre o desenvolvimento embrionário e função cardíaca. Os resultados demonstraram que três compostos, kadsulignana O, ácido meso-dihidroguaiaretica e kadsufolina A, produziram edema em embriões de ZF e diminuição da frequência cardíaca, e também interferiram no desenvolvimento cardíaco de ZF (ZHANG et al., 2014).

3.6.8 Estudos relacionados a doenças neurodegenerativas em modelo de ZF

O ZF tem sido empregado no estudo de doenças neurodegenerativas, entre elas: doença de Parkinson, doença de Huntington e doença de Alzheimer. Sendo assim, na tentativa de entender o efeito neuroprotetor do extrato etanólico dos frutos de *Alpinia oxyphylla*, planta comumente utilizada na medicina tradicional chinesa, esta foi investigada por Zhang e colaboradores (2012) usando como modelo ZF e linhagem celular PC-12. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato preveniu e restaurou a neurodegeneração dopaminérgica induzida por 6-OHDA (6-hidroxidopamina) e atenuou o déficit da atividade locomotora no modelo de doença de Parkinson em ZF (ZHANG et al., 2012). Chong e colaboradores (2013) estudaram o efeito neuroprotetor de Danshensu, principal componente hidrofílico de *Radix Salviae Miltiorrhizae* (Danshen, Pharmacopoeia of PR China), que possui propriedade antioxidante, na neurodegeneração dopaminérgica induzida por 6-OHDA. Os modelos experimentais utilizados foram a linhagem celular PC-12 e o ZF. Os resultados obtidos com o tratamento com Danshensu sobre a neurodegeneração, sugerem que o mesmo exerce efeito neuroprotetor, podendo atenuar a perda de células até o nível normal (CHONG et al., 2013).

Tabela 1 Uso de extratos vegetais ou compostos isolados sobre modelos de ZF

Atividade avaliada em modelo de ZF	Referências
Angiogênica/ Antiangiogênica	LAM et al., 2008; HE et al., 2009(a); HE et al., 2009 (b); HONG et al., 2009; HE et al., 2010; ALEX et al., 2010; KRILL et al., 2010; ZHU et al., 2011; LIU et al., 2011; CRAWFORD et al., 2011; TSE et al., 2012; ZHONG et al., 2012; HE et al., 2012; ZHANG et al., 2012; HAN et al., 2012; YU et al., 2013; BA et al., 2013; LEE et al., 2013; YAHG et al., 2013; FAN et al., 2013; YUE et al., 2013, DA-SONG et al., 2014; ZHOU et al., 2014; GERMANO et al., 2014 LAI et al., 2015
Atividade antitrombótica	SONG et al., 2012; SHI et al., 2015
Anticonvulsivante	ORELLANA-PAUCAR et al., 2012; BUENAFE et al., 2013; CHALLAL et al., 2014
Anti-inflamatória	KAO et al., 2010; BOHNI et al., 2013; WANG et al., 2013
Antilipêmica	JIN et al., 2011; KIM et al., 2012; PARDAL et al., 2014; LITTLETON et al., 2014
Melanogênica	KIM et al., 2008; DING et al., 2011; PARK et al., 2013; KIM et al., 2014; WANG et al., 2014
Doenças Neurodegenerativas	ZHANG 2012; CHONG et al., 2013; GUO et al., 2014
Toxicidade	GERTCH et al., 2003; KELLEHER et al., 2009; WANG et al., 2011; FANG et al., 2011; ZHANG et al., 2014; DING e CHEN, 2012; BERNADI et al., 2013
Outros Estudos	WANG et al., 2009; DEL VALLE-MOJICA E ORTIZ, 2012; WEI et al., 2012 (a,b); FERRI-LAGNEAU et al., 2012; GEBRUERS et al., 2013; YU et al., 2013;;

3.7 FAMÍLIA APOCYNACEAE

A família Apocynaceae compreende aproximadamente 200 gêneros presentes em duas subfamílias, Apocynoidea e Plumerioidea e 2000 espécies, distribuídas predominantemente pelas regiões tropicais e subtropicais do globo.

São plantas de hábitos variados, ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras. A maioria possui látex em laticíferos não articulados, ramificados ou não ramificados, e vivem tanto nos campos ou matas (JOLY, 2002).

Os constituintes fitoquímicos da família incluem glicosídeos cardioativos e cianogenéticos, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos, ciclitóis e triterpenóides. Os constituintes da subfamília Plumeriodea incluem grande variedade de alcaloides indólicos, mais de 500 nos gêneros *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Catharanthus*, *Hunteria*, *Pleiocarpa*, *Rauvolfia*, *Tabernaemontana* e *Vocanga* (EVANS, 2002).

3.8 Gênero *Himatanthus*

Mueller Argoviensis classificou os gêneros *Himatanthus* e *Plumeria* como sinônimos devido estas apresentarem características semelhantes (MABBERLEY, 1997). Woodson em 1938 revisou o trabalho de Mueller, confirmou a proposta de Willdenow, que previa a separação do gênero *Himatanthus* e *Plumeria*. Analisando todas as espécies e referências bibliográficas, Plumel (1991), constatou a separação dos gêneros em questão, produzindo informações adicionais baseando-se na pesquisa de grande material botânico. Contudo, foi possível identificar 13 espécies desse gênero, entre as quais, diversas espécies descritas inicialmente por Mueller Argoniensis e reclassificadas por sinonímia por Woodson, sendo elas: *Himatanthus articulatus* (Woodson, 1937) *Himatanthus attenuatus* (Woodson,1937), *Himatanthus bracteatus* (Woodson, 1937) *Himatanthus drasticus* (Plumel,1990) *Himatanthus fallax* (Plumel,1990) *Himatanthus lancifolius* (Woodson,1937) *Himatanthus obovatus* (Woodson,1937) *Himatanthus phagedaenicus* (Woodson,1937), *Himatanthus semilunatus* (Markgraf,1972) *Himatanthus speciosus* (Plumel,1991), *Himatanthus stenophyllus* (Plumel,1990), *Himatanthus stenophyllus* (Plumel,1990) *Himatanthus sucuuba* (Woodson,1937) e *Himatanthus tarapotensis* (Plumel,1990)

As espécies do gênero *Himatanthus* possuem distribuição limitada a região neotropical ocorrendo desde o Panamá até o sudeste do Brasil, tendo

como limite sul o trópico de Capricórnio. A maioria das espécies deste gênero ocorre na região amazônica, com as demais espécies presentes fora da região amazônica (extra-amazônica) na costa e no centro-oeste do Brasil. As espécies *H. drasticus* e *H. bracteatus* possuem distribuição restrita ao Brasil, ocupando áreas como: cerrado, campo rupestre, caatinga e mata atlântica (SPINA, 2004).

3.9 *Himatanthus drasticus* (Plumel, 1990)

CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA:

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Asteranae Takht.

Ordem: Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Família: Apocynaceae Juss.

Gênero: *Himatanthus* Willd. ex Schult.

Himatanthus drasticus (Plumel, 1990)

(Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/1805709>>, Acesso: 22/11/2015)

A espécie *H. drasticus* pertence à família Apocynaceae e possui ocorrência exclusiva no Brasil, mais precisamente nos estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Piauí, Maranhão, Pará e Roraima. Popularmente é conhecida como timborna, jasmim-manga e raivosa em Minas Gerais e Bahia, janaguba no Ceará, pau-de-leite no Piauí, joanaguba no Rio Grande do Norte (PLUMEL, 1991). A altitude em que esta espécie se desenvolve compreende de 200-1500 metros, em terrenos de transição entre cerrado e caatinga, tendo frutificação praticamente durante o ano inteiro (SPINA, 2004).

No Ceará *H. drasticus* ocorre com maior frequência na Chapada do Araripe, extremo sul do estado, onde é explorada pela população nativa, cotidianamente e sem nenhuma orientação (AMARO et al., 2006).

A janaguba é uma espécie arbórea que pode atingir até sete metros de altura, com folhagem densa nas extremidades dos ramos, folhas obovais,

subcoriáceas, brilhantes, glabras, verde escuro, com ápice arredondado a obtuso e pecíolos curtos. A espécie possui flores brancas aromáticas, fruto tipo folículo, que possui forma de chifre medindo entre 15 a 20 centímetros de comprimento por 2,5 centímetros de largura, e sementes aladas. Sua casca tem aspecto rugoso e exsuda um látex branco bastante usado na medicina popular, conhecido como leite da janaguba (LORENZI e MATOS, 2002; MODESTO, 1997 e PLUMEL, 1991).

O critério estabelecido para a extração do látex é que o tronco do vegetal tenha em média 22 centímetros de diâmetro, sendo produzido um corte no floema, que varia conforme o perímetro da planta, sendo 2 cortes opostos para aqueles considerados com menor espessura, em torno de 22 centímetros, e 3 ou 4 cortes para aqueles considerados mais grossos, ou seja com perímetro maior que 22 centímetros. É importante salientar que em todos os tipos de cortes são deixadas quinas para a regeneração da casca (MODESTO, 1997).

Após a coleta, o látex é diluído em água na proporção de 1: 10, sendo armazenado em recipiente de vidro ou plástico para ser comercializado na região em embalagens de 1 litro (Figura 7) (MODESTO, 1997).

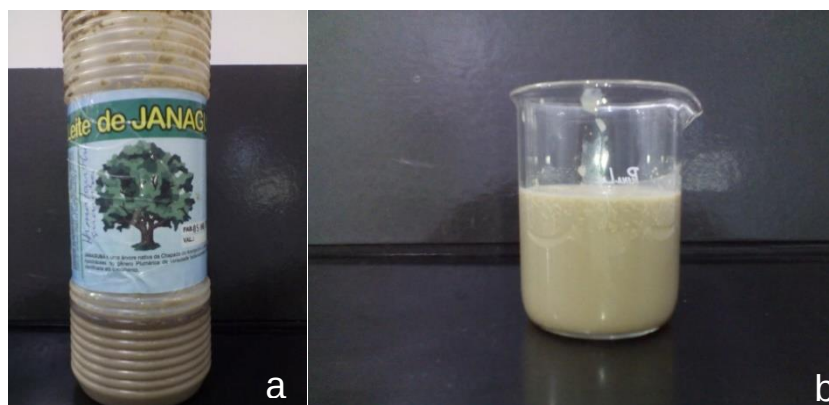


Figura 7: a) FPLJ na forma como é comercializada e consumida pela população. b) aspecto da FPLJ.

Fonte: Própria

3.10 GÊNERO *Himatanthus*- CONSTITUINTES FITOQUÍMICOS E AÇÕES FARMACOLÓGICAS

No século passado diversas classes de produtos naturais foram isoladas e suas estruturas caracterizadas quimicamente. Em especial, os metabolitos

secundários são uma excelente fonte química subutilizada para a descoberta de novos medicamentos (CLARDY e WALSH, 2004).

Diversas espécies do gênero *Himatanthus* têm sido estudadas quanto a sua composição química em especial de seus metabolitos secundários. Consequentemente, várias classes químicas e diversas substâncias de interesse medicinal foram isoladas e relatadas nos últimos anos.

3.10.1 *Himatanthus articulatus* (Woodson, 1937)

H. articulatus é uma planta nativa da Amazônia, que tem seu extrato aquoso ou alcoólico da casca, utilizado contra: úlceras, tumores, câncer, sífilis, e malária (MILLIKEN, 1997; BARRETO, 1998; LUZ, 2001; AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2008; COELHO-FERREIRA, 2009; REBOUÇAS et al., 2013).

O estudo fitoquímico da casca e das folhas realizado por Barreto (1998) permitiu o isolamento e identificação dos seguintes compostos: estigmasterol, sitosterol, cicloartenol, 3 β -cinamato de α -amirina + 3 β -cinamato de β -amirina, 3 β -acetato de α -amirina, 3 β -acetato de β -amirina, 3 β -cinamato de lupeol, 3 β -acetato de lupeol, ácido ursólico, metilmioinositol, ácido 1 β -O- β -D-glucopiranosilplumérico, 1 β -O- β -D-glucopiranosilplumerídio, plumericina e isoplumericina.

Sequeira e colaboradores (2009) realizaram um estudo que comprovou propriedades antibacterianas/ antifúngicas do látex e de extratos (metanólico, hexânico e acetato) de folhas, casca e galhos de *H. articulatus*. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos metanólicos e látex inibiram o crescimento de *Candida albicans*, o extrato metanólico das folhas inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e o extrato metanólico de galhos inibiu *B. subtilis*.

Outro estudo realizado por Rebouças e colaboradores (2011) demonstrou a atividade antiproliferativa de *H. articulatus* sobre linhagens de células cancerígenas humanas, como por exemplo: HT-29- adenocarcinoma de colón, NCI-H460- carcinoma de pulmão de células, MCF-7- câncer de mama, OVCAR-3- adenocarcinoma ovariano. O estudo conclui que o extrato bruto da casca de *H. articulatus* produziu atividade citotóxica fraca sobre estas

linhagens. No entanto, a fração butanólica mostrou-se ativa apenas contra células tumorais, enquanto a fração clorofórmica possui alta atividade sendo semelhante ao controle positivo (etoposídeo).

Rebouças e colaboradores (2012) também investigaram a atividade antigenotóxica/genotóxica e mutagênica do látex de *H. articulatus*, através das metodologias de ensaios do cometa e micronúcleo. Então, sob as condições experimentais o látex de *H. articulatus* não aumentou a frequência de danos no DNA, mensurados através do ensaio do cometa/micronúcleo em camundongos tratados, indicando atividade não genotóxica e não mutagênica. Além disso, o látex de *H. articulatus* exerceu efeito protetor contra danos no DNA induzidos por peróxido de hidrogênio.

Os extratos aquoso e etanólico de *H. articulatus* também foram analisados quanto suas propriedades mutagênicas e genotóxicas, demonstrou-se que os extratos não são genotóxicos e reduzem o efeito clastogênico provocado pelo peróxido de hidrogênio. Em parte, estes resultados podem ser atribuídos ao perfil fitoquímico de *H. articulatus*, que possui iridóides e compostos fenólicos (REBOUÇAS et al., 2013).

3.10.2 *Himatanthus bracteatus* (Woodson, 1937)

H. bracteatus foi investigada, por Lima e colaboradores (1947) quanto a sua atividade antibacteriana, demonstrando que o extrato de suas sementes apresentou grande inibição sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Mello e colaboradores (1975) identificaram no látex de *H. bracteatus* substâncias químicas como: acetato de β - amirina, e acetato de lupeol, compostos que apresentam inibição notável de tumores sólidos, como carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180.

Fraga, Andrade Silva et al.(2009) realizaram uma comparação farmacológica entre três espécies do gênero *Himatanthus* (*H. drasticus*, *H. sucuuba* e *H. bracteatus*). Este estudo cita que a casca de *H. bracteatus*, diferentemente das outras duas espécies estudadas, não possui cristais prismáticos de oxalato de cálcio. Além disso, a análise por cromatografia em camada delgada de alta eficiência revelou que o plumerídeo e iridóides estão em maior concentração em extratos de folhas e látex de *H. bracteatus* e *H.*

sucuuba, e o isoplumerídeo apresenta baixa concentração em todas as amostras analisadas.

3.10.3 *Himatanthus fallax* (Plumel,1990)

Apenas um estudo foi encontrado sobre essa espécie, que foi realizado por Abdel-Kader e colaboradores (1997). Neste trabalho foram isolados de *H. fallax* os compostos plumericina e isoplumericina cujo já foi isolado de outras espécies do gênero *Himatanthus*.

3.10.4 *Himatanthus lancifolius* (Woodson,1937)

Himatanthus lancifolius, popularmente conhecida como agoniada é uma planta nativa que cresce em diferentes áreas do Brasil, precisamente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Goiás e Amazonas, sendo descrita oficialmente na Farmacopeia Brasileira I (BRANDÃO et al., 2006). Esta espécie é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças de pele, febrífuga, emenagoga, purgativa, antiúlcera, asma, sífilis, e principalmente como estimulador de contrações uterinas, auxiliando na concepção e regularização da menstruação (CORREA et al., 1998).

Um glicosilplumerídeo foi isolado de *H. lancifolius* (BARRETO et al., 1998). Souza, Stinghen e Santos (2004) analisaram a frações de *H. lancifolius* ricas em alcalóides, quanto a sua atividade antimicrobiana, constatando sua atividade de largo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Esta espécie foi estudada por Rattmann e colaboradores (2005) quanto a capacidade de resposta muscular, o que resultou em alterações na resposta da musculatura lisa vascular e não vascular, acarretada por bloqueio da entrada de cálcio, mudança na utilização ou mobilização. Baggio e colaboradores (2005) demonstraram o efeito gastroprotetor de alcaloides indólicos isolados de *H. lancifolius* em experimentos de indução de lesão gástrica por etanol e redução de ácido gástrico induzido por ligadura pilórica.

O composto uleína isolado de *H. lancifolius* mostrou ação antiulcerogênica (FINAU, 1996) e estimulante nas vias de produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em experimentos com linhagens celulares (RAEC e B16F10). Este composto também apresentou atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (SEIDL et al., 2010). A fração rica em uleína isolada de *H. lancifolius* foi descrita por Nardin e colaboradores (2010) como inibidor da proliferação de linfócitos estimulados por fitohemaglutinina. Esta fração também inibiu a proliferação de linhagens celulares leucêmicas de origem linfocitárias como Daudi e REH (NARDIN et al., 2010; LIMA et al., 2010). A mesma fração também demonstrou interferir no processo de migração leucocitária, sugerindo que *H. lancifolius* diminui este processo através do composto uleína, consequentemente possuindo efeito anti-inflamatório (NARDIN et al., 2008).

3.10.5 *Himatanthus obovatus* (Woodson,1937)

H. obovatus é conhecida como tiborna, Angélica, pau-de-leite, janaúba e leiteiro. O chá de suas folhas é utilizado no norte do Brasil como depurativo, no tratamento de pressão alta, manchas de pele, espinhas e coceiras. O seu látex é utilizado no tratamento de úlceras estomacais (COELHO e AZEVEDO, 2000).

Lima (2005) realizou o estudo fitoquímico de *H. obovatus* que isolou cinco lignanas: pinoresinol, isolariciresinol, hidroxipinoresinol, lariciresinol e olivil; três nor-isoprenóides (classe de composto que ainda não tinha sido isolada deste gênero) e um iridóide. Este iridóide já havia sido isolado de *H. fallax* e *H. phagedaenicus*, mas não em *H. obovatus*. Além disso, foram isoladas duas misturas de terpenos (acetato de lupeol + acetato de α -amirina + acetato de β -amirina + germânico e estigmasterol + β -sitosterol + campesterol).

Em outros estudos envolvendo *H. obovatus* esta foi analisada quanto a sua atividade antiplasmódica e larvicida contra *Aedes aegypti*, porém não houve resultados significativos (MESQUITA et al., 2007; OMENA et al., 2007). Entretanto, esta espécie foi testada contra *Leishmania donovani* demonstrando uma CI_{50} de 7,5 μ g/mL (MESQUITA et al., 2005).

Em estudos *in vitro* o extrato das folhas de *H. obovatus* apresentou alta atividade inibitória contra proliferação de células mononucleares sanguíneas estimuladas com fitohemaglutinina (SOUZA-FAGUNDES et al., 2002). Além disso, *H. obovatus* teve atividade citotóxica contra linhagens celulares cancerígenas (MESQUITA et al., 2009).

3.10.6 *Himatanthus phagedaenicus* (Woodson,1937)

H. phagedaenicus é conhecida popularmente no norte do Brasil como leiteiro, banana de papagaio e angélica do mato. Seu látex é usado na medicina popular como anti-helmíntico, em afecções herpéticas, úlceras, verrugas e psoríase (PIO CORREA, 1994).

A composição química de ramos de *H. phagedaenicus* é caracterizada pela presença de iridóides lactonas tais como: plumericina, isoplumericina e alamandina; iridóides glicosídeos como penta-O-acetil plumerídeo associado a sacarose octacetilada; e triterperpenóides α -amirina, β -amirina e lupeol (VANDERLEI et al., 1991). O ácido β -dihidroplumericínico também foi também desta espécie (VELOSO, NAGEM e OLIVEIRA 1999)

Vanderlei e Souza Brito (1985, 1989) realizaram o estudo farmacológico comprovando que *H. phagedaenicus* inibiu a diurese induzida por sobrecarga hídrica em ratos, aumentou a glicemia em ratos com diabetes induzida por aloxano. Esta espécie também provocou efeito contrátil acentuado na musculatura lisa intestinal de íleo isolado de cobaia.

3.10.7 *Himatanthus sucuuba* (Woodson,1937)

H. sucuuba é conhecida vulgarmente como sucuba, sucuuba e janaguba. O uso de seu látex é muito difundido na medicina popular da região norte do Brasil, principalmente no tratamento de câncer. Este látex também é utilizado como fungicida, antianêmico, vermífugo, anti-inflamatório (SILVA et al., 1998; DE; MIRANDA et al., 2000).

Os compostos químicos mais isolados dessa planta são iridóides, encontrados no caule e no látex, como fulvoplumierina, plumericina, isoplumericina, ácido confluêntico, ácido metilperlatólico, ácido 15-desmetiplumerideo (PERDUE; BLOMSTER, 1978; ENDO et al., 1994; SILVA et al., 1998; WOOD et al., 2001; AMARAL et al., 2007).

Os estudos farmacológicos evidenciaram atividades anti-inflamatória e analgésica, com inibição da produção de óxido nítrico, γ -interferon e via do NF-K β , dos iridóides presentes na casca do caule e no látex de *H. sucubus*. Além disso, o efeito cicatrizante e baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em ratas, indicando que seu consumo é seguro na espécie humana para o tratamento de gastrites e hemorroidas (GUERRA e PETERS, 1991; VILLEGAS et al., 1997; SILVA et al., 1998; DE MIRANDA et al., 2000; SOUZA, et al., 2006; FAKHRUDIN et al., 2014). Também foi reportada atividade sobre a pressão sanguínea, musculatura lisa, permeabilidade capilar, cicatrizante e anti-leishmaniose (VILLEGAS, 1997; CASTILLO, 2007; SOARES, 2010).

Soares e colaboradores (2010) realizaram avaliação de parâmetros toxicológicos reprodutivos. Os parâmetros avaliados foram o desenvolvimento materno e a frequência de anormalidades fetais. Contudo, o estudo concluiu que o grupo tratado com 500 μ g/mL apresentou um decréscimo significativo de ganho de peso materno e fetal e eficiência placentária quando comparada com o grupo controle. Neste grupo também houve aumento da ossificação do metacarpo. Resumidamente, *H. sucubus* causou restrição do crescimento intrauterino, perda na pré-implantação e atraso no desenvolvimento em altas doses testadas.

3.10.8 *Himatanthus drasticus* (Plumel, 1990)

Himatanthus drasticus (Plumel, 1990) é conhecido popularmente como tiborna, jasmim-manga e raivosa em Minas Gerais e Bahia, janaúba no Ceará, pau-de-leite no Piauí, janaguba no Rio Grande do Norte, sucubúba na Amazônia (Plumel, 1991).

O látex de *H. drasticus* tem indicação popular contra o câncer de pulmão e linfático, vermes intestinais, febre e úlceras gástricas (LORENZI e MATOS,

2008). Estudos realizados por Mesquita e colaboradores (2005) das raízes de *H. drasticus* indicaram que apresentam efeito leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania donovani*. Estudos prévios com as espécies de *Himatanthus* demonstraram atividade farmacológica contra carcinoma epidermóide nasofarínge humano (PERDUE e BLOMSTER, 1978)

Himatanthus drasticus (Plumel, 1990), como outras espécies do gênero *Himatanthus* foram escassamente relatadas em relação aos seus estudos fitoquímicos e suas atividades biológicas. Colares et al., (2008) isolaram e identificaram do extrato etanólico da casca, o triterpeno cinamato de lupeol que provavelmente é uma substância com perspectivas de apresentar atividade antitumoral. Outro trabalho com ação farmacológica dessa espécie foi o efeito gastroprotetor do látex através de lesão gástrica induzida por etanol e indometacina.

Luz e colaboradores (2014) realizaram prospecção fitoquímica da casca *H. drasticus*, concluindo que esta apresenta compostos pertencentes às classes dos alcalóides e taninos, que podem ser potencialmente ativos em modelos biológicos e farmacológicos. Também apresenta cumarinas com potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, antiviral e antioxidante; além do potencial de ação antifúngica e hipocolesterolemiantes das saponinas.

Outros estudos farmacológicos como realizado por Sousa e colaboradores (2010) apontam baixa toxicidade do extrato metanólico bruto de folhas de *H. drasticus* e atividade antitumoral significativa em modelo experimental de sarcoma 180. Além deste estudo Mousinho e colaboradores (2011) investigaram o efeito antitumoral de proteínas do látex de *H. drasticus*, neste trabalho é citado atividade anti-tumoral, que pode ser associada com propriedades imunoestimulantes. Já Lucetti e colaboradores (2010) estudaram o possível mecanismo da ação anti-inflamatória do acetato de lupeol isolado de *H. drasticus*, que provavelmente envolve o sistema opióide, porém mais estudos são necessários para a confirmação. Por fim, Colares e colaboradores (2008), descreveram atividade antinociceptiva de *H. drasticus* avaliada em teste de contorções induzidas por ácido acético, porém no teste de chapa quente não houve efeito significativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto inicial foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá- CEUAUNIFAP, recebendo aprovação e registro com protocolo nº004/2015. Os protocolos experimentais foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Amapá situado em Macapá, Ap-Brasil.

4.2 OBTENÇÃO E CONTÉUDO DE SÓLIDOS DA FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE LEITE DE JANAGUBA (*H. drasticus*)

A fitopreparação popular a base de leite de Janaguba foi adquirida de um revendedor popular localizado no seguinte endereço: Rua Luiz Pereira, 14- Pimenta-CEP: 63.105-120, Crato-CE-Brasil. O conteúdo de sólidos da FPLJ foi determinado através de liofilização em triplicata e expresso em percentual p/p.

4.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

4.3.1 Animais experimentais

Os peixes da espécie *Danio rerio* foram adquiridos da empresa Acqua New Aquários e Peixes LTDA ME situada em Itagassu- PE, sob o protocolo de autorização de uso nº 526140011289802 de 07 de maio de 2014, com registro no IBAMA nº 82957, sendo transportado por via aérea até a cidade de Macapá pela empresa Gollog serviços de cargas aéreas, protocolo de envio nº 12700094619755. Os mesmos foram mantidos em quarentena na plataforma zebrafish do laboratório de pesquisa em fármacos.

4.3.2 Avaliação dos parâmetros comportamentais de *D. rerio* em condições normais e sob tratamento com FPLJ.

Para a realização deste estudo, foram utilizados um total de 90 animais, tanto para a análise histológica como para comportamental. Para todos os experimentos foram utilizados animais adultos de 6 a 8 meses. Os animais foram mantidos na plataforma zebrafish do laboratório de Pesquisa em Fármacos na temperatura $26 \pm 2^\circ \text{C}$ com ciclo de luz de 10 horas claro/14 horas escuro. Foi utilizada água normatizada (ISSO 1996) para a manutenção dos peixes adultos. Para a produção de água padronizada, utilizou-se água deionizada e os seguintes sais foram adicionados: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (117 mg/L), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (49,3 mg/L), NaHCO_3 (25,9 mg/L) e cloreto de potássio (2,3 mg/L) (Sigma Aldrich).

Os peixes adultos foram alimentados com ração comercial e *Artemia salina*. Estes foram tratados de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de experimentação. O comportamento dos peixes foi avaliado por um observador humano e filmado, após 0,3,6,12,24,27,30 e 48 horas em condições normais e sob tratamento.

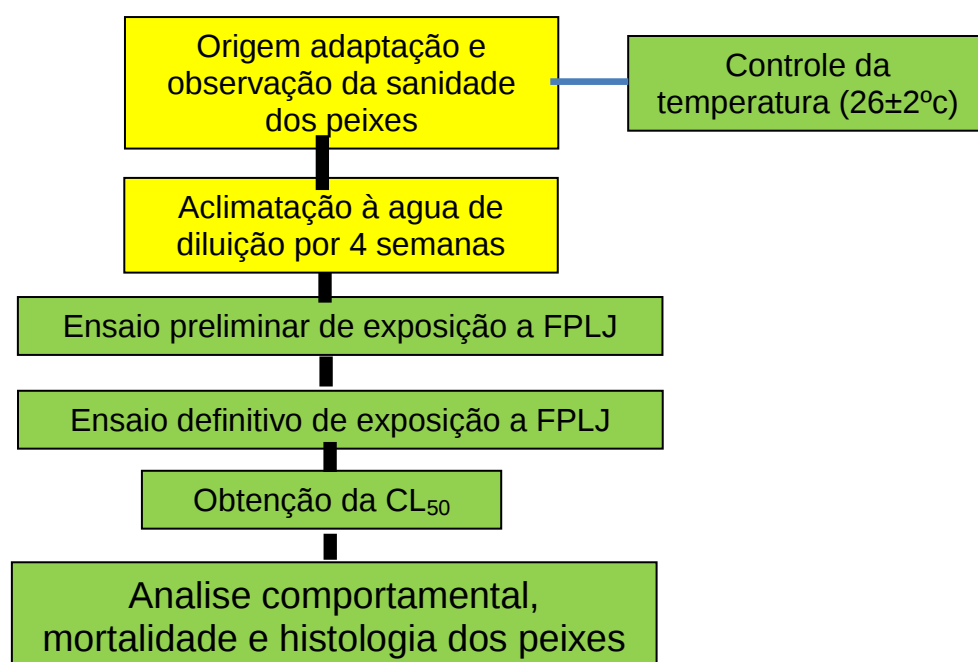


Figura 8 Fluxograma com o resumo da metodologia experimental

4.3.3 Determinação da CL_{50}

Em aquário de vidro de 1 litro a FPLJ, foi pesada, e diluída em diferentes concentrações (500, 750, 1000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$) para obtenção da concentração letal média (CL_{50}). Sendo assim, cada concentração foi realizada em triplicata

(Figura 9), utilizando-se 15 animais para cada concentração e os peixes permaneceram em contato com a solução por 48 horas.



Figura 9: Exposição de *D. rerio* a diferentes concentrações da FPLJ.

4.3.4 Avaliação dos parâmetros comportamentais

A análise comportamental foi realizada através da exposição de 5 peixes (triplicata $n=15$) em cada aquário contendo as soluções testadas durante 48 horas. Nesse período foi observado o comportamento dos peixes após a aplicação de FPLJ. O comportamento foi avaliado por um observador humano e filmado, após: 0, 3, 6, 12, 24, 27, 30 e 48 horas da exposição a FPLJ. As reações comportamentais foram caracterizadas em três estágios seguindo o protocolo descrito Ribeiro (2013):

- ✓ Estágio I: 1) aumento na atividade do nado; 2) espasmos e 3) tremores no eixo da cauda;
- ✓ Estágio II: 1) Nado circular e 2) Perda de postura
- ✓ Estágio III: 1) Perda da motilidade; 2) Deposição do animal no fundo aquário e 3) Morte

4.3.5 Monitoramento da mortalidade

A mortalidade foi monitorada continuamente, e os peixes foram considerados mortos quando o movimento do opérculo e resposta a estímulos mecânicos já não puderam ser detectados. Após o término do experimento, os peixes restantes foram eutanasiados por anestesia por resfriamento, seguindo a recomendação da AVMA (American Veterinary Medical Association) Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition Members.

4.3.6 Avaliação dos parâmetros histopatológicos

Para avaliação histológica, os órgãos (brânquias, fígado e rim) foram fixados em solução de Bouin por 24 horas. Os peixes fixados tiveram as nadadeiras removidas e calda seccionada na linha que vai do ânus até a porção posterior da nadadeira dorsal, este procedimento reduz o tamanho dos blocos, o que facilita a microtomia. Em seguida, após a fixação as peças foram descalcificadas em solução de EDTA a 7% por 48 horas. As metades foram desidratadas em bateria de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina (em lentilhas, Inlab®), como se segue:

Desidratação:

- Álcool 70% (1 hora)
- Álcool 80 % (1 hora)
- Álcool 90% (1 hora)
- Álcool absoluto I (1 hora)
- Álcool absoluto II (1 hora)

Diafanização:

- Xilol I (40´)
- Xilol II (40´)

Impregnação:

- Parafina I (1 hora)
- Parafina II (2 horas)

Inclusão:

- Parafina Pura

Os blocos foram cortados longitudinalmente em micrótomo rotativo automático (Slee Medical, cut 6062) com navalhas descartáveis (Slee) na espessura de 5 µm. Para a realização dos cortes os peixes foram posicionados em decúbito lateral. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro para microscopia óptica, as quais foram dispostas por 25 minutos em estufa 50°C para a secagem e melhor aderência do material.

O material foi corado em HE (Hematoxilina de Harris- Laborclin e eosina amarelada- Inlab), de acordo com o seguinte protocolo:

- Xilol 100 % (10')
- Álcool absoluto I (3')
- Álcool absoluto II (3')
- Álcool 95% (3')
- Álcool 80% (3')
- Álcool 70% (3')
- Água destilada (apenas mergulhar e retirar)
- Hematoxilina (3')
- Água destilada (5')
- Eosina (6')
- Água destilada (apenas mergulhar e retirar)
- Álcool 70% (10'')
- Álcool 80% (10'')
- Álcool 90% (10'')
- Álcool absoluto I (10'')
- Álcool absoluto II (1')
- Xilol 100% (1')
- Montagem da lâmina com Bálsamo do Canadá

Para a análise dos órgãos dos peixes submetidos aos testes de toxicidade, foram preparadas 4 lâminas por peixe, com cada lâmina contendo

de 4 a 6 cortes. Estes foram realizados “de dentro para fora” do peixe, ou seja, como os peixes foram incluídos em metades, foi possível iniciar os cortes da espinha dorsal em direção à pele. Esse procedimento, diminui o desgaste da peça. Em seguida, os cortes foram observados em microscópio óptico Olympus-micronal BX41 e fotografados com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital) (Figura 10). Além deste procedimento foi feita análise por microscopia eletrônica de varredura (Microscópio: Hitachi TM3030PLUS)



Figura 10: algumas etapas do processo de confecção dos cortes histológicos.
Fonte: Própria

4.3.7 Método de análise do material preparado

Para a análise das lâminas foi considerada uma série de alterações histopatológicas nas brânquias, fígado e rins, conforme mostram os quadros 1,2 e 3, que foram classificadas em ordem de gravidade em que as ocorrências foram registradas. Isso possibilitou a aplicação de dois índices para a avaliação das alterações. Um deles é o VMA (valor médio de avaliação), proposto por

Schwaiger e colaboradores (1997), calculado a partir da análise semiquantitativa baseada em uma escala de severidade e ocorrência das lesões:

Grau 1: sem alterações patológicas;

Grau 2: alterações pontuais brandas e moderadas;

Grau 3: alterações patológicas severas e amplamente distribuídas.

Estes valores foram determinados separadamente para cada órgão de cada animal e a média e o erro padrão entre os peixes de cada local foram calculados. O outro índice utilizado foi o IAH (índice de alterações histológicas) utilizado por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) na avaliação de efeitos crônicos da poluição nas brânquias de três espécies de peixes ciprinídeos. Este índice foi baseado em uma lista de lesões brânquiais, sendo cada tipo de lesão classificado, conforme a severidade, em estágios I, II e III.

De acordo com os autores, os estágios são assim descritos:

Estágio I: alterações que não comprometem o funcionamento do tecido

Estágio II: alterações mais severas que comprometem o funcionamento normal do órgão.

Estágio III: alterações muito severas ou irreversíveis.

A partir dessa classificação das lesões em estágios, os autores assumiram empiricamente que a cinética das alterações tem um crescimento exponencial. Então:

a) para o primeiro estágio: 10^0

b) para o segundo estágio: 10^1

c) para o terceiro estágio: 10^2

Assim, os índices foram calculados de acordo com a seguinte equação:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^{na} ai + 10 \sum_{i=1}^{nb} bi + 10^2 \sum_{i=1}^{nc} ci}{N}$$

Sendo:

a: primeiro estágio de alterações

b: segundo estágio de alterações

c: terceiro estágio de alterações

na: número de alterações consideradas como sendo de primeiro estágio

nb: número de alterações consideradas como sendo de segundo estágio

nc: número de alterações consideradas como sendo de terceiro estágio

N: número de peixes analisados por tratamento

No presente trabalho, esta equação foi utilizada para calcular o índice de alterações não só nas brânquias, mas também nos rins e fígado. Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) estabeleceram, ainda, as seguintes relações entre os valores e os efeitos nas brânquias. No presente trabalho essas relações foram extrapoladas para os rins e o fígado. Então, de maneira geral, as relações ficaram assim estabelecidas:

Valores	Efeitos
0-10	órgão funcionalmente normal
11-20	órgão com alterações de leves a moderadas
21-50	órgão com alterações de moderadas a graves
>100	Órgão com danos irreversíveis

Quadro 1 Alterações histológicas consideradas na análise das brânquias de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações de FPLJ

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
a) hipertrofia e Hiperplasia do tecido respiratório	
Hipertrofia das células epiteliais	I
Adelgamento epitelial	I
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I
Ruptura epitelial	II
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I
Hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias	I
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	II
Degeneração celular	II
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I
b) Alterações nas células mucosas e cloreto	
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células mucosas	I
Presença de células mucosas nas lamelas secundárias	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células de cloreto	I
Presença de células de cloreto nas lamelas secundárias	I
c) Alterações nos vasos sanguíneos lamelares	
Dilatação dos capilares	I
Desarranjo dos capilares	I
Congestão vascular	I
Hemorragia causada por ruptura de capilares	II
Aneurisma lamelar	II
d) Estágio terminal	
Fibrose	III
Necrose	III
e) Parasitas branquiais	
Presença de parasitas	I

O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

Quadro 2 Alterações histológicas consideradas na análise dos fígados de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações de FPLJ

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
a) Alterações nos hepatócitos	
Desarranjo dos cordões hepáticos	I
Perda ou atipia do contorno celular	I
Perda ou atipia do contorno nuclear	I
Aumento do volume celular	I
Aumento do volume nuclear	I
Atrofia nuclear	II
Intensa vacuolização citoplasmática	I
Vacuolização Nuclear	II
Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos	I
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Rompimento celular	II
Diminuição do glicogênio	I
Estagnação biliar	I
b) Alterações nos vasos sanguíneos	
Aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
Aumento do volume relativo dos vasos	I
c) Alterações nos canalículos biliares	
Degeneração dos canalículos biliares	II
d) Estágio terminal	
Necrose (focal ou total)	III

O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Rigolin-Sá (1998) .

Quadro 3 Alterações histológicas consideradas na análise de rins de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações de FPLJ

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
a) Alterações no tecido linfoide	
Perda do contorno celular ou contorno celular atípico	I
b) Alterações nos glomérulos e túbulos renais	
Degeneração hialina tubular leve	I
Degeneração hialina tubular severa	II
Hipertrofia das células tubulares	I
Desorganização tubular	I
Desorganização glomerular	I
Degeneração tubular	II
Degeneração Glomerular	II
Aumento do espaço da Cápsula de Bowman	I
Diminuição do espaço da Cápsula de Bowman	I
Dilatação dos capilares glomerulares	I
Degeneração citoplasmática das células tubulares	II
Degeneração nuclear das células tubulares	II
Presença de túbulos em regeneração ou de “novos néfrons”	I
Presença de muitos grânulos PAS-positivos no epitélio tubular	I
Obstrução tubular	I
Aumento do lúmen tubular	I
Presença do tecido linfoide na cápsula de Bowman	II
Diminuição da frequência relativa de glomérulos	I
c) Alterações nos vasos sanguíneos	
Dilatação dos vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura dos vasos sanguíneos	II
d) Estágio terminal	
Necrose	III

O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Rigolin-Sá (1998) e em alterações descritas por Takashima e Hibiya (1995).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores da CL_{50} mais seus intervalos de confiança de 95% foram calculados pela análise de probitos utilizando o Software GraphPad Prism versão 5.0. Para análise dos dados histológicos aplicou-se ANOVA (one-way) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação dos grupos teste e controle. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Resultados com $p < 0.05$, $p < 0.01$ e $p < 0.001$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEOR DE SÓLIDOS DA FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE LEITE DE JANAGUBA

A FPLJ teve o teor de sólidos estimado através de liofilização em triplicata (Tabela 2). Sendo assim, o rendimento obtido foi de 1,85%, este foi considerado para calcular a quantidade da FPLJ, dissolvida para a obtenção das concentrações testadas.

Tabela 2 Teor de sólidos da FPLJ

Triplicata	01	02	03
Teor de sólidos	1,35	1,37	2,83

Média: 1,85 %; Desvio Padrão: $\pm 0,85$

A FPLJ como já discutido anteriormente é o látex que exsuda da janaguba, sendo diluído 1:10 em água. O mesmo é comercializado em localidades da região nordeste, onde possui diversas indicações pela medicina popular.

Vale e colaboradores (2014) obtiveram o rendimento por liofilização do extrato etanólico das cascas de *Himatanthus articulatus* (Woodson, 1937) equivalente a 16,82%. Entretanto, Vilhena (2012) obteve um rendimento de 3,64% do extrato de *H. articulatus*, por maceração. Tal diferença nos rendimentos pode ser explicada pelas diferentes técnicas utilizadas.

Outro estudo realizado por Sousa (2009) alcançou rendimento de 20,12% do extrato metanólico de folhas de *H. drasticus*. Neste estudo, realizou-se três extrações a frio, do material triturado em metanol, submetido a extração contínua (48 horas para cada extração), seguidamente estes foram filtrados e evaporados a vácuo.

5.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE *D. rerio* SOB TRATAMENTO COM FITOPREPARAÇÃO POPULAR A BASE DE LEITE DE JANAGUBA

A exposição através de imersão do *D. rerio* às diferentes concentrações da FPLJ desencadearam expressivas alterações comportamentais nos peixes apenas nas concentrações mais elevadas (1000 e 1500 µg/mL). Tais alterações foram classificadas em três estágios: I, II e III (Tabela 3). Ribeiro (2013) classificou as alterações comportamentais de *D. rerio* em três estágios ao expor esses organismos ao extrato etanólico de Jambu (*Spilanthes acmella*) e observou que essas alterações iniciam com o aumento da excitabilidade do animal, culminando com a perda da postura. Custódio (2015) também utilizou esta classificação para avaliar as alterações comportamentais frente ao tratamento com nanoemulsão de álcool perílico.

O comportamento dos peixes foi filmado por dois minutos durante os intervalos de observação. A ação tóxica da FPLJ variou de acordo com a concentração administrada, nas duas concentrações menores os peixes apenas manifestaram alterações mais brandas e em menor frequência, enquanto que nas duas concentrações maiores, severas alterações comportamentais foram observadas. A manifestação de sinal de estresse e fuga (aumento da atividade de nado) esteve presente em todas as concentrações na hora zero de exposição. Na concentração mais elevada da FPLJ (1500 µg/mL) as alterações comportamentais foram: aumento na atividade de nado, tremores no eixo da cauda, perda da motilidade, perda de postura, deposição do animal no fundo do aquário e finalmente mortes. Além destas manifestações a respiração superficial dos peixes também foi observada.

Segundo Little e colaboradores (1993) o aumento da atividade natatória é dentre as alterações comportamentais a mais importante, pois é um indicador que integra a condição interna do animal. Schreck e colaboradores (1997) descrevem que a exposição do peixe a uma situação de estresse, desencadeia o seu primeiro mecanismo de defesa, que na maioria das vezes, é o comportamento de fuga, na tentativa de diminuir a probabilidade de morte, ou

então, pode ocorrer um comportamento de economia do gasto metabólico para manter a homeostasia fisiológica geral.

Tabela 3 Alterações comportamentais das diferentes concentrações da FPLJ e controle sobre o *D. rerio* em diferentes horas de observação.

Alterações comportamentais das diferentes concentrações da FPLJ e controle sobre <i>D. rerio</i>						
		500 µg/mL de FPLJ	750 µg/mL de FPLJ	1000 µg/mL de FPLJ	1500 µg/mL de FPLJ	Controle
Estágio I	0´	1	1	1	1,3	
Estágio II	0´		1	1,2	1,2	
Estágio III	0´				2,3	
Estágio I	3hs			1	2	
Estágio II	3hs			1	1,2	
Estágio III	3hs			2,3	2,3	
Estágio I	9hs			1		
Estágio II	9hs					
Estágio III	9hs		2		2	
Estágio I	24hs			1		
Estágio II	24hs					
Estágio III	24hs			2,3	2,3	
Estágio I	27hs			1		
Estágio II	27hs					
Estágio III	27hs				2	
Estágio I	33hs			1		
Estágio II	33hs					
Estágio III	33hs				2	
Estágio I	48hs			1		
Estágio II	48hs					
Estágio III	48hs				2	

Estágio I: 1) aumento na atividade de nado, 2) espasmos e 3) tremores no eixo da cauda; Estágio II: 1) nado circular e 2) perda da postura; Estágio III: 1) perda da motilidade, 2) deposição do animal no fundo do aquário e 3) morte.

As alterações comportamentais reportadas por Ribeiro (2013) (aumento da atividade de nado, tremores no eixo da cauda, perda da motilidade/postura deposição do animal no fundo do aquário e mortes) na concentração de 0,17

mg/mL (170 µg/mL) de extrato etanólico de Jambu, são semelhantes as duas maiores concentrações da FPLJ (1000 e 1500 µg/mL).

Souza (2015) cita que nas concentrações de 35 e 50 µg/L de nanoemulsão de álcool perílico apresentaram alterações como: aumento da atividade de nado, tremores no eixo da cauda, perda da motilidade/ postura deposição do animal no fundo do aquário e mortes. Estas alterações também foram similares as alterações comportamentais apresentadas com o tratamento com as duas maiores concentrações de FPLJ (1000 e 1500 µg/mL).

5.3 DETERMINAÇÃO DA CL₅₀

A tabela 4 apresenta o percentual de animais mortos pelas diferentes concentrações da FPLJ. Tais resultados demonstram a susceptibilidade de *D. rerio* a FPLJ, em testes preliminares concentrações entre 20 a 100 µg/mL não foram capazes de provocar nenhuma morte. Em contrapartida, nenhuma concentração testada foi capaz de provocar 100% de mortalidade.

Tabela 4 Número e porcentagem de animais mortos pelas diferentes concentrações de FPLJ sobre *D. rerio*

Número e porcentagem de animais mortos nas diferentes concentrações de FPLJ sobre <i>D. rerio</i>					
Concentração	500 µg/mL	750 µg/mL	1000 µg/mL	1500 µg/mL	Controle
Número de animais mortos	0	0	4	13	0
Porcentagem (%)	0	0	26,7	86,6	0

Para a determinação da concentração letal média (CL₅₀), estes dados foram plotados no gráfico (Figura 11), foi considerado apenas três concentrações de exposição, visto que 500 e 750 µg/mL da FPLJ não ocasionaram mortes. Sendo assim, a CL₅₀ foi estimada em 1188,54 µg/mL.

Na literatura ainda não está estabelecido uma concentração limite onde a substância passa a ser considerada não tóxica para peixes, em especial a espécie *D. rerio*. Tal limite em roedores já está bem estabelecido na literatura.

Sendo assim, resta comparar os valores de CL_{50} entre as diferentes substâncias já estudadas, que em *D. rerio* são em sua grande maioria nanoformulações e poluentes ambientais.

A CL_{50} estimada, por Ribeiro (2013), do extrato etanólico de Jambu foi de 170 $\mu\text{g/mL}$. Este valor demonstra a baixa toxicidade da FPLJ, cujo a CL_{50} é aproximadamente sete vezes maior. Sendo assim, a comparação com é de interessante valia, pois se pode notar o padrão de toxicidade de produtos naturais, que pode se manifestar de 170 até 1188,54 $\mu\text{g/mL}$. Tais aferições podem servir como base para futuros estudos, que busquem caracterizar a resposta toxicológica em *D. rerio* nos mesmos moldes dos trabalhos.

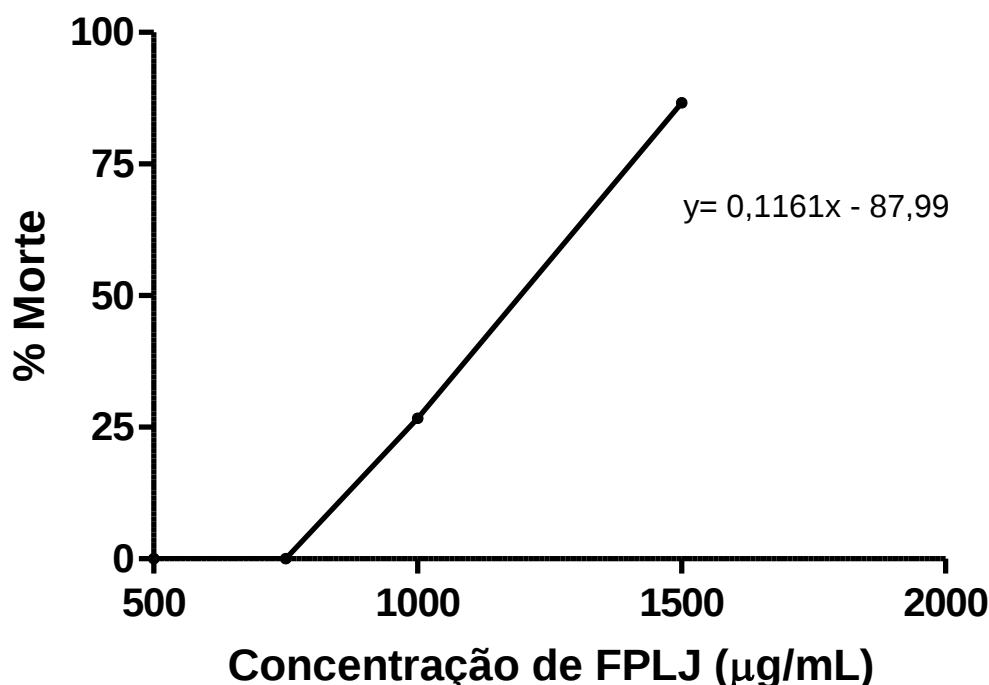


Figura 11 Efeito da administração das diferentes concentrações de FPLJ em solução (500, 750, 1000, 1500 $\mu\text{g/mL}$) sobre *D. rerio* $n=15/\text{grupo}$, $CL_{50}=1188,54 \mu\text{g/mL}$ $R_2=0,9277$.

Quando comparada com a CL_{50} de nanoformulações a baixa toxicidade da FPLJ fica ainda mais clara. Sendo assim, a CL_{50} da nanoemulsão de álcool perílico, obtida por Souza (2015), foi de 34,3 $\mu\text{g/L}$. Outro estudo realizado por Chae e colaboradores (2009) obteve a CL_{50} , em medaka (*Oryzias latipes*), de nanopartículas de prata igual 34,6 $\mu\text{g/L}$, semelhante ao valor da CL_{50} da nanoemulsão de álcool perílico. Os dados obtidos pelos estudos ratificam a alta toxicidade de compostos nanoformulados sobre a espécie *D. rerio*, pois a CL_{50}

destes produtos se manifesta em partes por bilhão ($\mu\text{g/L}$), enquanto que produtos naturais possuem sua CL_{50} em partes por milhão ($\mu\text{g/mL}$).

5.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

As brânquias de *D. rerio*, como já citado anteriormente são formadas por quatro arcos branquiais bilaterais, possuindo como ramificações as lamelas primárias e lamelas secundárias. A figura 12a representa, uma porção de um filamento branquial de *D. rerio*.

Segundo Barreto (2007) as brânquias devido o seu contato direto com a água durante as trocas gasosas são particularmente sensíveis a substâncias tóxicas dissolvidas no ambiente aquático. Já Hoffman e colaboradores (1995) reportam que as brânquias são locais de potencial absorção de agentes tóxicos presentes na água, sendo consideradas como órgão dominante na absorção de agentes tóxicos, devido as suas características como grande superfície de absorção, a pequena distância de difusão e o grande fluxo contracorrente entre água e sangue.

As alterações no tecido branquial de *D. rerio* sob tratamento, por imersão, com concentrações de FPLJ estão quantificadas na tabela 5. As alterações histológicas de estágio I como: hipertrofia do epitélio respiratório (composto pelas lamelas) e hiperplasia das células epiteliais estiveram presentes em todas as concentrações administradas.

Segundo Rigolim-Sá (1998), a proliferação do epitélio respiratório, assim como a hiperplasia maciça e fusão lamelar, dentre outras mudanças, são mecanismos de defesa das brânquias, que promovem o aumento da barreira água-sangue. A proliferação epitelial é uma resposta inicial do aparelho respiratório. A hiperplasia é uma resposta inicial do aparelho branquial caracterizada pelo aumento das funções das células e dos tecidos, provocados pelas alterações das atividades fisiológicas. Estes mecanismos são tipicamente de defesa, pois reduzem ou até mesmo, impedem totalmente a passagem da água entre as lamelas secundárias. Esta perda de superfície respiratória pode ocasionar a morte por anoxia (SMART, 1976; RAND e PETROCELLI, 1985; NOGUEIRA et al., 2011).

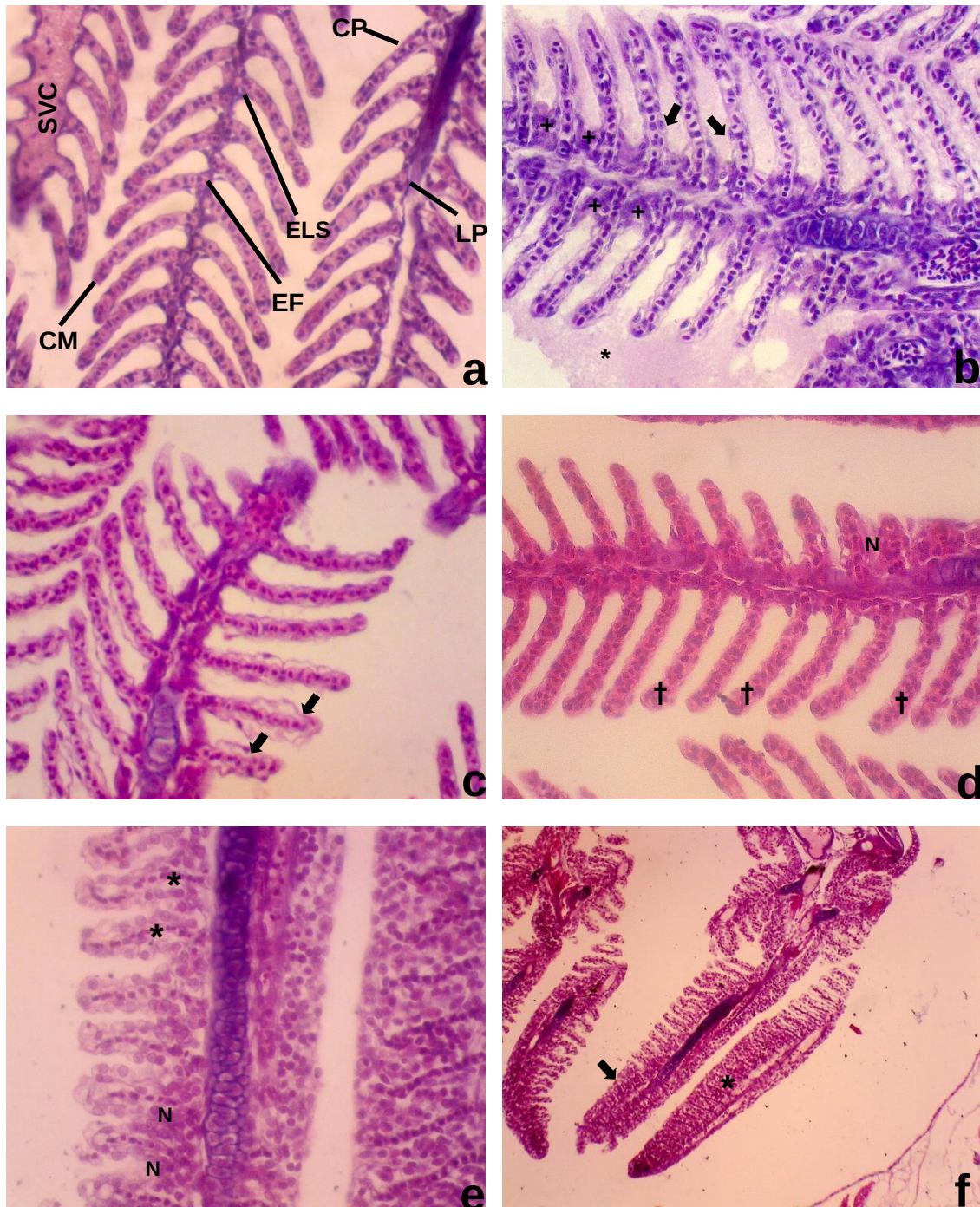


Figura 12 Alterações histopatológicas em brânquias de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações da FPLJ a) filamento branquial normal em corte longitudinal de *D. rerio*. CM- canal marginal; CP- célula pilar; EF- epitélio estratificado do filamento; ELS- epitélio pavimentoso das lamelas secundárias; LS- lamela secundária; LP- lamela primária; SVC- seio venoso central (400x). b) filamento branquial de *D. rerio* expostos a 500 µg/mL da FPLJ. Observar a hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias (+), presença de células de cloreto (seta preta), e presença de muco (*) (400x). c) filamento branquial de *D. rerio* expostos a 750 µg/mL observar o desprendimento epitelial (seta preta) (400x). d) filamento branquial de *D. rerio* exposto a concentração de 1000 µg/mL, observar a congestão vascular acompanhada de dilatação dos capilares (†) e a presença de um foco necrótico (N). e) filamento branquial de *D. rerio* exposto a concentração de 1500 µg/mL da FPLJ, notar necrose (N) e desarranjo dos capilares (*) (400x). f) brânquias de *D. rerio* expostas a concentração de 1500 µg/mL, observar a fusão de algumas lamelas (seta) e observar a fusão total de todas as lamelas primárias (*) (100x).

Tabela 5 Ocorrência das alterações histopatológicas em branquias de *D. rerio* nos grupos expostos a diferentes concentrações da FPLJ

Alteração (%)	Estágio	Controle	500 µg/mL da FPLJ	750 µg/mL da FPLJ	1000 µg/mL da FPLJ	1500 µg/mL da FPLJ
HTCE	I	0	86,6	100	100	100
ADE	I	0	0	0	0	0
D-ELS	I	0	86,6	100	100	100
HPBLS	I	0	100	100	100	100
HPLS	I	0	93,3	100	100	100
FPLS	I	0	40	66,6	66,6	100
LeuELS	I	0	0	0	0	0
HP/HTCM	I	0	60	66,6	60	93,3
HP/HTCC	I	0	13,3	93,3	60	100
CCLS	I	0	86,6	93,3	86,6	93,3
MuLS	I	0	26,6	26,6	20	93,3
DiC	I	0	100	100	93,3	100
DeC	I	0	66,6	100	93,3	100
CVASC	I	0	100	100	93,3	100
Par	I	0	0	0	0	0
FCallgLS	I	0	26,6	60,3	60,3	100
FCtodLS	II	0	0	0	0	53,3
DC	II	0	0	66,6	73,3	100
RE	II	0	0	0	66,6	100
Hem	II	0	0	0	0	0
An	II	0	0	0	20	0
Fib	III	0	0	0	0	0
Nec	III	0	0	0	66,6	86,7

Os valores representam, em porcentagem, a quantidade de peixes que apresentaram as respectivas alterações histopatológicas, do total de peixes analisados para cada concentração (N=15). HTCE= hipertrofia das células epiteliais; ADE= adelgamento do epitélio; D-ELS= Deslocamento ou elevação do epitélio da lamela secundária(LS); HPBLS= hiperplasia/hipertrofia das células mucosas; HPLS= hiperplasia ao longo das lamelas secundárias; HP/HTCM= hiperplasia/hipertrofia das células mucosas;HP/HTCC= hiperplasia/hipertrofia das células de cloreto; CCLS= células de cloreto nas LS; MuLS= presença de muco entre as LS; DiC= dilatação de capilares; DeC= desorganização de capilares; CVASC= congestão vascular; Par= presença de parasitas; FCallgLS= fusão completa de algumas LS; FCtodLS= fusão completa de todas as LS; DC= degeneração celular; RE= ruptura epitelial; Hem= hemorragia; An= aneurisma; Fib=fibrose; Nec=necrose.

A fusão de algumas lamelas secundárias esteve presente em todas as concentrações testadas, sendo mais frequente em concentrações de 750, 1000 e 1500 µg/mL. Além disso, a fusão completa de todas as lamelas secundárias se mostrou presente na maior concentração da FPLJ. Esta alteração não foi reportada por Souza (2015). Tal fato se deve provavelmente a rapidez, em ocasionar mortes, do agente tóxico utilizado pelo autor, visto que, as células do epitélio respiratório podem não ter tido tempo para proliferar e ocasionar uma fusão completa das lamelas secundárias.

Meletti (2003), cita que as células mucosas e as células de cloreto podem se tornar hiperplásicas e/ou hipertróficas em função de agentes tóxicos presentes na água. A presença das células de cloreto e células mucosas nas lamelas secundárias, bem como sua hipertrofia e hiperplasia, foi observada em todas as concentrações. Fato que demonstra o potencial de alteração do metabolismo normal destes tipos celulares quando a FPLJ é administrada.

As alterações nos vasos sanguíneos lamelares, de estágio I foram frequentes em todas as concentrações. Entretanto, a ruptura de vasos sanguíneos e consequente hemorragia não foram observadas em nenhum grupo. Houve a presença de aneurisma lamelar em apenas uma concentração (1000 µg/mL da FPLJ). Essas alterações raramente são observadas em condições normais. A infiltração de leucócitos no epitélio lamelar que também não foi diagnosticada, pode provocar aneurisma ou até mesmo hemorragia por ruptura epitelial (MELETTI, 2003).

A única alteração presente de estágio III, potencialmente mais grave, no tratamento com FPLJ foi a necrose, que se manifestou nos grupos tratados com 1000 e 1500 µg/mL. Estas foram as duas únicas concentrações que provocaram mortes. Takashima e Hibya (1995) reportaram que muitos agentes patológicos podem levar a edemas epiteliais, vacuolização e necrose das lamelas secundárias, como observado no estudo. Contudo, tal alteração compromete a função primordial das brânquias, cuja função é realizar as trocas gasosas, pondo em risco a homeostasia do organismo (MELLETTI, 2003). Vale a pena ressaltar que a degeneração celular também esteve presente em três concentrações, demonstrando que o tratamento com FPLJ, segue para manifestação necrótica em concentrações superiores a 750 µg/mL.

Os resultados quantitativos (tabela 5) e qualitativos (Figura 12), comprovam que as concentrações, provocaram alterações sobre as brânquias de *D. rerio*, quando comparadas com o controle. Quando comparado os IAH da FPLJ entre si, é possível observar que apenas a comparação entre as concentrações de 500 vs. 750 mg/mL não foi significativa (Figura 13). Além disso é possível notar que as concentrações de 1000 e 1500 foram responsáveis pelos maiores IAH.

Diferentemente do padrão de toxicidade obtido por Souza (2015), onde as menores concentrações de NPOH provocaram os maiores IAH, a exposição a FPLJ demonstrou possuir um maior IAH nas maiores concentrações. Provavelmente tal diferença se deve ao tempo em que a mortalidade dos peixes ocorreu durante os experimentos, pois NPOH provocou mortalidade dos animais rapidamente nas maiores concentrações, enquanto a FPLJ possui um tempo de sobrevivência maior. Mesmo a maior concentração testada da FPLJ não provocou 100 % de mortalidade.

Segundo o VMA as brânquias mesmo apresentando alterações de estágio III como necrose, podem ser classificadas como órgãos funcionalmente normais. Empiricamente valores de IAH entre zero a dez classificam órgãos como funcionalmente normais segundo o VMA. A tabela 6 demonstra que as brânquias estão funcionalmente normais em todos os tratamentos com a FPLJ.

Os dados obtidos por Souza (2015), quando comparados aos destes estudos demonstram que nanocompostos são mais tóxicos as brânquias pois o IAH dos tratamentos com NPOH varia de 54 a 16,9. Diversos estudos apontam que nanocompostos podem produzir muitos efeitos tóxicos sobre as brânquias de *D. rerio*, e são diretamente relacionados ao tamanho nanométrico destes materiais, que podem causar diferentes alterações morfológicas pela fácil absorção.

Tabela 6 Média do índice de alterações histológicas (IAH) das Brânquias de *D. rerio* para cada triplicata (N=5/ 15/grupo) nas concentrações de exposição a FPLJ. Os números representam as médias dos respectivos grupos.

Triplicatas	Controle	500 µg/mL FPLJ	750 µg/mL FPLJ	1000 µg/mL FPLJ	1500 µg/mL FPLJ
01	0,0	0,80	1,46	9,46	9,53
02	0,0	0,86	1,46	8,8	10,2
03	0,0	0,67	1,46	8,87	9,53
Média	0,0	0,77	1,46	9,04	9,75
Erro Médio Padrão	±0,0	±0,56	±0,0	±0,21	±0,22

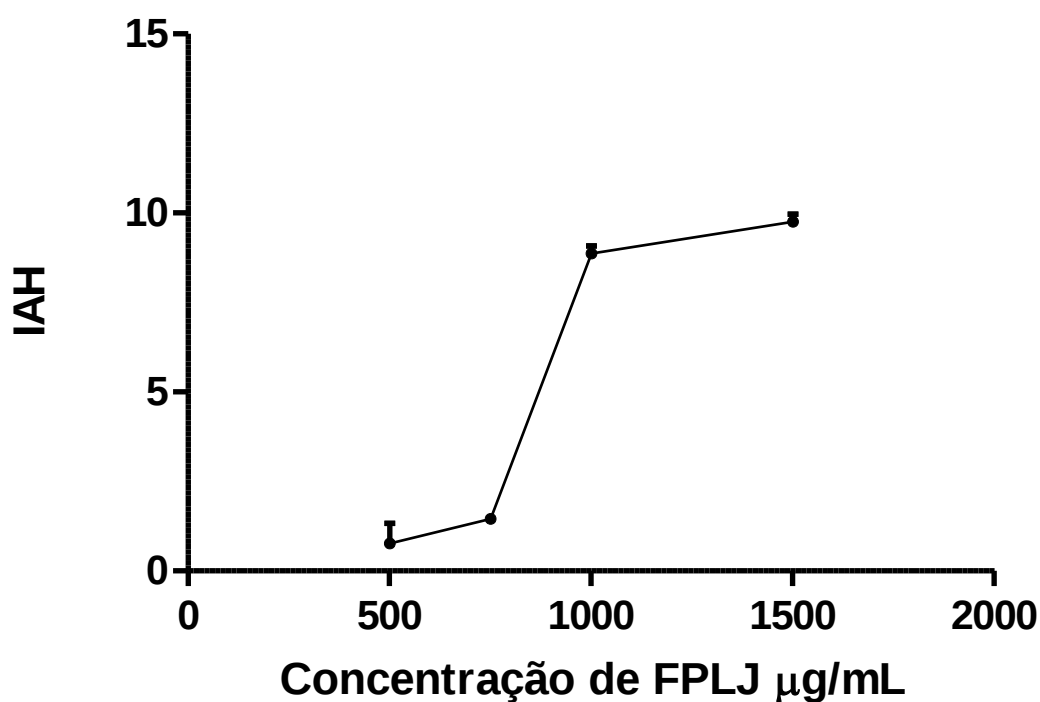


Figura 13 Média do índice de alterações histopatológicas observadas nas brânquias de *D. rerio* expostos às concentrações de FPLJ (500, 750, 100 e 1500 µg/mL). Os pontos representam a média ± EPM (Erro Padrão Médio) de N=15/grupo. ANOVA seguida de Tukey-Kramer: 500µg vs. Controle $p<0.05$; 750 µg/mL vs. Controle $p<0.001$; 1000 vs. Controle $p<0.001$; 1500 vs. Controle $p<0.001$.

O metabolismo hepático do *D. rerio* é similar ao de mamíferos e roedores. Este peixe metaboliza drogas usando vias similares as utilizadas por humanos. Eles possuem uma vasta gama de enzimas do citocromo P-450, que permitem reações metabólicas, incluindo a hidroxilação, conjugação, oxidação,

desmetilação e deetilação. Além disso, no fígado ocorre a síntese de bile, armazenamento de lipídeos e glicogênio, bem como a produção de vitelogenina, proteína presente na película que envolve o ovo (VLIEGENTHART et al., 2014; GOKSOYR e HUSOY, 1998).

O fígado de *D. rerio* apresentam alterações histopatológicas nos hepatócitos, vasos sanguíneos e canalículos biliares, sob tratamento com FPLJ. Os hepatócitos de *D. rerio* possuem aspecto típico descrito como a maioria dos vertebrados. Na tabela 7 encontram-se quantificada a ocorrência de alterações hepáticas nos peixes expostos a diferentes concentrações da FPLJ. Além disso, os dados qualitativos das alterações encontram-se na figura 14 e 15. Todas as alterações de estágio I estiveram presentes nas diferentes concentrações de tratamento. Pode-se destacar em especial a desorganização dos cordões hepáticos, perda ou atipia do contorno dos hepatócitos, intensa vacuolização citoplasmática e diminuição do glicogênio. Melleti (2003) aponta que a vacuolização citoplasmática nos hepatócitos pode ser uma medida indireta, porém não muito precisa da quantidade de glicogênio ou de lipídeos contidos neste tipo celular.

Silva (2004) reporta que a redução na quantidade de glicogênio no interior dos hepatócitos pode representar o início de uma resposta não específica ao estresse, induzida em peixes por diferentes compostos químicos. Todas as alterações de estágio I estiveram presentes nas diferentes concentrações de tratamento. Pode-se destacar em especial a desorganização dos cordões hepáticos, perda ou atipia do contorno dos hepatócitos, intensa vacuolização citoplasmática e diminuição do glicogênio. Melleti (2003) aponta que a vacuolização citoplasmática nos hepatócitos pode ser uma medida indireta, porém não muito precisa da quantidade de glicogênio ou de lipídeos contidos neste tipo celular.

Tabela 7 Ocorrência das alterações histopatológicas em fígados de *D. rerio* nos grupos expostos a diferentes concentrações da FPLJ

Alteração (%)	Estágio	Controle	500 µg/mL da FPLJ	750 µg/mL da FPLJ	1000 µg/mL da FPLJ	1500 µg/mL da FPLJ
DCH	I	0	93,3	100	100	100
P/ACCel	I	0	100	100	100	100
P/ACNuc	I	0	100	80	100	100
AVCel	I	0	100	100	93,3	100
IVCitop	I	0	60	73,4	80	100
DFRONuc	I	0	66,7	60	80	100
DGlicog	I	0	93,3	100	80	100
EstBiliar	I	0	53,4	80	80	100
ARFS	I	0	20	20	46,7	100
AVoIV	I	0	80	53,4	80	100
ANuc	II	0	46,7	86,7	93,3	100
VNuc	II	0	6,7	66,7	100	100
DCito	II	0	60	86,7	93,3	100
DNuc	II	0	26,7	73,4	93,3	100
RompCel	II	0	0	66,7	60	100
Hiperem	II	0	0	6,7	20	40
DegCBiliar	II	0	0	0	26,7	66,7
RupVaso	III	0	0	6,7	0	20
Nec	III	0	0	33,5	80	80

Os valores representam em porcentagem, a quantidade de peixes que apresentaram as respectivas alterações histopatológicas. DCH= Desarranjo dos cordões hepáticos; P/ACCel= Perda ou atipia do contorno celular; P/ACNuc= Perda ou atipia do contorno nuclear; AVCel= Aumento do volume celular; IVCitop= Intensa vacuolização citoplasmática; DFRONuc= Diminuição da frequência relativa de núcleos; ARFS= Aumento relativo do volume dos vasos; AVoIV= Aumento do volume dos vasos; ANuc= Atrofia nuclear; VNuc= Vacuolização Nuclear; DCito= degeneração citoplasmática; DNuc= degeneração nuclear; RompCel= Rompimento Celular; Hiperem= Hiperemia; DegCBiliar= Degeneração dos canalículos biliares; RupVaso= Ruptura de Vasos; Nec= Necrose.

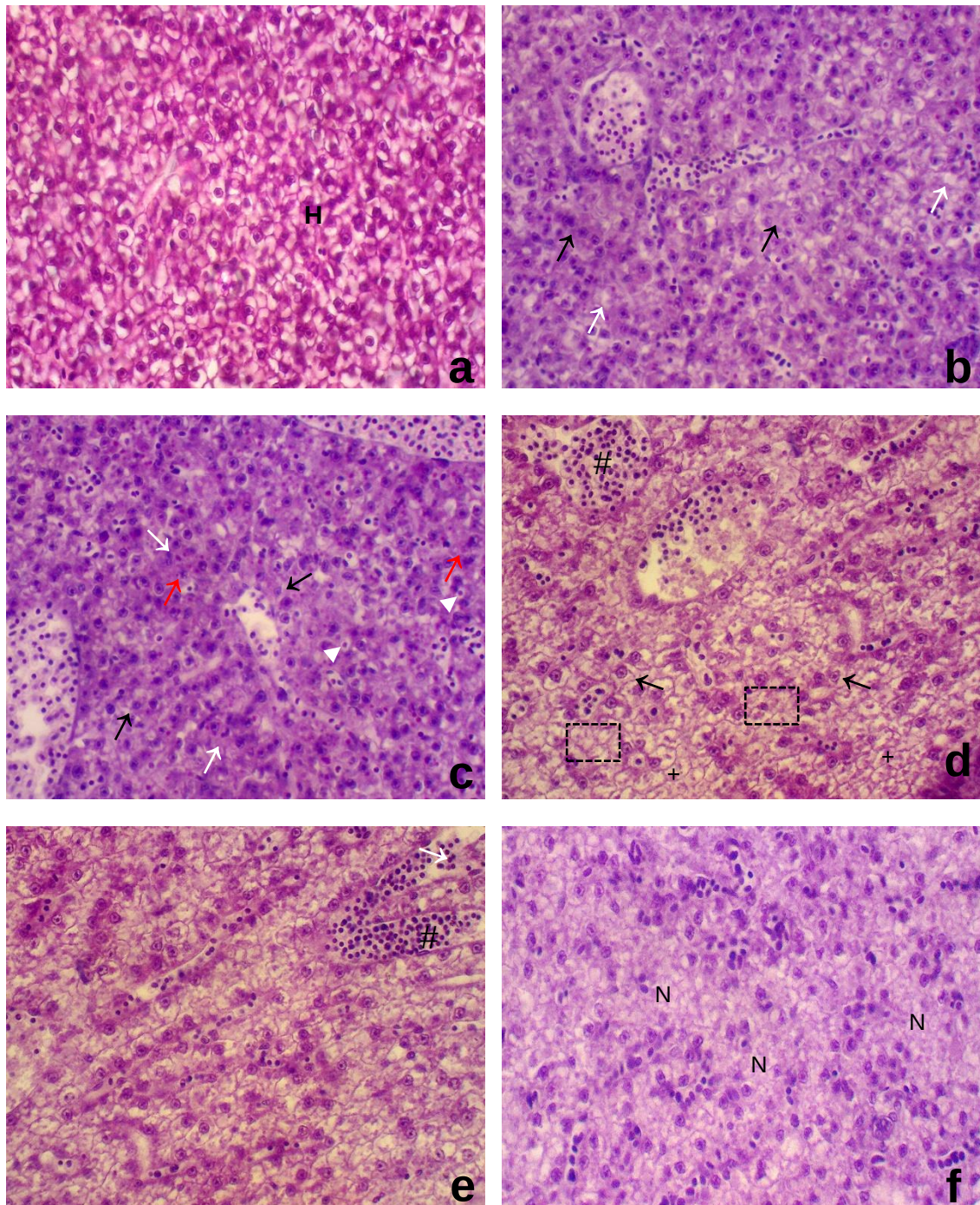


Figura 14 Alterações histopatológicas em fígados de *D. rerio* expostos a diferentes concentrações da FPLJ. a) fígado normal de *D. rerio* notar os hepatócitos (H) (400x). b) fígado de *D. rerio* exposto a concentração de 500 µg/mL notar a perda ou atipia do contorno celular (setas pretas) e desarranjo dos cordões hepáticos (setas brancas) (400x). c) fígado de *D. rerio* exposto a concentração de 750 µg/mL. Observar a atrofia nuclear (setas pretas), degeneração citoplasmática (setas brancas), estagnação biliar (cabeça das setas brancas) e degeneração nuclear (setas vermelhas) (400x). d) fígado de *D. rerio* exposto a concentração de 1000 µg/mL. Observar a diminuição de glicogênio (+), diminuição da frequência de núcleos (quadrados pontilhados) e vacuolização nuclear (setas pretas) e hiperemia (#). e) fígado de *D. rerio* exposto a concentração de 1500 µg/mL. Observar hiperemia (#), ruptura de vaso (seta branca) (400x). f) fígado de *D. rerio* exposto a concentração de 1500 µg/mL. Notar os sítios necróticos (N) (400x)

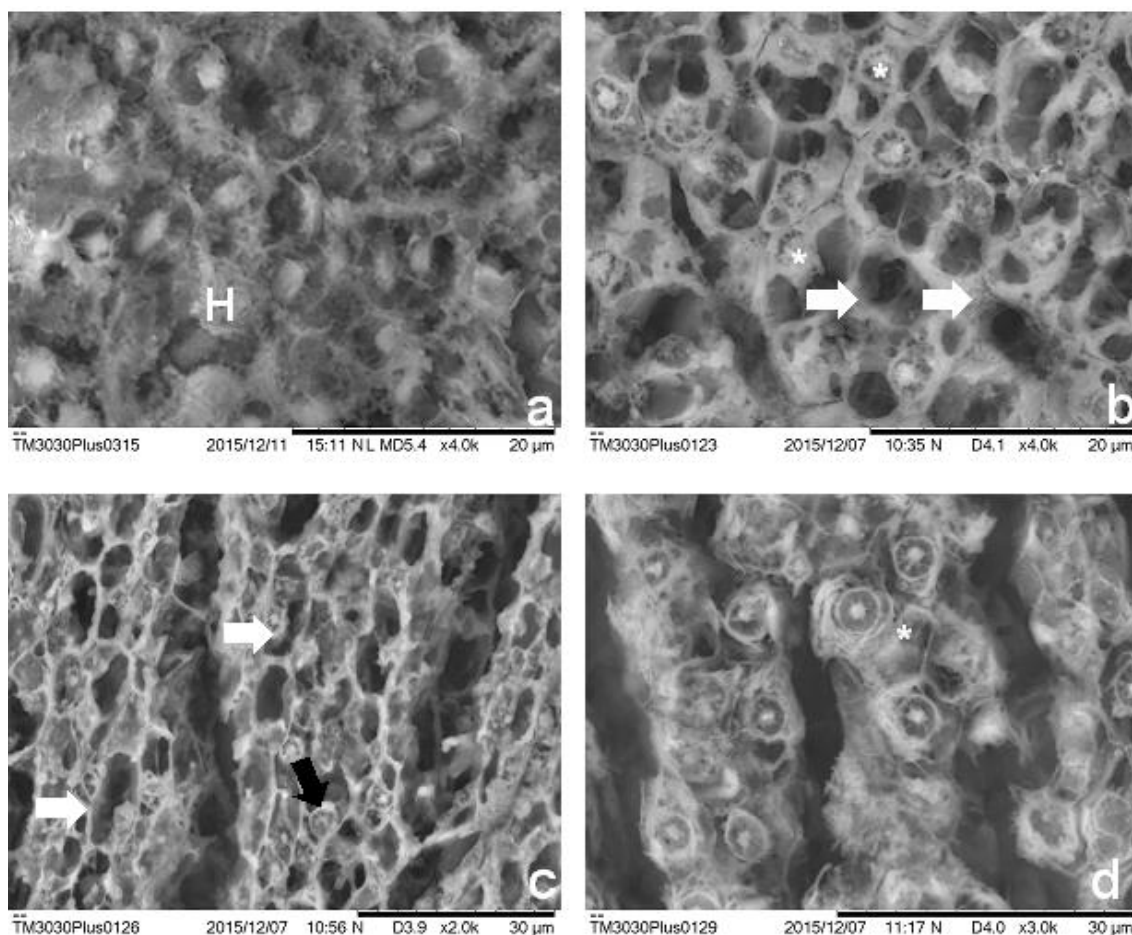


Figura 15. a) corte de fígado normal de *D. rerio* em corte longitudinal notar os hepatócitos (H) (3000x). b) corte de fígado de *D. rerio* exposto a concentração de 750 µg/mL da FPLJ. Observar atipia do contorno celular (seta), atipia nuclear (seta preta) (4000x). c) corte de fígado de *D. rerio* exposto a concentração de 1000 µg/mL. Observar atipia do contorno celular (seta), atipia nuclear (*) e vacuolização celular (#) (2000x). d) corte de *D. rerio* exposto a concentração de 1500 µg/mL. Observar a degeneração nuclear (*) (3000x).

Diversos estímulos desfavoráveis podem induzir mudanças endócrinas, que podem levar a alterações metabólicas, como por exemplo, a diminuição das reservas de glicogênio hepático.

O aumento do volume celular dos hepatócitos, alteração observada sob tratamento com FPLJ, reflete o estado hiperfuncional do fígado. Sendo assim, esta alteração pode ser explicada pelo fato deste órgão também ser em *D. rerio* o principal metabolizador de xenobióticos. O aumento da metabolização hepática também pode levar a necrose, visto que o núcleo torna-se hipertrófico ou até mesmo degenera (alteração histopatológica de estágio III), situação constatada nas três maiores concentrações de tratamento. Estas alterações na morfologia celular acarretam secundariamente a desorganização dos cordões

hepáticos, pois estes necessitam da morfologia normal para manter sua organização (VLIEGENTHART et al., 2014; SILVA, 2004).

A estagnação biliar foi outra manifestação de estágio I verificada nos tratamentos com a FPLJ em todas as concentrações. Entretanto, as concentrações que tiveram maior expressão desta alteração foram as três maiores (750, 1000 e 1500 µg/mL). A bile estagnada pode ser percebida como grânulos amarelados, amarronzados ou verdes amarronzados dentro dos hepatócitos. Esta alteração denominada como colestase, se caracterizada como manifestação de uma condição patofisiológica, atribuída a falha do metabolismo ou da excreção de pigmentos biliares. Para ser excretada a bilirrubina necessita ser solubilizada em água, processo que ocorre somente por meio da conjugação com ácido glucurônico. Contudo, a redução da capacidade de ligação da bilirrubina a este ácido pode ser a razão da disfunção hepática (TAKASHIMA e HIBYA, 1995; PACHECO e SANTOS, 2002).

As alterações de estágio II mais frequentes foram: hiperemia, degeneração e vacuolização nuclear/citoplasmática. A hiperemia pode indicar um processo de adaptação que leva ao aumento do fluxo sanguíneo no tecido hepático, facilitando o transporte de macrófagos para as regiões danificadas deste tecido e também melhorando a oxigenação destas áreas ou ainda, pode indicar um mecanismo auxiliar na desintoxicação. Alterações como degeneração nuclear e celular e deformação do contorno celular podem indicar disfunções induzidas por algum agente tóxico, uma vez que áreas metabolicamente ativas do fígado ficam reduzidas, levando a uma possível redução geral nas funções desempenhadas por este órgão (SILVA, 2004).

Quanto às alterações de estágio III, estas foram notadas nas três maiores concentrações e são representadas pelo rompimento de vasos e necrose focal ou total. Robins e Contran (2005) afirmam que necrose no tecido hepático está relacionada aos processos de intoxicação, sendo a expressão da gravidade da lesão proporcional ao tipo de lesão, duração, severidade da agressão e estado fisiológico. Karan e Poleksic (1999) observou necrose nos hepatócitos de carpas e expõe a importância de estudos histopatológicos para analisar os danos causados. North e colaboradores (2010) descrevem a ocorrência de necrose sob tratamento com paracetamol em larvas de ZF, na escala milimolar.

A tabela 7 e figura 14 e 15, mostram que as concentrações da FPLJ (750, 1000 e 1500 µg/mL) provocaram alterações significativas quando comparadas ao controle, e é válido ressaltar que a comparação entre 500µg/mL vs. Controle foi não significativa. Além disso, quando comparado os IAH do fígado sob tratamento com FPLJ entre si, é possível observar que apenas a comparação entre as concentrações de 750 vs. 1000 µg/mL não foi significativa.

As concentrações que provocaram mortalidade apresentaram órgãos com alterações de leves a moderadas. A concentração de 750 µg/mL já demonstra a tendência de dano hepático, pois a média do IAH foi de 10,9 e valores de IAH maiores ou iguais a 11 indicam órgãos com alterações moderadas a leve, segundo o VMA (Figura 16). Pode-se notar que uma réplica da concentração de 750 µg/mL (réplica 3) apresentou IAH de 11,3 indicativo de alterações leves a moderadas (Tabela 8).

A comparação com o trabalho desenvolvido por Souza (2015) onde as concentrações de NPOH provocaram alterações moderadas a graves no fígado, enquanto a FPLJ mesmo em concentrações muito superiores provocam alterações leve a moderadas. Outro ponto que merece atenção é o fato das menores concentrações de NPOH provocarem maiores alterações histológicas expressas em IAH, enquanto que mais uma vez as concentrações superiores da FPLJ causam maiores IAH.

Tabela 8 Média do índice de alterações histológicas (IAH) em fígados de *D. rerio* para cada triplicata (N=5/T-N= 15/grupo) nas concentrações de exposição a FPLJ. Os números representam as médias do IAH dos respectivos grupos.

Triplicatas	Branco	500 µg/mL FPLJ	750 µg/mL FPLJ	1000 µg/mL FPLJ	1500 µg/mL FPLJ
01	0,0	1,2	10,7	11,3	18,7
02	0,0	2,7	10,7	12	12
03	0,0	3,9	11,3	10,7	18,7
Média	0,0	2,6	10,9	11,3	16,5
Erro Médio Padrão	±0,0	±0,78	±0,2	±0,38	±2,23

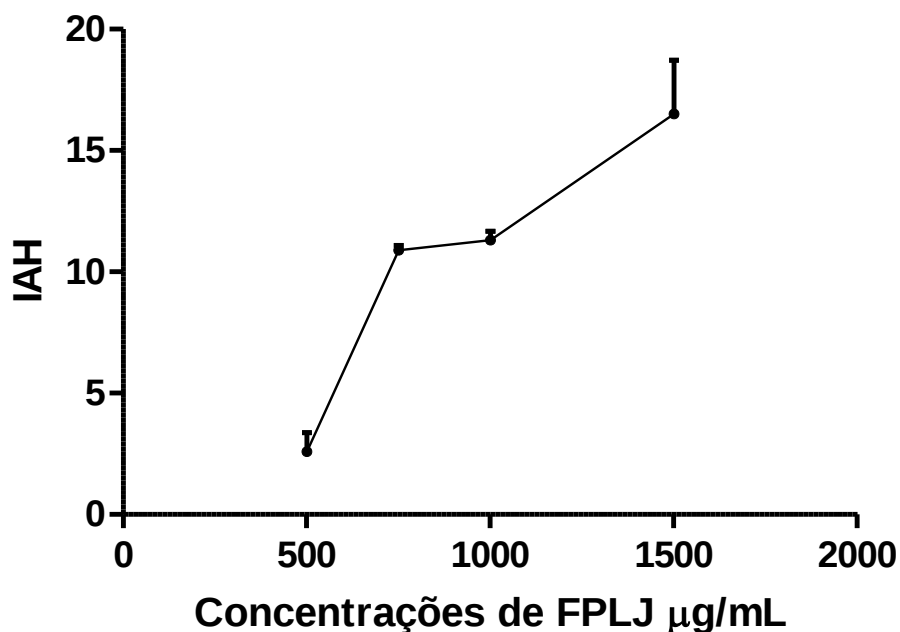


Figura 16. Média do índice de alterações histopatológicas observadas em fígados de *D. rerio* expostos às concentrações de FPLJ (500, 750, 1000 e 1500 µg/mL). Os pontos representam a média $\pm$ EPM (Erro Padrão Médio) de N=15/grupo. ANOVA seguida de Tukey-Kramer: 500µg vs. Controle não significativo; 750 µg/mL vs. Controle $p < 0.001$; 1000 vs. Controle $p < 0.001$; 1500 vs. Controle $p < 0.001$.

Como já exposto o ZF, assim como outros peixes teleósteos, excreta urina diluída. A função mais importante do rim nestes peixes é eliminar o grande volume de água que entra no corpo destes através das brânquias.

Os rins constituem a principal rota de excreção para os metabólitos de vários xenobióticos aos quais o peixe tenha sido eventualmente exposto. O rim elimina produtos químicos durante o curso de formação da urina, alguns através da filtração glomerular, outros por reabsorção ou ainda pelos processos de secreção tubular (SILVA, 2004)

Apesar deste órgão possuir diversas funções importantes a literatura até o momento é muito escassa em estudos relacionados a histopatologia renal em *D. rerio*, principalmente no que se refere a toxicologia de novas drogas.

Os rins de *D. rerio* foram facilmente identificados e presente na grande maioria dos cortes realizados para análise histológica. O corpúsculo renal, o túbulo contorcido distal possuem aspecto característico descrito por Takashima e Hibya (1995) para a maioria dos teleósteos de água doce. Não existe grande diferença na constituição entre as porções anterior e posterior do rim nessa espécie, sendo que possui muitos néfrons e tecido linfoide intersticial.

As alterações histológicas em rins de *D. rerio* foram avaliadas no tecido linfoide, glomérulos e túbulos renais e vasos sanguíneos. A tabela 9 apresenta a quantificação das alterações histopatológicas renais e as figuras 17 e 18 apresentam os dados qualitativos das alterações. Sendo assim, praticamente todas as alterações de estágio I foram observadas nas diversas concentrações de tratamento.

A obstrução tubular é uma alteração histopatológica de estágio I que merece destaque. Segundo Meletti (2003) esta alteração é classificada como um tipo de “cloudy swelling”, que se caracteriza pela presença de células epiteliais tubulares inchadas ou hipertrofiadas com grânulos finos de eosinófilos no citoplasma.

Tabela 9 Ocorrência das alterações histopatológicas em rins de *D. rerio* nos grupos expostos a diferentes concentrações da FPLJ

Alteração (%)	Estágio	Controle	500 µg/mL de FPLJ	750 µg/mL de FPLJ	1000 µg/mL de FPLJ	1500 µg/mL de FPLJ
PCTL	I	0	60	80	100	100
DHL	I	0	93,3	100	100	100
HTCT	I	0	93,3	93,3	100	100
DesT	I	0	93,3	100	100	100
DesG	I	0	93,3	86,7	93,3	100
AECB	I	0	80	46,7	33,3	20
DECB	I	0	26,6	73,3	60	93,3
DCG	I	0	20	53,3	26,6	33,3
OTR/NN	I	0	20	13,3	0	40
DFreqG	I	0	46,7	60	80	86,7
DilVasoSang	I	0	60	93,3	73,3	100
ALumTub	I	0	60	46,7	46,7	66,7
ObsTub	I	0	100	73,3	93,3	100
DHS	II	0	13,3	73,3	80	100
DegT	II	0	86,7	93,3	100	100
DegG	II	0	33,3	20	93,3	100
DCTub	II	0	86,7	73,3	100	100
DNTub	II	0	33,3	60	100	100
TLCB	II	0	53,3	60	13,3	100
Hiperem	II	0	6,7	73,3	93,3	100
RupVaso	III	0	0	0	0	40
Nec	III	0	0	53,3	66,7	100

Os valores representam, em porcentagem, a quantidade de peixes que apresentaram as respectivas alterações histopatológicas, do total de peixes analisados para cada concentração (N=15). PCTL= Perda do contorno ou contorno atípico das células do tecido linfóide; DHL= Degeneração hialina leve; HTCT= Hipertrofia das células tubulares; DesT= Desorganização tubular; DesG= Desorganização glomerular; AECB= Aumento do espaço da cápsula de Bowman; DECB= Diminuição do espaço da cápsula de Bowman; DCG= Dilatação dos capilares glomerulares; OTR/NN= Ocorrência de túbulos em regeneração ou novos néfrons; DFreqG= Diminuição da frequência relativa de glomérulos; DilVasoSang= Dilatação dos vasos sanguíneos; ALumTub= Aumento do diâmetro do lúmen tubular; ObsTub= Obstrução tubular; DHS= Degeneração hialina severa; DegT= Degeneração tubular; DegG= Degeneração glomerular; DCTub= Degeneração citoplasmática das células tubulares; DNTub= Degeneração nuclear das células tubulares; TLCB= Tecido linfóide na cápsula de Bowman; Hiperem= Hiperemia; RupVaso= Ruptura de vasos sanguíneos; Nec= necrose.

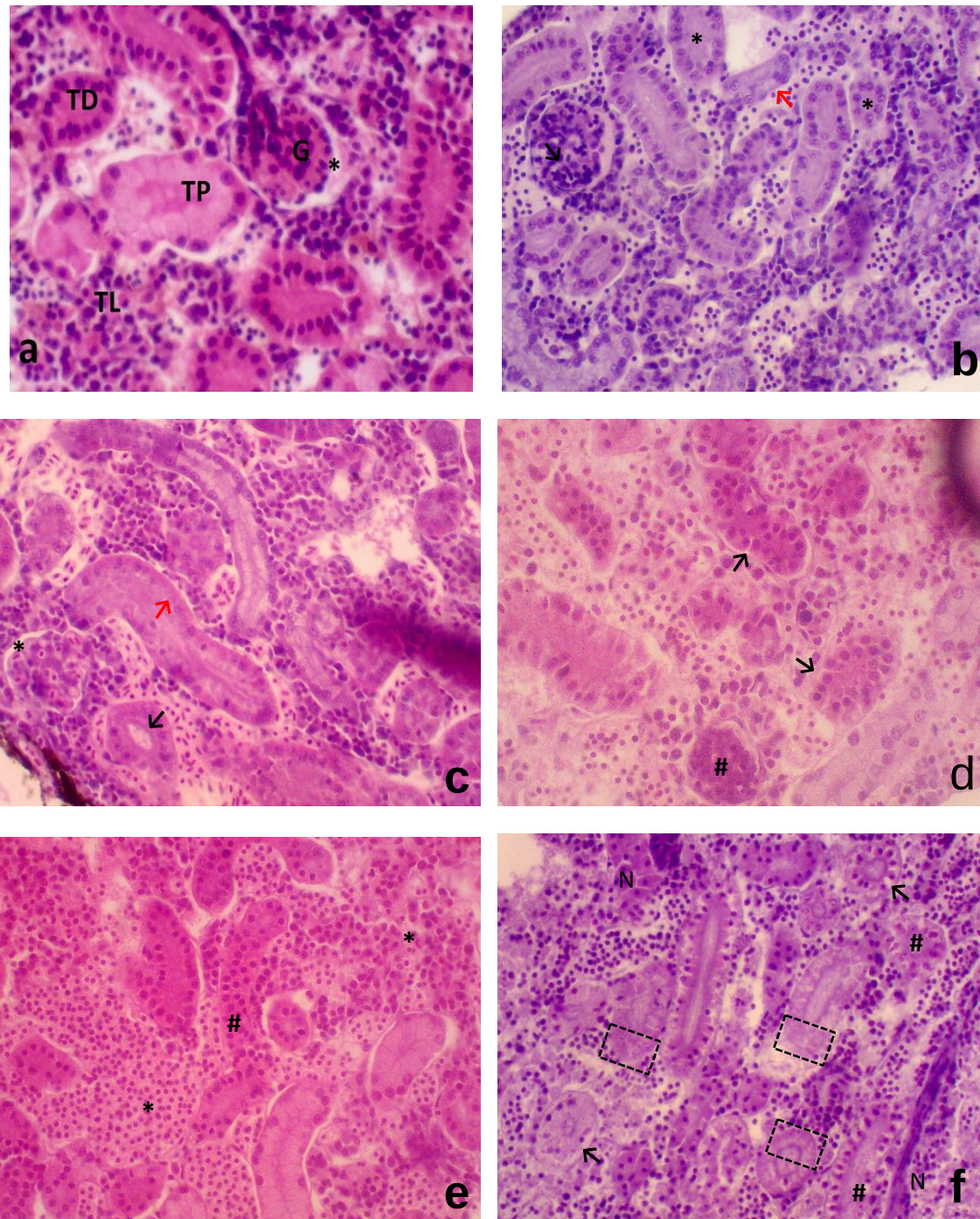


Figura 17. a) Rim normal em corte longitudinal de *D. rerio*. Notar a presença de um glomérulo (G). O asterisco mostra o espaço intercapsular. Observar o tecido linfóide (TL), o túbulo contorcido distal (TD), o túbulo contorcido proximal (TP) (400x); b) Rim de *D. rerio* exposto a 500 µg/mL da FPLJ. Observar a dilatação dos capilares glomerulares (seta preta), obstrução tubular (*) e desorganização tubular (seta vermelha) (400x). c) Rim de *D. rerio* exposto a 750 µg/mL (400x). Notar a diminuição da Cápsula de Bowman (*), aumento do lúmen tubular (↑), degeneração citoplasmática (seta vermelha). d) Rim de *D. rerio* exposto a concentração de 1000 µg/mL da FPLJ (400x). Observar a degeneração glomerular (#) e degeneração hialina leve (↑) e) Rim de *D. rerio* de 1000 µg/mL da FPLJ(400x). Observar a degeneração tubular (#) e hiperemia (*) f) Rim de *D. rerio* exposto a 1500 µg/mL. Observar a degeneração nuclear (área pontilhada), degeneração tubular (#), necrose (N) e degeneração hialina tubular severa.

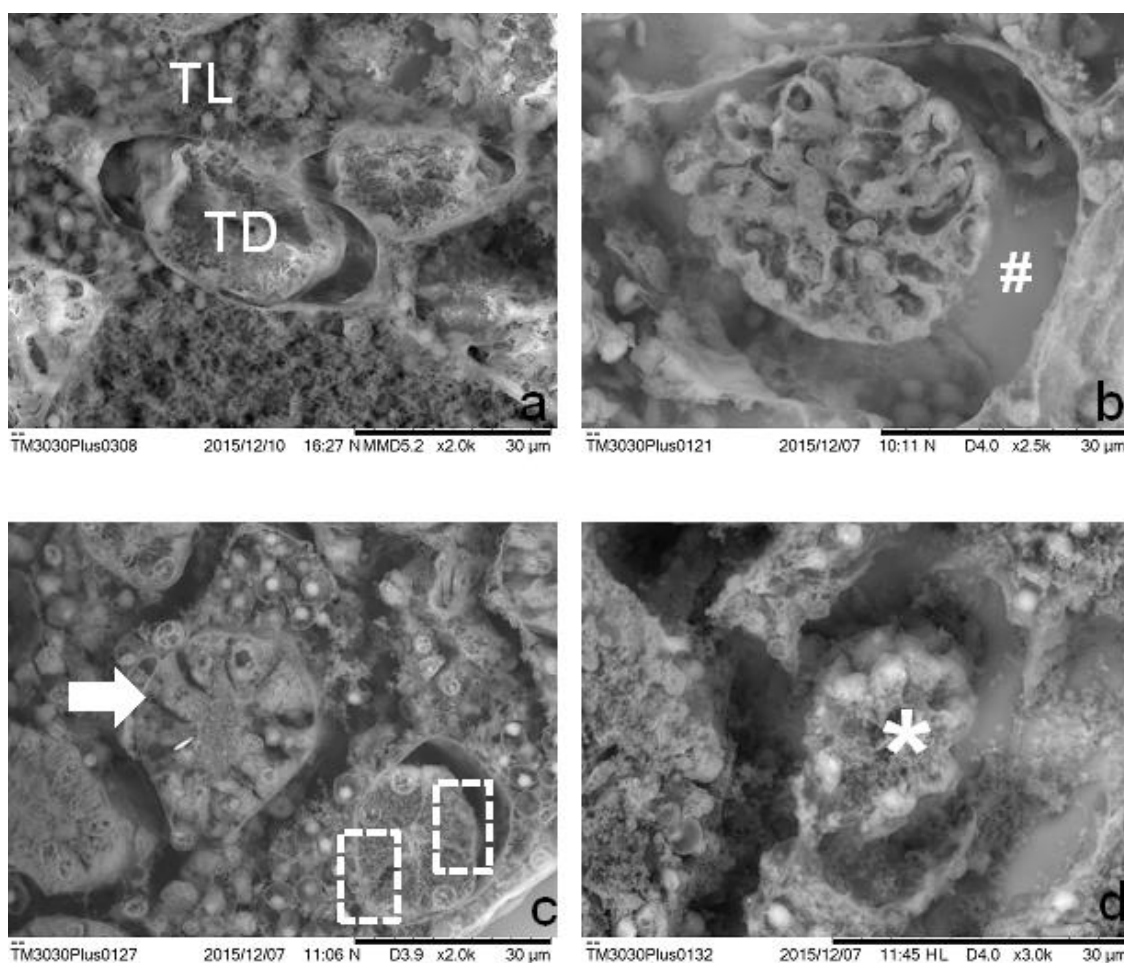


Figura 18. a) Rim normal em corte longitudinal de *D. rerio*. Notar a presença de tecido linfóide (TL) e túbulo contorcido distal (TD) (2000X). b) Rim de *D. rerio* exposto a concentração de 750 µg/mL observar o aumento do espaço da cápsula de Bowman (#) (2500x). Rim de *D. rerio* exposto a 1000 µg/mL notar a degeneração hialina severa (seta), degeneração nuclear das células tubulares (área pontilhada) (2000x). d) Rim de *D. rerio* exposto a 1500 µg/mL notar a degeneração glomerular (*) (3000x).

A degeneração hialina também foi observada nas concentrações de tratamento. Esta alteração caracteriza-se pela presença de grandes grânulos eosinófilos, que segundo Takashima e Hibiya (1995) e Hiton e Laures (1990) podem ser produzidos dentro da própria célula ou formados pela reabsorção do excesso de substâncias proteicas eventualmente formadas pelo glomérulo. Melleti (2003) afirma que grande parte das alterações tubulares observadas nos rins de *D. rerio* são provocada por distúrbios metabólicos causados por agentes tóxicos. Ainda de acordo com Takashima e Hibiya (1995), a maioria das alterações tubulares são degenerativas que culminam muitas vezes em necrose. A necrose foi classificada neste estudo como alteração de estágio III,

sendo observada nas três maiores concentrações de exposição a FPLJ. Assim como o trabalho desenvolvido por Souza (2015), que estudou a toxicidade de NPOH utilizando a mesma plataforma de teste, a manifestação de necrose foi proporcional ao aparecimento de: hipertrofia das células epiteliais e degeneração hialina leve e severa.

O rim recebe grande fluxo sanguíneo, a presença de compostos químicos no sangue pode levar a algumas mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, levando a redução do espaço de Bowman. Esta alteração pode comprometer o processo de filtração do sangue e toda função renal (Hinton et al., 1992; Takashima & Hibiya, 1995; SILVA, 2004). Essas alterações histopatológicas foram percebidas em todas as concentrações de tratamento com FPLJ de maneira crescente, no que se refere à porcentagem de ocorrência. Enquanto, que a outra alteração histopatológica referente a capsula de Bowman (AECB), se manifestou de maneira decrescente.

O aparecimento de células sanguíneas, agregados de células sanguíneas ou de matéria estranha no espaço de Bowman também pode ocorrer (Hinton et al., 1992; Takashima & Hibiya, 1995; SILVA, 2004). Às vezes o excesso de hemácias nos capilares pode levar ao rompimento desses vasos e, nesse caso, é comum encontrar hemácias no espaço de Bowman. Fato que só foi observado apenas na maior concentração de tratamento com FPLJ (1500 µg/mg), sendo classificada como uma alteração de estágio III.

A dilatação dos capilares glomerulares, degeneração glomerular foram alterações frequentes em todos os grupos expostos a FPLJ. Segundo Takashima e Hibiya 1995, as ocorrências dessas alterações se dão em condições patológicas devido alterações da lâmina basal, e normalmente são acompanhadas por alterações nos podócitos e das células endoteliais, como a hiperplasia.

A ocorrência de novos néfrons ou túbulos em regeneração foi pouco comum nos grupos tratados com FPLJ. Túbulos renais pré-existentes podem ser frequentemente regenerados após serem danificados por algumas doenças ou até mesmo agentes tóxicos (TAKASHIMA E HIBIYA, 1995). Segundo Hinton & Laurén (1990) a regeneração tubular em peixes pode ser uma boa indicação

de adaptação e recuperação. Além disso, Após dano renal induzido por agentes tóxicos, pode haver a produção de néfrons inteiramente novos (REIMSCHUESSEL, 2001; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995). Entretanto, pode-se encontrar novos néfrons em peixes de águas não poluídas, sem a presença de agentes tóxicos ou xenobióticos.

A tabela 10 e figura 19, demonstram que as concentrações da FPLJ (500, 750, 1000 e 1500 µg/mL) provocaram alterações renais significativas quando comparadas ao controle. Além disso, quando comparado os IAH dos rins sob tratamento com FPLJ entre si, é possível observar que a apenas a comparação entre as concentrações de 750 vs. 1000 µg/mL não foi significativa. Este fato pode ser explicado pela composição fitoquímica da espécie vegetal *H.drasticus*, que apresenta marcadores fitoquímicos como plumerídeo, isoplumerídeo, que são caracteristicamente apolares.

As concentrações que provocaram mortalidade apresentam rins com alterações de leves a moderadas. A concentração de 750 µg/mL já provoca alterações deste nível, expondo que já existe dano renal nessa concentração.

Souza (2015) reporta que as concentrações de exposição a NPOH, bem como do tensoativo utilizado provocaram alterações renais moderadas a grave, que são amplamente distribuídas pelo órgão em concentrações na escala de µg/mL.

Tabela 10 Média do índice de alterações histológicas (IAH) em rins de *D.rerio* para cada triplicata (N=5/T-N= 15/grupo) nas concentrações de exposição a FPLJ. Os números representam as médias do IAH dos respectivos grupos.

Triplicatas	Branco	500 µg/mL FPLJ	750 µg/mL FPLJ	1000 µg/mL FPLJ	1500 µg/mL FPLJ
01	0,0	2,73	11,53	12,2	18,67
02	0,0	3,4	12,06	11,33	18,86
03	0,0	4,2	11,53	11,53	18,67
Média	0,0	3,44	11,70	11,68	18,73
Erro Médio Padrão	±0,0	±0,42	±0,17	±0,26	±0,06

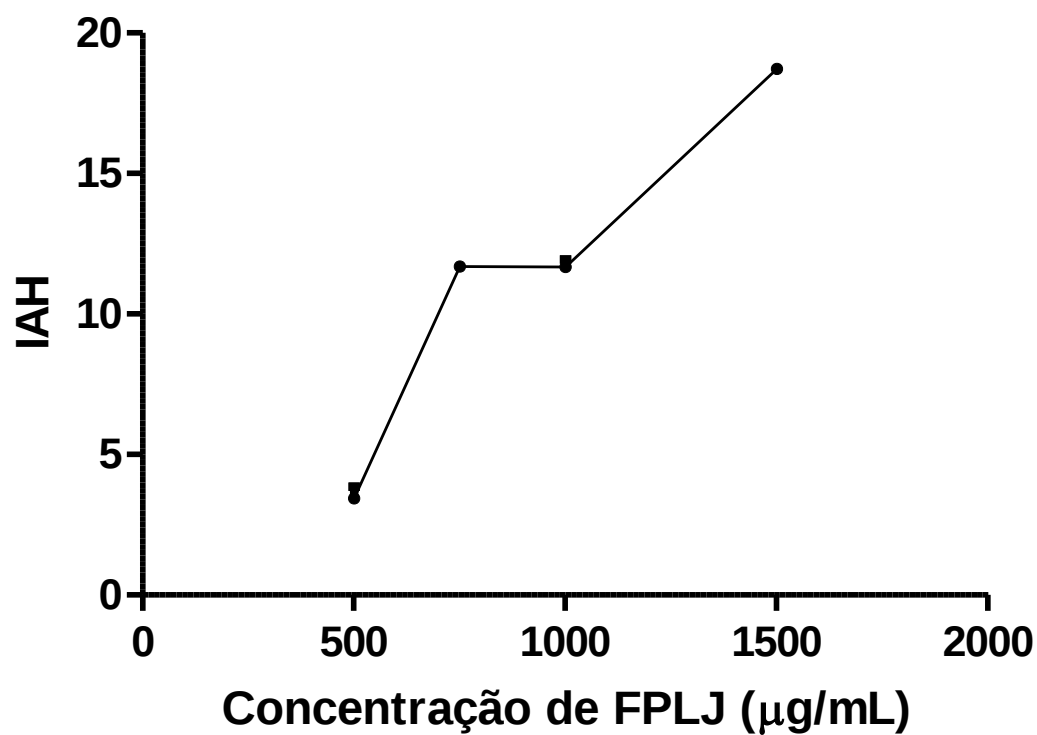


Figura 19. Média do índice de alterações histopatológicas observadas em rins de *D. rerio* expostos a concentrações de FPLJ (500, 750, 1000 e 1500 µg/mL). Os pontos representam a média $\pm$ EPM (Erro Padrão Médio) de N=15/grupo. ANOVA seguida de Tukey-Kramer: 500 µg/mL vs. Controle $p < 0.001$; controle vs. 750 µg/mL $p < 0.001$; 1000 µg/mL vs. Controle $p < 0.001$; 1500 µg/mL vs. Controle $p < 0.001$;

6 CONCLUSÃO

A exposição de *D. rerio* as concentrações de 500, 750, 1000 e 1500 µg/mL da FPLJ durante 48 horas permitiu concluir quanto aos parâmetros comportamentais que as duas menores concentrações provocaram alterações brandas no comportamento, enquanto as duas maiores concentrações ocasionaram alterações severas.

As concentrações administradas nos permitiram estimar uma CL₅₀ no valor de 1188,54 µg/mL. Sendo assim, realizando uma extrapolação ainda inédita na literatura, tal valor equivaleria a uma dose de 475 mg/kg. Através da indicação popular (6 colheres de sopa/dia), foi possível inferir com base no teor de sólidos, que apenas 0,5 gramas de principio ativo são ingeridas por usuário adulto por dia, correspondendo a dose de 7,14 mg/kg, muito distante da dose letal, e das doses que produziram lesões histopatológicas.

Quanto aos parâmetros histopatológicos das brânquias as concentrações de 1000 e 1500 µg/mL da FPLJ causaram os maiores danos ao tecido branquial, porém através dos valores VMA estas mativeram-se normais em todos os tratamentos. Já o fígado também sofreu maiores danos nas concentrações de 1000 e 1500 µg/mL da FPLJ, tendo VMA compatível com órgão possuidor de alterações de leves a moderadas. Finalmente, os rins mostraram-se mais afetados pelo tratamento com as concentrações de 750, 1000 e 1500 µg/mL da FPLJ, tendo VMA compatível com alterações de leve a moderadas.

Assim sendo, a FPLJ pode ser considerado de baixa toxicidade quando comparada a produtos já testados, no mesmo modelo, pois sua taxa de mortalidade é observada em concentrações muito maiores. É válido salientar que os danos histopatológicos nos órgãos investigados ocorrem em concentrações elevadas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M. S.; WISSE, J.; EVANS, R.; VAN DER WERFF, H.; KINGSTON, D. G. Bioactive Iridoids and a New Lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest 1. **Journal of natural products**, v. 60, n. 12, p. 1294-1297, 1997.
- AGRA, M. D. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALEX, D.; LAM, I. K.; LIN, Z.; LEE, S. M. Y. Indirubin shows anti-angiogenic activity in an in vivo zebrafish model and an in vitro HUVEC model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 242-247, 2010.
- AMALI, A. A.; REKHA, R. D.; LIN, C. J. F.; WANG, W. L.; GONG, H. Y.; HER, G. M.; WU, J. L.. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. **Journal of biomedical science**, v. 13, n. 2, p. 225-232, 2006.
- AMARAL, A. F.; FERREIRA, J. P.; PINHEIRO, M. B.; SILVA, J. A. Monograph of *Himatanthus suluensis*, a plant of Amazonian folk medicine. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 2, p. 305, 2007.
- AMARO, M. S.; FILHO, S. M.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de Janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.). PLUMEL.-APOCYNACEAE. **Ciência e Agrotecnologia**. v.30, n. 3, p. 450-457, 2006.
- AMATRUDA, J. F.; SHEPARD, J. L.; STERN, H. M.; ZON, L. I. Zebrafish as a cancer model system. **Cancer cell**, v. 1, n. 3, p. 229-231, 2002.
- BA, Q.; DUAN, J.; TIAN, J. Q.; WANG, Z. L.; CHEN, T.; LI, X. G.; CHU, R. A. Dihydroartemisinin promotes angiogenesis during the early embryonic development of zebrafish. **Nature Publishing Group**, v. 34, n. 8, p. 1101–1107, 2013.

BA, Q.; DUAN, J.; TIAN, J. Q.; WANG, Z. L.; CHEN, T.; LI, X. G.; WANG, H. Dihydroartemisinin promotes angiogenesis during the early embryonic development of zebrafish. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 8, p. 1101-1107, 2013.

BAGGIO, C. H.; DE MARTINI, O. G.; DE SOUZA, W. M.; DE MORAES, S. C.; TORRES, L. M.; RIECK, L.; MESIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Planta medica**, v. 71, n. 8, p. 733-738, 2005.

BAILEY, J.; OLIVERI, A.; LEVIN, E. D. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 99, n. 1, p. 14-23, 2013.

BARRETO, A. D. S.; CARVALHO, M. G. D.; NERY, I. D. A.; GONZAGA, L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from *Himatanthus articulata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 5, p. 430-434, 1998.

BARRETO, T.R. **Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrixã, *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869) exposto ao organofosfoado metil parathion (Folisuoer 600 Br ®).** 2007. 105f. Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências Fisiológicas). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

BALL, J. S.; STEDMAN, D. B.; HILLEGASS, J. M.; ZHANG, C. X.; PANZICKA-KELLY, J.; COBURN, A.; GUSTAFSON, A. L. Fishing for teratogens: a consortium effort for a harmonized zebrafish developmental toxicology assay. **Toxicological Sciences**, p. kfu017, 2014.

BERGHMANS, S., HUNT, J., ROACH, A., & GOLDSMITH, P. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. **Epilepsy research**, v. 75, n. 1, p. 18-28, 2007.

BERNARDI, M. M.; DIAS, S. G.; BARBOSA, V. E. Neurotoxicity of neem commercial formulation (*Azadirachta indica* A. Juss) in adult zebrafish (*Danio*

erio). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 1276-1282, 2013.

BILL, B. R.; PETZOLD, A. M.; CLARK, K. J.; SCHIMMENTI, L. A. A primer for morpholino use in zebrafish. **Zebrafish**, v. 6, n. 1, p. 69-77, 2009

.

BOHNI, N.; CORDERO-MALDONADO, M. L.; MAES, J.; SIVERIO-MOTA, D.; MARCOURT, L.; MUNCK, S.; WOLFENDER, J. L. Integration of microfractionation, qNMR and zebrafish screening for the in vivo bioassay-guided isolation and quantitative bioactivity analysis of natural products. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64006, 2013.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 408-420, 2006.

BRAUNBECK, T., GÖRGE, G., STORCH, V., & NAGEL, R Thomas steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to γ -hexachlorocyclohexane. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 19, n. 3, p. 355-374, 1990.

BROUGHTON, R. E.; MILAM, J.E.; ROE, Bruce A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. **Genome Research**, v. 11, n. 11, p. 1958-1967, 2001.

BUENAFE, O. E.; ORELLANA-PAUCAR, A.; MAES, J.; HUANG, H.; YING, X.; DE BORGGRAEVE, W.; DE WITTE, P. Tanshinone IIA exhibits anticonvulsant activity in zebrafish and mouse seizure models. **ACS chemical neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 1479-1487, 2013.

BUGEL, S. M.; TANGUAY, R. L.; PLANCHART, A. Zebrafish: a marvel of high-throughput biology for 21st century toxicology. **Current environmental health reports**, v. 1, n. 4, p. 341-352, 2015.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C. B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 327-336, 2007.

CARDOSO, T. P.; MÁRSICO, E. T.; MEDEIROS, R. J.; TORTELLY, R.; SOBREIRO, L. G.. Mercury level and histopathologic analysis of muscle, kidney and brain of largehead hairtail (*Trichiurus lepturus*) collected in Itaipu beach-Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 540-546, 2009.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R., RENGIFO, E.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 410-414, 2007.

CHAE, Y.J.; PHAM, C.H.; LEE, J.; BAE, E.; YI, J.; GU, M.B. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japees medaka (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, vol.94, no. 4, pp. 320-327,2009.

CHALLAL, S.; BUENAFE, O.E.; QUEIROZ, E.F.; MALJEVIC, S.; MARCOURT, L.; BOCK, M.; KLOETI, W.; DAYRIT, F.M.; HARVEY, A.L.; LERCHE, H.; ESGUERRA, C.V.; DE WITTE, P.A.; WOLFENDER, J.L.; CRAWFORD, A.D. Zebrafish bioassay-guided microfractionation identifies anticonvulsant steroid glycosides from the Philippine medicinal plant *Solanum torvum*. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 993-1004, 2014.

CHONG, C. M.; ZHOU, Z. Y.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; CUI, G. Z.; ZHANG, L. Q.; SA, F.; LEE, S. M. Y. Danshensu protects against 6-hydroxydopamine-induced damage of PC12 cells in vitro and dopaminergic neurons in zebrafish. **Neuroscience letters**, v. 543, p. 121-125, 2013.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

COELHO, M.F.B.; AZEVEDO, R.B.A. Germinação de sementes de tiborna (*Himatanthus obovatus*), espécie medicinal em Mato Grosso. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, XVI, 2000, Recife (Pe), 1: 73-73.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159-175, 2009.

COLARES, A.; CORDEIRO, L.; COSTA, J. G. M.; SILVEIRA, E.; CAMPOS, A.; CARDOSO, A. Phytochemical and biological preliminary study of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Janaguba). **Pharmacognosy Magazine**, v. 4, n. 14, p. 73, 2008.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. Do cultivo a terapêutica. Plantas medicinais. **Petrópolis: Vozes**, p. 69, 1998.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 72-79, 2005.

CRAWFORD, A. D.; LIEKENS, S.; KAMUHABWA, A. R.; MAES, J.; MUNCK, S.; BUSSON, R.; DE WITTE, P. A.. Zebrafish Bioassay-Guided Natural Product Discovery : Isolation of Angiogenesis Inhibitors from East African Medicinal Plants. v. 6, n. 2, p. 1–10, 2011.

CRAWFORD, A. D.; ESGUERRA, C. V.; DE WITTE, P. A. Fishing for drugs from nature: zebrafish as a technology platform for natural product discovery. **Planta medica**, v. 74, n. 6, p. 624, 2008.

CRAWFORD, A. D.; LIEKENS, S.; KAMUHABWA, A. R.; MAES, J.; MUNCK, S.; BUSSON, R.; WITTE, P. A. Zebrafish bioassay-guided natural product discovery: isolation of angiogenesis inhibitors from East African medicinal plants. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e14694, 2011.

DA-SONG, Y. A. N. G.; QIU-XIA, H. E.; YONG-PING, Y. A. N. G.; KE-CHUN, L. I. U.; XIAO-LI, L. I. Chemical constituents of *Euphorbia tibetica* and their biological activities. **Chinese journal of natural medicines**, v. 12, n. 1, p. 38-42, 2014.

DE MIRANDA, A. L.; SILVA, J. R.; REZENDE, C. M.; NEVES, J. S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L.; PINTO, A. C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta medica**, v. 66, n. 3, p. 284-286, 2000.

DE OLIVEIRA REBOUÇAS, S.; GRIVICICH, I.; DOS SANTOS, M. S.; RODRIGUEZ, P.; GOMES, M. D.; DE OLIVEIRA, S. Q.; DE BF FERRAZ, A. Antiproliferative effect of a traditional remedy, *Himatanthus articulatus* bark, on human cancer cell lines. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 926-929, 2011.

DEL VALLE-MOJICA, L. M., ORTÍZ, J. G. Anxiolytic properties of *Valeriana officinalis* in the zebrafish: a possible role for metabotropic glutamate receptors. **Planta medica**, 78(16), 1719-1724.

DING, H. Y.; CHANG, T. S.; SHEN, H. C.; TAI, S. S. K. Murine tyrosinase inhibitors from *Cynanchum bungei* and evaluation of in vitro and in vivo depigmenting activity. **Experimental dermatology**, v. 20, n. 9, p. 720-724, 2011.

DING, Y.J.; CHEN, Y.H.. Developmental nephrotoxicity of aristolochic acid in a zebrafish model. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 261, n. 1, p. 59-65, 2012.

DOITSIDOU, M.; REICHMAN-FRIED, M.; STEBLER, J.; KÖPRUNNER, M.; DÖRRIES, J.; MEYER, D.; ESGUERRA, C.V.; LEUNG, T.; RAZ, E. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. **Cell**, v. 111, n. 5, p. 647-659, 2002.

ENDO, Y., HAYASHI, H., SATO, T., MARUNO, M. Confluent Acid and 2'-O'-Methylperlatolic Acid, Monoamine Oxidase B Inhibitors in a Brazilian Plant, *Himatanthus sucuuba*. 1994.

ESGUERRA, C.V.; NELLES, L.; VERMEIRE, L.; IBRAHIMI, A.; CRAWFORD, A.D.; DERUA, R.; JANSSENS, E.; WAELEKENS, E.; CARMELIET, P.; COLLEN, D.; HUYLEBROECK, D. Ttrap is an essential modulator of Smad3-dependent Nodal signaling during zebrafish gastrulation and left-right axis determination. **Development**, v. 134, n. 24, p. 4381-4393, 2007.

EVANS, W.C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 15. ed. Londres: Saunders, 2002. 585 p.

FAKHRUDIN, N.; WALTENBERGER, B.; CABARAVDIC, M.; ATANASOV, A. G.; MALAINER, C.; SCHACHNER, D.; DIRSCH, V. M. Identification of plumericin as a potent new inhibitor of the NF- κ B pathway with anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 7, p. 1676-1686, 2014.

FAN, Y.; PENG, A.; HE, S.; SHAO, X.; NIE, C.; CHEN, L. Isogambogenic acid inhibits tumour angiogenesis by suppressing Rho GTPases and vascular endothelial growth factor receptor 2 signalling pathway. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 5, p. 298-308, 2013.

FANG W.W.; CHEN J.; HAN B.X.; LI C.G.; YANG X.J.; ZHANG C.X.; YAO H. Molluscicidal effect of *Phytolacca americana* linn leaf against *Oncomelania hupensis* and its acute toxicity. **Chinese journal of schistosomiasis control**, v. 23 n. 4, p449-52, 2011.

FERRI-LAGNEAU, K. F.; MOSHAL, K. S.; GRIMES, M.; ZAHORA, B.; LV, L.; SANG, S.; LEUNG, T. Ginger stimulates hematopoiesis via Bmp pathway in zebrafish. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39327, 2012.

FINAU, J.; ANGUINONI, M. Ação antiulcerogênica da fração alcaloídica da *Plumeia lacnciofolia* (Agoniada). XIV Reunião anual da Federação. Caxambu-Brasil, 1996.

FRAGA, S. A. P. M.; DE ANDRADE SILVA, J. R.; DERIVADOS, L. D. P. M. Pharmacognostical comparison of three species of *Himatanthus*. **International Journal of Botany**, v. 5, n. 2, p. 171-175, 2009.

Freitas, R. A.; CORREIA, K. D. M.; TAVARES, M. G. D. O.; Oliveira, G. M. C.; Cintra, A.; Riciole, H.; DE ANTONIOSI FILHO, N. R. Avaliação das brânquias de danio rerio expostos a diferentes concentrações de gasolina e diesel. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 23, 2013.

GEBRUERS, E.; CORDERO-MALDONADO, M. L.; GRAY, A. I.; CLEMENTS, C.; HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; ESGUERRA, C. V. A phenotypic screen in zebrafish identifies a novel small-molecule inducer of ectopic tail formation suggestive of alterations in non-canonical Wnt/PCP signaling. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83293, 2013.

GERMANÒ, M. P.; CERTO, G.; D'ANGELO, V.; SANOGO, R.; MALAFRONTÉ, N.; DE TOMMASI, N.; RAPISARDA, A. Anti-angiogenic activity of *Entada africana* root. **Natural product research**, n. ahead-of-print, p. 1-6, 2014.

GERTSCH, J.; GERTSCH-ROOST, K.; STICHER, O. *Phyllanthus piscatorum*, ethnopharmacological studies on a women's medicinal plant of the Yanomami Amerindians. **Journal of ethnopharmacology**, v. 91, n. 2, p. 181-188, 2004.

GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R.; STICHER, O. HEILMANN, J. Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of Justicidin B and a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Medica**, v. 69, p. 420-424, 2003

GOKSOYR, A; HUSEY, A. -M. Cellular targets of CYP 1A induction in juvenile cod (*Gadus morhua* L.) after administration with different doses of BNE
Submitted. 1998.

GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; Screening for reproductive toxicity in rats for a decoction of *Himatanthus sucuuba* stem bark. **Journal Ethnopharmacology** 34: 195-199, 1991.

GRIFFITT, Robert J. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 107, n. 2, p. 404-415, 2009.

GRIFFITT, Robert J. Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. **Aquatic toxicology**, v. 130, p. 192-200, 2013.

GUO, B.; XU, D.; DUAN, H.; DU, J.; ZHANG, Z.; LEE, S. M.; WANG, Y. Therapeutic effects of multifunctional tetramethylpyrazine nitron on models of Parkinson' s disease in vitro and in vivo. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 274-285, 2014.

HAMILTON-BUCHANAN, F. **An account of the Fishes of the Ganges: VII 1822.**

HAMMOND, C. L.; MORO, E. Using transgenic reporters to visualize bone and cartilage signaling during development in vivo. **Frontiers in endocrinology**, v. 3, 2012.

HAMPTON, J. A.; MCCUSKEY, P. A.; MCCUSKEY, R. S.; HINTON, D. E. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes. **The Anatomical Record**, v. 213, n. 2, p. 166-175, 1985.

HAN, L.; YUAN, Y.; ZHAO, L.; HE, Q.; LI, Y.; CHEN, X.; LIU, K. Tracking antiangiogenic components from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. based on zebrafish assays using high-speed countercurrent chromatography. **Journal of separation science**, v. 35, n. 9, p. 1167-1172, 2012.

HE, M. F.; LIU, L.; GE, W.; SHAW, P. C.; JIANG, R.; WU, L. W.; & BUT, P. P. H. Antiangiogenic activity of *Tripterygium wilfordii* and its terpenoids. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 61-68, 2009.

HE, Zhi-Heng Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 313-317, 2009.

HE, Z. H.; GE, W.; YUE, G. G. L.; BIK-SAN LAU, C.; HE, M. F.; BUT, P. P. H. Anti-angiogenic effects of the fruit of *Alpinia oxyphylla*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 132, n. 2, p. 443-449, 2010.

HE, Z. H.; HE, M. F.; MA, S. C.; BUT, P. P. H. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives. **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 313-317, 2009.

HE, Z. H.; YUE, G. G. L.; LAU, C. B. S.; GE, W.; BUT, P. P. H. Antiangiogenic Effects and Mechanisms of trans-Ethyl p-Methoxycinnamate from *Kaempferia galanga* L. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11309-11317, 2012.

HE, Z. H.; ZHOU, R.; HE, M. F.; BIK-SAN LAU, C.; YUE, G. G. L.; GE, W.; BUT, P. P. H. Anti-angiogenic effect and mechanism of rhein from *Rhizoma Rhei*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 6, p. 470-478, 2011.

HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. 2nd ed. Florida: **Lewis Publishers**, 1995.

HEASMAN, J. Morpholino oligos: making sense of antisense? **Developmental biology**, v. 243, n. 2, p. 209-214, 2002.

HELFMAN, G.S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, Douglas E. The diversity offishes. **Maiden, MA: Blackwell Science**, 1997.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic 66 Biomarkers. In: HUGGETT R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE Jr, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. cap. 4, p. 155 –196.

HOAR, W. S. Reproduction in teleost fish. **Mem. Soc. Endocrinol**, v. 4, p. 5-24, 1955.

HOLBECH, H.; SCHRÖDER, K. D.; NIELSEN, M. L.; BRANDE-LAVRIDSEN, N.; HOLBECH, B. F.; BJERREGAARD, P. Estrogenic effect of the

phytoestrogen biochanin A in zebrafish, *Danio rerio*, and brown trout, *Salmo trutta*. **Aquatic Toxicology**, v. 144, p. 19-25, 2013.

HOLDEN, Joseph A.; LAYFIELD, Lester L.; MATTHEWS, Jennifer L. **The Zebrafish: Atlas of Macroscopic and Microscopic Anatomy**. Cambridge University Press, 2013.

HONG, S. J.; WAN, J. B.; ZHANG, Y.; HU, G.; LIN, H. C.; SETO, S. W.; LEE, S. M. Y. Angiogenic effect of saponin extract from *Panax notoginseng* on HUVECs in vitro and zebrafish in vivo. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 5, p. 677-686, 2009.

HONG, J. H., JUNG, S. H., CHO, K. H. Turmeric and laurel aqueous extracts exhibit in vitro anti-atherosclerotic activity and in vivo hypolipidemic effects in a zebrafish model. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 3, p. 247-256, 2011.

HOWE, K.; CLARK, M. D.; TORROJA, C. F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; PLUMB, B. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

HUANG S.Y.; FENG C.W.; HUNG H.C.; CHAKRABORTY C.; CHEN C.H.; CHEN W.F.; JEAN Y.H.; WANG H.M.; SUNG C.S.; SUN Y.M.; WU C.Y.; LIU W.; HSIAO C.D.; WEN Z.H. A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. **PLoS One**. v. 9, n.8, p.104414, 2014.

HUGHES, G. M. Morphometry of fish gas exchange organs in relation to their respiratory function. **In: Environmental Physiology of Fishes**. Springer US, 1980. p. 33-56.

JIN, S.; HONG, J. H.; JUNG, S. H.; CHO, K. H. Turmeric and laurel aqueous extracts exhibit in vitro anti-atherosclerotic activity and in vivo hypolipidemic effects in a zebrafish model. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 3, p. 247-256, 2011.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. 13^o ed. São Paulo: Imprensa Nacional .

JONES, R.W.; HUFFMAN, M.N. Fish embryos as bio-assay material in testing chemicals for effects on cell division and differentiation. **Transactions of the American Microscopical Society**. 76, p.177–183, 1957.

JONES, R.W.; STOUT, M.G.; REICH, H.; HUFFMAN, M.N. Cytotoxic activities of certain flavonoids against zebra-fish embryos. **Cancer Chemotherapy Reports**. 34:19-20, 1964.

JONZ, M. G.; NURSE, C. A. New developments on gill innervation: insights from a model vertebrate. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 15, p. 2371-2378, 2008.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.I; GERLAI, Robert. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KANG, M. C.; KIM, S. Y.; KIM, Y. T.; KIM, E. A.; LEE, S. H.; KO, S. C.; JEON, Y. J. In vitro and in vivo antioxidant activities of polysaccharide purified from aloe vera (*Aloe barbadensis*) gel. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 365-371, 2014.

KAO, T. T.; TU, H. C.; CHANG, W. N.; CHEN, B. H.; SHI, Y. Y.; CHANG, T. C.; FU, T. F. Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by interfering with dihydrofolate reductase activity and folate-mediated one-carbon metabolism. **International journal of food microbiology**, v. 141, n. 1, p. 17-27, 2010.

KELLEHER, O.M.; MCMAHON, M.; EGGLESTON, M.I.; DIXON, J.M.; TAGUCHI, K.; YAMAMOTO, M.; HAYES, J.D. 1-Cyano-2,3-epithiopropene is a novel plant-derived chemopreventive agent which induces cytoprotective genes that afford resistance against the genotoxin α,β -unsaturated aldehyde acrolein. **Carcinogenesis**. v.30, n.10 p.1754–1762, 2009.

KIM, D.J.; SEOK, S.H.; BAEK, M.W.; LEE, H.Y.; NA, Y.R.; PARK, S.H.; LEE HK, DUTTA NK, KAWAKAMI K, PARK JH. Developmental toxicity and brain aromatase induction by high genistein concentrations in zebrafish embryos. **Toxicology Mechanisms and Methods**. v. 19 n. 3, p.251-6, 2009.

KIM, J. H.; BAEK, S. H.; KIM, D. H.; CHOI, T. Y.; YOON, T. J.; HWANG, J. S.; LEE, C. H. Downregulation of melanin synthesis by hagin A and its application to in vivo lightening model. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 5, p. 1227–1235, 2008.

KIM, J. H.; JEONG, S. C.; HWANG, J. S.; LEE, E. S.; LEE, S. M. Modulation of Melanin Synthesis by Rengyolone Isolated from the Root of *Eurya emarginata* in Melan-a Cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 6, p. 940-945, 2014.

KIM, J. Y.; HONG, J. H.; JUNG, H. K.; JEONG, Y. S.; CHO, K. H. Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish. **International journal of molecular medicine**, v. 30, n. 3, p. 606-614, 2012.

KNIE, J.L.; LOPES E.W.B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis. **FATMA/GTZ**, P.289, 2004.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KRILL, D.; MADDEN, J.; HUNCIK, K.; MOELLER, P. D.. Biochemical and Biophysical Research Communications Induced thyme product prevents VEGF-induced migration in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 403, n. 3-4, p. 275–281, 2010.

LAI, P. K. K.; CHAN, J. Y. W.; KWOK, H. F.; CHENG, L.; YU, H.; LAU, C. P.; BIK-SAN LAU, C. Induction of Angiogenesis in Zebrafish Embryos and Proliferation of Endothelial Cells by an Active Fraction Isolated from the Root of *Astragalus membranaceus* using Bioassay-guided Fractionation. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 4, n. 4, p. 239, 2014.

LAI, P. K. K., CHAN, J. Y. W., KWOK, H. F., CHENG, L., YU, H., LAU, C. P., BIK-SAN LAU, C. Induction of Angiogenesis in Zebrafish Embryos and Proliferation of Endothelial Cells by an Active Fraction Isolated from the Root of *Astragalus membranaceus* using Bioassay-guided Fractionation. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 4, n. 4, p. 239, 2014.

LAM H.W.; LIN H.C.; LAO S.C.; GAO J.L.; HONG S.J.; LEONG C.W.; YUE P.Y.; KWAN Y.W.; LEUNG A.Y.; WANG Y.T.; LEE S.M. The angiogenic effects of *Angelica sinensis* extract on HUVEC in vitro and zebrafish in vivo. **Journal of cellular biochemistry**. 1;103(1):195-211, 2008

LANGHEINRICH, U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. **Bioassays**, v. 25, n. 9, p. 904-912, 2003.

LAURENT, P.; DUNEL, S. Morphology of gill epithelia in fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 238, n. 3, p. R147-R159, 1980.

LEE, S. H.; LEE, J.; JUNG, M. H.; LEE, Y. M. Glyceollins, a novel class of soy phytoalexins, inhibit angiogenesis by blocking the VEGF and bFGF signaling pathways. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 2, p. 225-234, 2013.

LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology advances**, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LIANG, Z., HE, M., FONG, W., JIANG, Z., & ZHAO, Z. A comparable , chemical and pharmacological analysis of the traditional Chinese medicinal herbs *Oldenlandia diffusa* and *O . corymbosa* and a new valuation of their biological potential. v. 15, p. 259–267, 2008.

LIN, S.; ZHAO, Y.; NEL, A. E.; LIN, S. Zebrafish: an in vivo model for nano EHS studies. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1608-1618, 2013.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista da Academia de Ciências Agrárias e Ambientais**. Curitiba, v.8,n.4,p.469-484, 2010.

LIMA, M. P. D.; HILST, L. F.; MATTANA, F. V. R.; SANTOS, C. A. D. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Alkaloid-rich fraction of *Himatanthus lancifolius* contains anti-tumor agents against leukemic cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 273-280, 2010.

LIMA, O.G.; BANDEIRA, J.A.; VIEIRA, A. Uma nova substância antibacteriana, difusiva e termolábil, encontrada em *Plumeria bracteata* D.C. **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco**, v.7, n.1, p. 698-699, 1947.

LIMA, V. B. Estudo fitoquímico de *Himatanthus obovatus* (Muell. Arg.) Woodson (APOCYNACEAE): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica. 2005.

LIN, S.; ZHAO, Y.; NEL, A. E.; LIN, S. Zebrafish: an in vivo model for nano EHS studies. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1608-1618, 2013.

LITTLE, E. E.; FAIRCHILD, J. F.; DELONAY, A. J. Behavioral methods for assessing impacts of contaminants on early life stage fishes. In:**AM. FISH. SOC. SYMP.1993**.

LITTLETON, R. M., HAWORTH, K. J., TANG, H., SETCHELL, K. D., NELSON, S., & HOVE, J. R. Automated in vivo platform for the discovery of functional food treatments of hypercholesterolemia. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e52409, 2013.

LIU, Y.; CHEN, H. L.; YANG, G. Extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F protect dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced inflammatory damage. **The American journal of Chinese medicine**, v. 38, n. 04, p. 801-814, 2010.

LIU, C. L.; CHENG, L.; KWOK, H. F.; KO, C. H.; LAU, T. W.; KOON, C. M.; BIK-SAN LAU, C. Bioassay-guided isolation of norviburtinal from the root of *Rehmannia glutinosa*, exhibited angiogenesis effect in zebrafish embryo model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1323-1327, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. p.427-2002.

Lorenzi, H. & Matos, F.J.A. 2008. Plantas medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum.

LU, Z.G.; LI, M.H.; WANG, J.S.; WEI, D.D.; LIU, Q.W.; KONG, LY. Developmental toxicity and neurotoxicity of two matrine-type alkaloids, matrine and sophocarpine, in zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larva. *Reproductive Toxicology*. v. p.47:33-41, 2014.

LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C.; BANDEIRA, M. A.; VERAS, H. N.; SILVA, A. H.; LEAL, L. K.; VIANA, G. B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation (London, United Kingdom)**, v. 7, n. 60, p. b12, 2010.

LUZ, F. J. F. 1998. Plantas Medicinais de Ocorrência Natural em Roraima. EMBRAPA - CPAF, Boa Vista, Roraima. Pesquisa em Andamento, 8 p.

LUZ, Francisco Joaci F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 88-96, 2001.

LUZ, H. S.; SANTOS, A. C. G.; MACHADO, K. R. G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 657-662, 2014.

MABBERLEY, D.J. **The Plant Book: Portable Dictionary of the vascular plants**. 2. Ed. Cambridge University Press, 1997. p. 858.

MCCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, John T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MCCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to the future or into extinction?. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MCGRATH, P.L., Chun-Qi. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug discovery today**, v. 13, n. 9, p. 394-401, 2008.

MÉLLO, J.F.; LIMA, O.G.; BETTÓLO, G.B.; MONACHE, F.D.; D'ALBUQUERQUE, M.M.F.; OLIVEIRA, R.M.M.; SILVA FILHO. Preliminary observations on the biological effects of the látex from *Plumeria bracteata* D.C. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v. 15, n. (1/2), 1975.

MESQUITA, M. L. D.; DESRIVOT, J.; FOURNET, A.; PAULA, J. E. D.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 165-170, 2007.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**, v. 51, n. 3, p. 212-237, 1997.

MOCHIZUKI, E. Fish mesonephric model of polycystic kidney disease in medaka (*Oryzias latipes*) pc mutant. *Kidney international*, v. 68, n. 1, p. 23-34, 2005.

MODESTO, M. M. L. S. **Aspectos ecológicos e sócio-econômicos de *Himatanthus articulata* (Wahl.) Woodson. “janaguba” da Chapada do Araripe.** Monografia (Especialização em botânica) Universidade Regional do Cariri Botanic Department, 1997.

MOUSINHO, K. C.; OLIVEIRA, C. D. C.; FERREIRA, J. R. D. O.; CARVALHO, A. A.; MAGALHÃES, H. I. F.; BEZERRA, D. P.; MORAES, M. O. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel–Apocynaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 421-426, 2011.

NARDIN, J. M.; DE SOUZA, W. M.; LOPES, J. F.; FLORAO, A.; DE MORAES, S. C.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Effects of *Himatanthus lancifolius* on human leukocyte chemotaxis and their adhesion to integrins. **Planta medica**, v. 74, n. 10, p. 1253-1258, 2008.

NARDIN, J. M.; LIMA, M. P.; MACHADO JR, J. C.; HILST, L. F.; SANTOS, C. A.; WEFFORT-SANTOS, A. M. The uleine-rich fraction of *Himatanthus lancifolius* blocks proliferative responses of human lymphoid cells. **Planta medica**, v. 76, n. 7, p. 697-700, 2010.

NOGUEIRA, D.J. Utilização das brânquias de *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803)(Siluriformes; Pimelodidae) como biomarcador de poluição no reservatório da UHE Marechal Mascarenhas de Moraes, Minas Gerais, Brasil. **Biotemas**, v. 24, n. 3, p. 51-58, 2011.

NORTH, T.E. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 1007-1011, 2007

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; DE PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; DE LIMA, M. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource technology**, v. 98, n. 13, p. 2549-2556, 2007.

OPPEDAL, D.; GOLDSMITH, M. I. A chemical screen to identify novel inhibitors of fin regeneration in zebrafish. **Zebrafish**, v. 7, n. 1, p. 53-60, 2010.

ORELLANA-PAUCAR, A. M.; SERRUYS, A. S. K.; AFRIKANOVA, T.; MAES, J.; DE BORGGRAEVE, W.; ALEN, J.; ESGUERRA, C. V. Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. **Epilepsy & behavior**, v. 24, n. 1, p. 14-22, 2012.

PACHECO, M; SANTOS, M .A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331-347, 2002.

PAUL, S. M.; MYTELKA, D. S.; DUNWIDDIE, C. T.; PERSINGER, C. C.; MUNOS, B. H.; LINDBORG, S. R.; SCHACHT, A. L. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 3, p. 203-214, 2010.

PAPERS, O. Anxiolytic Properties of *Valeriana officinalis* in the Zebrafish : A Possible Role for Metabotropic Glutamate Receptors. p. 1719–1724, 2012.

PARDAL, D.; CARO, M.; TUEROS, I.; BARRANCO, A.; NAVARRO, V. Resveratrol and Piceid Metabolites and Their Fat-Reduction Effects in Zebrafish Larvae. **Zebrafish**, v. 11, n. 1, p. 32-40, 2014.

PARK, H.; SONG, K. H.; JUNG, P. M.; KIM, J. E.; RO, H.; KIM, M. Y.; MA, J. Y. Inhibitory Effect of Arctigenin from *Fructus Arctii* Extract on Melanin Synthesis via Repression of Tyrosinase Expression. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 9, p. 1322-1323, 1978.

PETERSEN, C.W.; FISCHER, E. A. Mating system of the hermaphroditic coral-reef fish, *Serranus baldwini*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 19, n. 3, p. 171-178, 1986.

PASSERI, M. J.; CINAROGLU, A.; GAO, C.; SADLER, K. C. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p. 443-452, 2009.

PETERSON, R. T.; MACRAE, C. A. Systematic approaches to toxicology in the zebrafish. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 52, p. 433-453, 2012.

PETROCELLI, S. R. Chronic toxicity tests. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Hemisphere Publishing Corporation Washington DC. 1985. p 96-109, 2 tab, 39 ref., 1985.

PIO CORREA, M. **Dicionário das Plantas úteis e do Brasil das exóticas cultivadas**. Brasília, Min. da Agric.- IBDF, v.4, p.154, 1994.

PICKART, M. A.; SIVASUBBU, S.; NIELSEN, A. L.; SHRIRAM, S.; KING, R. A.; EKKER, S. C. Functional genomics tools for the analysis of zebrafish pigment. **Pigment cell research**, v. 17, n. 5, p. 461-470, 2004.

PLUMEL, M.M. Le genre *Himatanthus* (Apocinaceae). Revisión Taxonomique: bradea. **Boletim do herbarium Bradeanu**, v.5, p. 1-20, 1991.

POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. **Fishing New Books**, Cambridge, p.339-352, 1994.

POLEKSIĆ, V.; KARAN, V. Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 43, n. 2, p. 213-221, 1999.

RATTMANN, Y. D.; TERLUK, M. R.; SOUZA, W. M.; SANTOS, C. A.; BIAVATTI, M. W.; TORRES, L. B.; MARIA, C. D. A. Effects of alkaloids of

Himatanthus lancifolius (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 268-275, 2005.

REBOUÇAS, S. D. O.; DA SILVA, J.; BERTONI, R. S.; DECKER, N.; DOS SANTOS, M. S.; ROSSATTO, R. R.; FERRAZ, A. B. Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of *Himatanthus articulatus* bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 474-480, 2013.

REIMSCHUESSEL, R. A fish model of renal regeneration and development. *Ilar Journal*. v.42, p. 285 – 291, 2001

REBOUÇAS, S. D. O.; SILVA, J. D.; GROFF, A. A.; NUNES, E. A.; IANISTCKI, M.; FERRAZ, A. D. B. The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 389-396, 2012.

RENNEKAMP, A.J.; PETERSON, R. T. 15 years of zebrafish chemical screening. **Current opinion in chemical biology**, v. 24, p. 58-70, 2015.

RIBEIRO, L. C. **Investigação do efeito ictiotóxico do extrato etanolico da raiz de *Spilanthes acmella* (jambu) em zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental**. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. 2013.

RIGOLIN-SÁ, O. **Toxicidade do herbicida Roundup (glifosato) e do acaricida Omite (propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, *Rhandia hylarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes)**. 307f. Tese (Doutorado em Recursos Naturais) Curso de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

ROBINS, Contran; COTRAN, R. S. Bases patológicas das doenças. 2005.

SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U.; KÜSTER, E.; LUCKENBACH, T.; VOELKER, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 5, p. 394-404, 2008.

SCHRECK, C. B.; OLLA, B. L.; DAVIS, M. W. Behavioral responses to stress. **Fish stress and health in aquaculture**, v. 62, p. 145-170, 1997.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W., TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SEIDL, C.; CORREIA, B. L.; STINGHEN, A. E.; SANTOS, C. A. cetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, n. 7-8, p. 440-444, 2010.

SEIZI, Oga. Fundamentos de toxicologia. **Segunda edição, Editora Ateneu**, p. 39-48, 2003.

SEQUEIRA, B. J.; VITAL, M. J. S.; POHLIT, A. M.; PARAROLS, I. C.; CAÚPER, G. S. B. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 659-661, 2009.

SETH, A.; STEMPEL, D.L.; BARROSO, I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. **Disease models & mechanisms**, v. 6, n. 5, p. 1080-1088, 2013.

SHI, Y.N.; SHI, Y.M.; YANG, L.; LI, X.C.; ZHAO, J.H.; QU, Y.; ZHU, H.T.; WANG, D.; CHENG, R.R.; YANG, C.R.; XU, M.; ZHANG, Y.J. Lignans and aromatic glycosides from *Piper wallichii* and their antithrombotic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, p. 87–96, 2015.

SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores de contaminação aquática**. 2004. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 74 p..

SILVA, J. R. D. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, Â. C.; PINHEIRO, M. L.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; BOLZANI, V. D. S. Triterpenic esters from *himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 702-704, 1998.

SMART, G. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Fish Biology**, v. 8, n. 6, p. 471-475, 1976.

SOARES, D. C.; ANDRADE, A. L.; DELORENZI, J. C.; SILVA, J. R.; FREIRE-DE-LIMA, L.; FALCÃO, C. A.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology international**, v. 59, n. 2, p. 173-177, 2010.

SOARES, T.; DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. D. G.; RESENDE, F. M. C.; CORREA DOS SANTOS, M. A.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VOLPATO, G. T. Effect of *Himatanthus sucuuba* in Maternal Reproductive Outcome and Fetal Anomaly Frequency in Rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 104, n. 5, p. 190-195, 2015.

SONG, S.J.; LI, L.Z.; GAO, P.Y.; YUAN, Y.Q.; WANG, R.P.; LIU, K.C.; PENG, Y. Isolation of Antithrombotic Phenolic Compounds from the Leaves of *Crataegus pinnatifida*. **Planta Medica**, v. 78, p. 1967–1971, 2012

SOOMRO, S.; LANGENBERG, T.; MAHRINGER, A.; KONKIMALLA, V. B.; HORWEDEL, C.; HOLENYA, P.; CARMELIET, P. Design of novel artemisinin-like derivatives with cytotoxic and anti-angiogenic properties. v. 15, n. 5, p. 1122–1135, 2011.

SOUSA, E. L. D., GRANGEIRO, A. R. S., BASTOS, I. V. G. A., RODRIGUES, G. C. R., ANJOS, F. B. R. D., SOUZA, I. A. D., & SOUSA, C. E. L. D. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 199-203, 2010.

SOUSA, E. L. **Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel-Apocynaceae (Janaguba). 2009. 93f.** 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)—Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOUZA, G.C. Estudo da toxicidade da nanoemulsão de álcool perfílico (NPOH) sobre zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822). Dissertação (Mestrado). Macapá. 2015.

SOUZA, M. S.; CORDEIRO, M. S.; ROSAS, E. C.; HENRIQUES, M. O.; SIANI, A. C. Inhibition of nitric oxide and interferon- γ production by iridoids and triterpenes from the roots of *Himatanthus sucuuba*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 2, n. 8, p. 216, 2006.

SOUZA, W. M.; STINGHEN, A. E. M.; SANTOS, C. A. M. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7, p. 750-753, 2004.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; QUEIROZ, A. B.; MARTINS FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T. ZANI, C. L. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1207-1212, 2002.

SPINA, A. P. Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae). Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SPITSBERGEN, J. M.; KENT, MICHAEL L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations. **Toxicologic pathology**, v. 31, n. 1, p. 62-87, 2003.

STERN, H.M.; ZON, L. I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 7, p. 533-539, 2003.

STEWART, A.M.; KALUEFF A.V. The behavioral effects of acute Δ^9 -tetrahydrocannabinol and heroin (diacetylmorphine) exposure in adult zebrafish. **Brain Research**. v. 1543, p.109-19, 2014.

STREISINGER, G.; WALKER, C.; DOWER, N.; KNAUBER, D.; SINGER, F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293-296, 1981.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An Atlas of Fish Histology – Normal and Pathological Features. **Kodansha Ltd.**, Tóquio. p. 195, 1995.

THOMAS R.J. The toxicologic and teratologic effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in the zebrafish embryo. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 32, n. 1, p.184-90, 1975.

TSE, H. Y. G.; HUI, M. N. Y.; LI, L.; LEE, S. M. Y.; LEUNG, A. Y. H.; CHENG, S. H. Angiogenic efficacy of simplified 2-herb formula (NF3) in zebrafish embryos in vivo and rat aortic ring in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 447-453, 2012.

TSE, H. Y. G., LI, V. W. T., HUI, M. N., CHAN, P. K., & CHENG, S. H. Data Mining for Chinese Materia Medica and Pharmacological Research. n. Cmm, p. 390–395, 2008.

ULLOA, P. E.; PEÑA, A. A.; LIZAMA, C. D.; ARANEDA, C.; ITURRA, P.; NEIRA, R.; MEDRANO, J. F. Growth response and expression of muscle growth-related candidate genes in adult zebrafish fed plant and fishmeal protein-based diets. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 99-109, 2013.

VALE, V. V. Estudo fitoquímico e atividade antiplasmodica em *Plasmodium falciparum* (W2) de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae). 2014.

VAN DER GREEF, J.; MCBURNEY, R.N. Rescuing drug discovery: in vivo systems pathology and systems pharmacology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 12, p. 961-967, 2005.

VANDERLEI, M. D. F.; SILVA, M. S.; GOTTLIEB, H. E.; BRAZ-FILHO, R. Iridoids and triterpenes from *Himatanthus phagadaenica*, The complete assignment of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of two Iridoids glycosides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 2, p. 51, 1991.

VANDERLEI, M. F.; SOUZA-BRITO, A. R. S. Ações espasmogênicas do extrato etanólico de *Himatanthus phagedaenica* (MART.) Woodson, em iléo isolado de cobaia. **Caderno de farmácia**, v. 5, n. 1/2, p. 49-71, 1989.

VANDERLEI, M.F.; SOUZA-BRITO, A.R.S. **Estudo químico e farmacológico de *Himatanthus phagedaenicus* (Mart.) Wodson** – Dissertação de Mestrado apresentado ao LTF/UFPB, João Pessoa, PB, P.178-236, 1985.

VELOSO, P.M.; NAGEM, T.G.; OLIVEIRA, T.T. β -Dihidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 27 (1999) 669-671.

VÉLEZ, C; ROCIO, P. Uso de biomarcadores de genotoxicidade e histopatológicos para avaliação de toxicidade de vermiculita expandida magnética e vermiculita expandida em peixes Danio rerio. 2013.

VILLEGAS, L. F.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALA, A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 193-200, 1997.

VLIEGENTHART, A. D.; TUCKER, C. S.; DEL POZO, J.; DEAR, J. W. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. **British journal of clinical pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 1217-1227, 2014.

VILHENA, T.C. **Avaliação da toxicidade dos efeitos do extrato etanólico seco das cascas de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (Apocynaceae) sobre as alterações oxidativas na malária experimental *in vivo*** . 2012. 139f. Dissertação de mestrado PPGCF-Universidade Federal do Pará, 2012.

WANG, S.; LIU, K.; WANG, X.; HE, Q.; CHEN, X. Toxic effects of celastrol on embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Drug and chemical toxicology**, v. 34, n. 1, p. 61-65, 2011.

WANG, T. J.; AN, J.; CHEN, X. H.; DENG, Q. D.; YANG, L. Assessment of *Cuscuta chinensis* seeds' effect on melanogenesis: Comparison of water and ethanol fractions in vitro and in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 154, n. 1, p. 240-248, 2014.

WANG, Y. H.; WEN, C. C.; YANG, Z. S.; CHENG, C. C.; TSAI, J. N.; KU, C. C.; CHEN, Y. H. Development of a whole-organism model to screen new compounds for sun protection. **Marine biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 419-429, 2009.

WANG, Y. M.; XU, M.; WANG, D.; YANG, C. R.; ZENG, Y.; ZHANG, Y. J. Anti-inflammatory compounds of "Qin-Jiao", the roots of *Gentiana dahurica* (Gentianaceae). **Journal of ethnopharmacology**, V. 147, N. 2, P. 341-348, 2013.

WEI, Y., LI, P., WANG, C., PENG, Y., SHU, L., JIA, X., WANG, B. Metabolism of tanshinone IIA, cryptotanshinone and tanshinone I from *Radix Salvia miltiorrhiza* in zebrafish. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 8617-8632, 2012.

WEI, Y.; LI, P.; FAN, H.; SUN, E.; WANG, C.; SHU, L.; JIA, X. Metabolite profiling of four major flavonoids of *herba epimdii* in zebrafish. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 420-432, 2012.

WEI, Y.; LI, P.; FAN, H.; SUN, E.; WANG, C.; SHU, L.; JIA, X. Metabolite profiling of four major flavonoids of *Herba Epimdii* in zebrafish. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 420-432, 2012.

WEI, Y.; LI, P.; WANG, C. Metabolism of tanshinone IIA, cryptotanshinone and tanshinone I from *Radix Salvia miltiorrhiza* in zebrafish. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 7, p. 8617-32, 2012.

WHITE, R. M.; SESSA, A.; BURKE, C.; BOWMAN, T.; LEBLANC, J.; CEOL, C.; ZON, L. I. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. **Cell stem cell**, v. 2, n. 2, p. 183-189, 2008.

WOOD, C. A.; LEE, K.; VAISBERG, A. J.; KINGSTON, D. G.; NETO, C. C.; HAMMOND, G. B. A bioactive spirolactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 49, n. 11, p. 1477-1478, 2001.

YANG, J.; HE, S.; LI, S.; ZHANG, R.; PENG, A.; CHEN, L. In Vitro and In Vivo Antiangiogenic Activity of Caged Polyprenylated Xanthones Isolated from *Garcinia hanburyi* Hook. f. p. 15305–15313, 2013.

YANG, J.; HE, S.; LI, S.; ZHANG, R.; PENG, A.; CHEN, L. In vitro and in vivo antiangiogenic activity of caged polyprenylated xanthones isolated from *Garcinia hanburyi* Hook. f. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15305-15313, 2013.

YU, S. Y.; LEE, I. S.; JUNG, S. H.; LEE, Y. M.; LEE, Y. R.; KIM, J. H.; BKIM, J. S. Caffeoylated phenylpropanoid glycosides from *Brandisia hancei* inhibit advanced glycation end product formation and aldose reductase in vitro and vessel dilation in larval zebrafish in vivo. **Planta Medica**, v. 79, p. 1705–1709, 2013.

YU, X.; TONG, Y.; HAN, X. Q.; KWOK, H. F.; YUE, G. G. L.; LAU, C. B. S.; GE, W. Anti-Angiogenic Activity of *Herba Epimedii* on Zebra fi sh Embryos In Vivo and HUVECs In Vitro. v. 1375, n. October 2012, p. 1368–1375, 2013.

YU, X.; TONG, Y.; HAN, X.Q.; KWOK, H.F; YUE, G.G.; LAU, C.B.; GE, W. Anti-angiogenic activity of *Herba Epimedii* on zebrafish embryos in vivo and HUVECs in vitro. **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 9, p. 1368-75, 2013.

YUE, G. G.; CHAN, B. C.; KWOK, H. F.; WONG, Y. L.; LEUNG, H. W.; JI, C. J.; LAU, C. B. European Journal of Medicinal Chemistry Anti-angiogenesis and immunomodulatory activities of an anti-tumor sesquiterpene bigelovin isolated from *Inula helianthus-aquatica*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 243–252, 2013.

YUE, G. G.; CHAN, B. C.; KWOK, H. F.; WONG, Y. L.; LEUNG, H. W., JI, C. J., FUNQ, K. P.; LEUNQ, P. C.; TAN, N. H.; LAU, C. B. Anti-angiogenesis and immunomodulatory activities of an anti-tumor sesquiterpene bigelovin isolated from *Inula helianthus-aquatica*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 59, p. 243-252, 2013.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C; CECHINEL F, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZHANG, J.; WANG, Z. M.; LIU, K. C.; HE, Q. X.; QI, Y. D.; ZHANG, B. G.; XIAO, P. G. Chemical constituents of *Kadsura oblongifolia* and evaluation of their toxicity. **Acta pharmaceutica Sinica**, v. 49, n. 9, p. 1296-1303, 2014.

ZHANG, Y.; HU, G.; LI, S.; LI, Z. H.; LAM, C. O.; HONG, S. J.; LEE, S. M. Y. Pro-angiogenic activity of astragaloside IV in HUVECs in vitro and zebrafish in vivo. **Molecular medicine reports**, v. 5, n. 3, p. 805-811, 2012.

ZHANG, Z. J.; CHEANG, L. C.; WANG, M. W.; LI, G. H.; CHU, I. K.; LIN, Z. X.; LEE, S. M. Ethanol extract of fructus *Alpinia oxyphylla* protects against 6-hydroxydopamine-induced damage of PC12 cells in vitro and dopaminergic neurons in zebrafish. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 32, n. 1, p. 27-40, 2012.

ZHONG, Z. F.; HOI, P. M.; WU, G. S.; XU, Z. T.; TAN, W.; CHEN, X. P.; WANG, Y. T. Anti-angiogenic effect of furanodiene on HUVECs in vitro and on zebrafish in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 2, p. 721-727, 2012.

ZHOU, X. Phytomedicine Pro-angiogenic effects of *Carthami Flos* whole extract in human microvascular endothelial cells in vitro and in zebrafish in vivo. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1256–1263, 2014.

ZHOU, X.; SIU, W. S.; FUNG, C. H.; CHENG, L.; WONG, C. W.; ZHANG, C.; HUNG, L. K. Pro-angiogenic effects of *Carthami Flos* whole extract in human microvascular endothelial cells in vitro and in zebrafish in vivo. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1256-1263, 2014.

ZHU, W. inactivating the ERK signaling pathway. v. 43, n. 3, p. 146–152, 2011.

ZHU, W.; FU, A.; HU, J.; WANG, T.; LUO, Y.; PENG, M.; MA, Y.; WEI, Y.; CHEN, L. 5-Formylhonokiol exerts anti-angiogenesis activity via inactivating the ERK signaling pathway. **Experimental & molecular medicine**, v. 43, n. 3, p. 146-152, 2011.

ZON, L. I.; PETERSON, R. T. In vivo drug discovery in the zebrafish. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 1, p. 35-44, 2005.