



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DIEGO QUARESMA FERREIRA

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA E TOXICIDADE AGUDA DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Libidibia ferrea* EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Macapá
2019

DIEGO QUARESMA FERREIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA E TOXICIDADE AGUDA DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Libidibia ferrea* EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Amapá
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Anna Eliza Maciel de F. M.
Oliveira

**Macapá
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Ferreira, Diego Quaresma.

Estudo da atividade antidiabética e toxicidade aguda do extrato hidroetanólico dos frutos de *Libidibia ferrea* em zebrafish (*Danio rerio*) / Diego Quaresma Ferreira ; Orientadora, Anna Eliza Maciel Faria Mota Oliveira. – Macapá, 2019.

123 f.

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

1. Diabetes. 2. Plantas medicinais. 3. Diabéticos. I. Oliveira, Anna Eliza Maciel Faria Mota, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

616.462 F383e

CDD. 22 ed.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): DIEGO QUARESMA FERREIRA

Orientador(a): Anna Eliza Maciel de Farias Mota Oliveira

Prof^a Dr^a Anna Eliza Maciel Farias Mota Oliveira

Professora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá,
UNIFAP.

Prof^a Dr^a Beatriz Martins Sá Hyacienth

Professora do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal do Amapá,
UNIFAP.

Prof^a Dr^a Gisele Custódio de Souza

Professora da Rede Estadual de Ensino da Secretaria de Estado da Educação,
SEED.

Data: 25/10/2019

Dedico este trabalho a minha avó materna, Ana Moraes Quaresma (in memoriam). Minha maior referência, uma mulher livre de vaidades, cheia de lutas e que representa a resistência do povo brasileiro e, sobretudo da mulher brasileira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor, misericórdia e favor, sempre me guiando e permitindo que as pessoas que por mim passaram nesta caminhada, pudessem me transformar a cada dia em um ser humano melhor. Pois em todos os momentos Ele esteve presente.

A minha família na pessoa de minhas mães Maria Liduina Moraes Quaresma e Sandra Maria Moraes Quaresma, a minha maior incentivadora de todas as jornadas que eu me proponho a enfrentar. Não existe um passo dado por mim que eu não pense nos seus ensinamentos e conselhos.

A minha orientadora Anna Eliza Maciel de Farias Mota Oliveira, por me orientar e nunca desistir de mim, mesmo frente a tantos momentos desafiadores que passamos e, sobretudo por me permitir estar sempre confortável para decidir (juntos) os caminhos que poderíamos seguir.

A Raquel Silva Araújo, por colaborar com seu conhecimento e paciência no desenvolvimento deste trabalho. És exemplo de seriedade e dedicação.

A botânica e amiga, Rosângela Sarquis, por me acolher tão bem e, pacientemente me ensinar os caminhos metodológicos em relação a minha planta, além de literalmente “colocar a mão na massa” junto comigo.

Aos meus amigos, na pessoa de Jemima Messias, por sempre estar ao meu lado em toda a minha caminhada pessoal, profissional e acadêmica. És um abrigo para todos os momentos, te digo que é recíproco e pode contar sempre comigo.

A amiga Rosana Tomazi, por não medir esforços para viabilizar caminhos e possibilidades que fizeram grande diferencial na trajetória deste trabalho. Obrigado por ter essa energia positiva que transborda.

Ao meu companheiro Rômulo Ataíde de Lima, por entender por muitas vezes minha ausência e os muitos ‘Nãos’ ditos à momentos de lazer e, por sempre ter me ajudado diretamente nos experimentos de bancada, sendo paciente, dedicado e, sobretudo por compartilhar sua vivência no que concerne ao aquarismo.

Ao laboratório de Nanobiotecnologia, na pessoa do Professor Drº Caio Fernandes Pinho. Agradeço os ensinamentos grandiosos que irei levar comigo para todo o sempre.

Ao laboratório de Pesquisa em Fármacos, na pessoa do Professor Drº José Carlos Tavares por me socorrer em um momento de muita aflição, me estendendo a mão e ajudando no caminhar deste trabalho.

A equipe da Plataforma Zebrafish, na pesso Gisele Custódio e Brenda Ortiz, por pacientemente proporcionarem um ambiente positivo para o aprendizado acerca do Zebrafish.

A coordenação de enfermagem, nas pessoas dos Professores: Rubens Alex, Tatiana Calandrini e Luzilena Prudêncio, por entender que a Acadêmia é lugar de construção e muitas possibilidades. Gratidão pela ajuda a mim dispensada.

A Universidade Federal do Amapá e ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por me proporcionarem essa oportunidade crescimento acadêmico.

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1.1 Diabetes <i>Mellitus</i>	19
1.1.1.1 Definição e magnitude.....	19
1.1.1.2 Fisiopatologia.....	20
1.1.2 Plantas medicinais e fitoterápicos aplicados à diabetes.....	22
1.1.3 <i>Libidibia ferrea</i>	24
1.1.3.1 Características botânicas.....	26
1.1.3.2 Atividade biológica.....	27
1.1.3.3 Frutos.....	28
1.1.3.4 Cascas.....	32
1.1.3.5 Folhas.....	34
1.1.3.6 Fitoquímica.....	41
1.1.3.7 Toxicidade de <i>L. ferrea</i>	45
1.1.4 <i>Danio rerio</i>.....	46
1.1.4.1 Branquias.....	47
1.1.4.2 Fígado.....	48
1.1.4.3 Rins.....	48
1.1.4.4 Intestino.....	49
1.1.4.5 Reprodução em <i>D. rerio</i>	49
1.1.4.5 Toxicidade aguda em <i>D. rerio</i>	52
1.1.4.5 <i>D. rerio</i> como modelo animal para estudos voltados à diabetes.....	53
2 OBJETIVOS.....	55
2.1 OBJETIVO GERAL.....	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1 MATERIAIS.....	56
3.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	56
3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	56
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO.....	57

3.5 ANIMAIS.....	58
3.6 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA EM <i>D. rerio</i>	58
3.6.1 Toxicidade em embriões.....	58
3.6.2 Toxicidade oral em <i>D. rerio</i> adulto.....	59
3.6.2.1 Avaliação Comportamental.....	60
3.6.2.2 Avaliação histopatológica.....	61
3.7 INDUÇÃO DE HIPERGLICEMIA.....	62
3.8 TRATAMENTO.....	62
3.9 COLETA DE SANGUE.....	63
3.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	63
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO.....	64
4.2 TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES.....	66
4.3 TOXICIDADE AGUDA EM ZEBRAFISH ADULTO.....	68
4.4 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DO EHEFLf.....	79
4.4.1 Analise dos parâmetros bioquímicos.....	81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	85
REFERENCIAS.....	87
ANEXO 1.....	105
APÊNDICE 1.....	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição de estudos que utilizaram <i>L. ferrea</i> de acordo com cada porção da planta e atividade biológica.....	36
--	----

Tabela 1. Informações taxonômicas e populares da espécie <i>Libidibia ferrea</i>	25
Tabela 2. Classificação de Alterações comportamentais de acordo com estágios.....	60
Tabela 3. Aplicações de aloxano de acordo com a semana e os dias de aplicação.....	62
Tabela 4. Identificação dos constituintes do EHEFLf por LC-MS/MS.....	66
Tabela 5. Visão geral das alterações/efeitos teratogênicos causados pelas concentrações do EHEFLf em embriões de <i>D. rerio</i> em 96 hpf.....	67
Tabela 6. Distribuição de alterações histopatológicas de Brânquias de <i>D. rerio</i> por IAH de acordo com o nível de alterações – EHEFLf.....	71
Tabela 7. Distribuição de alterações histopatológicas de Brânquias de <i>D. rerio</i> por IAH de acordo com o nível de alterações – SP1% (Veículo).....	71
Tabela 8. Distribuição de alterações histopatológicas de fígado de <i>D. rerio</i> por IAH de acordo com o nível de alterações – EHEFLf.....	73
Tabela 9. Distribuição de alterações histopatológicas de fígado de <i>D. rerio</i> por IAH de acordo com o nível de alterações – SP1% (Veículo).....	74
Tabela 10. Distribuição de alterações histológicas de intestino de <i>D. rerio</i> por IAH de acordo com o nível de alterações – EHEFLf.....	76
Tabela 11. Distribuição de alterações histológicas de intestino de <i>D. rerio</i>	76

por IAH de acordo com o nível de alterações – SP1%
(Veículo).....

Tabela 12. Distribuição de alterações histopatológicas de rins de *D. rerio*
por IAH de acordo com o nível de alterações – 78
EHEFLf.....

Tabela 13. Distribuição de alterações histopatológicas de rins de *D. rerio*
por IAH de acordo com o nível de alterações – 79
SP1%.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore de <i>Libidibia ferrea</i>	27
Figura 2. Frutos de <i>Libidibia ferrea</i>	27
Figura 3. Estrutura química do ácido elágico.....	44
Figura 4. Estrutura química do ácido gálico.....	44
Figura 5. Localização anatômica referente as barbatanas de <i>D. rerio</i>	47
Figura 6. Aquário de reprodução em momento em ocorria a postura.....	50
Figura 7. Ovos coletados com aproximadamente 0,75 hpf.....	50
Figura 8. Macho de <i>D rerio</i>	51
Figura 9. Fêmea de <i>D rerio</i>	51
Figura 10. Estágios de desenvolvimento embrionário do <i>D. rerio</i> até 7 dias pós fertilização.....	51
Figura 11. Fluxograma de obtenção do EHEFLf.....	57
Figura 12. Fluxograma da Toxicidade em <i>D. rerio</i> adulto, segundo OECD 425.....	60
Figura 13. Cromatograma TIC da análise LC-MS/MS do extrato de <i>L. ferrea</i>	65
Figura 14. Efeitos teratogênicos em embrião de <i>D. rerio</i> , tratado com EHEFLf 500 mg/L. Onde são observados: Não descolamento da cauda – Nc, Edema cardíaco – Ec, Edema de saco vitelino – Esv.....	68
Figura 15. Efeitos teratogênicos em embrião de <i>D. rerio</i> , tratado com EHEFLf 250 mg/L. Onde são observados: Ausência de barbatana.....	68

peritoneal – Abpe Escoliose – Sc.....	
Figura 16. Distribuição de alterações histopatológicas em brânquias, fígado, intestino e rins, a partir da administração de 2g/kg de EHEFLf. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. ***P valor: < 0,05.....	69
Figura 17. Alterações histopatológicas de brânquias de <i>D. rerio</i> – EHEFLf.....	72
Figura 18. Alterações histopatológicas de brânquias de <i>D. rerio</i> - SP1%.....	72
Figura 19. Alterações histopatológicas de fígado de <i>D. rerio</i> – EHEFLf.....	74
Figura 20. Alterações histopatológicas de fígado de <i>D. rerio</i> - SP1%.....	74
Figura 21. Alterações histopatológicas de intestino de <i>D. rerio</i> – EHEFLf.....	77
Figura 22. Alterações histopatológicas de intestino de <i>D. rerio</i> - SP1%...	77
Figura 23. Alterações histopatológicas de rins de <i>D. rerio</i> – EHEFLf.....	78
Figura 24. Alterações histopatológicas de rins de <i>D. rerio</i> - SP1%.....	78
Figura 25. Atividade antidiabética do EHEFLf em zebrafish adulto após sete dias de tratamento por via oral. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. ANOVA, posteriormente test de Tukey. & e #p valor: < 0,0001.....	80
Figura 26. Resultados de testes bioquímicos realizados em modo cinético UV-IFCC – TGO. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. @p valor: < 0,001. &P valor: < 0,0001.....	82
Figura 27. Resultados de testes bioquímicos realizados em modo cinético UV-IFCC – TGP. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. *p valor: < 0,5. ^β P valor: < 0,5...	83

Figura 28. Resultados de testes bioquímicos realizados em método colorimétrico - Uréia. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. 84
Anova, posteriormente test de Tukey. * p valor: $< 0,5$

Figura 29. Resultados de testes bioquímicos (Creatinina) realizados em método colorimétrico. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. 84
Anova, posteriormente test de Tukey. * p valor: $< 0,5$

ALT	Aumento Do Lumem Tubular
ANVISA	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
CB	Capsula De Bowmam
CDTC	Degeneração Citoplasmática Das Células Tubulares
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DC	Desarranjo Dos Capilares
DIC	Dilatação Dos Capilares
DEL	Distanciamento Do Revestimento Epitelial Do Ápice Do Vilo Intestinal
DELS	Deslocamento Ou Elevação Das Lamelas Secundárias
DHTL	Degeneração Hialina Tubular Leve
DLP	Destacamento Da Lamina Própria
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
EHEFLf	Extrato Hidroetanólico dos frutos de <i>Libidibia Ferrea</i>
ESB	Estagnação Biliar
G	Glomérulo
HCBSL	Hiperplasia Das Células Epiteliais Na Base Das Lamelas Secundárias
HGC	Hiperplasia De Células Caliciformes
HpF	Horas pós fertilização
HT	Tecido Hematopoetico
IAH	Índice De Alterações Histopatológicas
IBGE	Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística
IDF	International Diabetes Federation
ILS	Infiltração Linfocítica Estromal
ILI	Infiltração De Leucócitos
LCC	Perda Do Contorno Celular
LP	Lamelas Primárias
LS	Lamelas Secundárias

NA	Atrofia Nuclear
OECD	<i>Organization For Economic Cooperation And Development</i>
RT	Túbulos Renais
OT	Obstrução Tubular
SLI	Infiltração Linfocítica Estromal
SP1%	<i>Solução De Propilenoglicol 1%</i>
SVC	Seio Venoso Central
TO	Toxicidade Aguda
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico- Pirúvica
VC	Vacuolização Citoplasmática
VN	Vacuolização Nuclear
WHO	World Health Organization

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA E TOXICIDADE AGUDA DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Libidibia ferrea* EM ZEBRAFISH (*Danio
rerio*)**

Diego Quaresma Ferreira

Anna Eliza Maciel de F. M. Oliveira

Introdução: O Diabetes Mellitus (DM) é conjunto de desordens metabólicas, que são caracterizadas clinicamente por um quadro de hiperglicemia, problema este resultante da deficiência na produção ou na ação da insulina no organismo. A baixa adesão ao tratamento é um dos principais problemas para controle da doença. Assim, os produtos naturais, amplamente utilizados na medicina tradicional da população amazonida, podem ser fonte para descoberta de novos fármacos. A *Libidibia ferrea*, é uma planta que apresenta diversas atividades biológicas, dentre elas, a antidiabética. **Objetivo:** avaliar a Toxicidade Aguda (TA) em zebrafish adulto e embriões, e atividade antidiabética do extrato hidroetanólico dos frutos de *Libidibia ferrea* (EHEFLf) em zebrafish com diabetes induzida por injeção intraperitoneal de aloxano. **Metodologia:** o EHEFLf foram empregados em zebrafish adulto na dose de 2g/kg para toxicidade aguda e para embriões nas concentrações de 25, 50, 125, 250, 500 mg/L, utilizou-se as recomendações da OECD respectivamente 425 e 236, já para a indução de hiperglicemia foram administradas três aplicações de II de aloxano na dose: 350 mg/kg (três aplicações), após indução, o tratamento foi realizado por gavagem uma vez por dia, durante 7 dias nas doses de 50, 75, 150, 300 mg/kg, além de utilizar como controle: água, solução de propilenoglicol 1% e metformina 2,4 mg/kg. **Resultados:** Na TA, apesar de não apresentar sinais comportamentais do animal adulto EHEFLf apresentou alterações histopatológicas em fígado e rins; a TA em embriões apresentou também toxicidade e alterações morfológica/teratogênicas **Conclusão:** o presente estudo descreveu que apesar do EHEFLf não causar alterações comportamentais, nem morte, ele apresenta toxicidade no fígado e rins de zebrafish adulto; nos embriões, o

EHEFLf apresentou alterações morfológicas/teratogênicas nas concentrações mais altas: 250 e 500 mg/kg; enquanto a atividade antiabética foi excelente e houve diminuição significativa em todos os grupo: 50, 75, 150 e 300 kg/kg, em comparação ao grupo de água e SP1%.

Palavras-Chave: Diabetes Mellitus; Caesalpiniae; Toxicidade; Zebrafish.

**STUDY OF ANTIDIABETIC ACTIVITY AND ACUTE TOXICITY OF
HYDROETHANOLIC EXTRACT OF IRON *Libidibia ferrea* IN ZEBRAFISH
(*Danio rerio*)**

Diego Quaresma Ferreira

Anna Eliza Maciel de F. M. Oliveira

Introduction: Diabetes Mellitus (DM) is a set of metabolic disorders, which are clinically characterized by hyperglycemia, a problem that is caused by reproduction in the production or action of insulin in the body. Poor adherence to treatment is one of the main problems for disease control. Thus, natural products, widely used in traditional medicine of the Amazonian population, can be a source of discovery of new products. *Libidibia ferrea*, is a plant that has several biological activities, among them, an antidiabetic. **Objective:** To evaluate the Acute Toxicity (TA) in adult zebrafish and embryos, and antidiabetic activity of hydroethanolic extract of fruits of *Libidibia ferrea* (EHEFLf) in zebrafish with diabetes induced by intraperitoneal injection of alloxane. **Methodology:** EHEFLf was used in adult zebrafish 2g / kg dose for acute toxicity and 25, 50, 125, 250, 500 mg / L embryos, used as OECD test, 425 and 236, respectively. for induction of hyperglycemia, three doses of alloxane II were administered: 350 mg / kg (three applications), after induction, or treatment was performed once a day for 7 days at doses of 50, 75, 150, 300 mg / kg, in addition to use as control: water, 1% propylene glycol solution and metformin 2.4 mg / kg. **Results:** In AT, although not presenting behavioral signs of the adult animal, the EHEFLf presents histopathological alterations in the liver and kidneys; TA in embryos also showed toxicity and morphological / teratogenic changes **Conclusion:** The present study described that although EHEFLf does not cause behavioral changes or death, it has toxicity in liver and zebrafish washes; in embryos, EHEFLf alters morphological / teratogenic changes at high highs: 250 and 500 mg / kg; while an antiabetic activity was excellent and showed significant difference in all groups: 50, 75, 150 and 300 kg / kg, compared to the water and SP1% group.

Keywords: Diabetes Mellitus; Caesalpinia; Toxicity; Zebrafish.

O Diabetes Mellitus (DM), tem mostrado grande incidência nos mais diversos tipos específicos de populações, desde as crianças até as pessoas com mais idade. Neste contexto, o Brasil perpassa por um período em que ocorre um aumento na expectativa de vida de sua população, o que acarreta a um aumento da prevalência das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), dentre elas o diabetes, doença esta que tem sido responsável por grande percentual de morbimortalidade a nível regional, nacional e mundial.

Este potencial problema de saúde pública, considerado atualmente como uma epidemia, configura-se basicamente por hiperglicemia resultante de um conjunto de desordens fisiopatológicas. O diabetes acomete principalmente uma parcela da população que possui baixo poder aquisitivo e consequentemente deficiências em nível de escolaridade, motivo este que colabora potencialmente para a não adesão ao tratamento, o que reflete a custos onerosos para o Sistema Único de Saúde (SUS) principalmente com internações advindas de um péssimo controle glicêmico, gerando impacto econômico para os indivíduos, famílias e sistemas de saúde (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Diante deste amplo problema global fazem-se necessárias alternativas que facilitem adesão dos pacientes ao tratamento e diminua as altas taxas de internação e morbimortalidade que esta doença vem causando. Entretanto mediante as pesquisas e estudos avançados e inovadores ainda não se tem a cura para o DM, existindo apenas medicamentos para o seu controle. Sendo assim, as plantas medicinais tornam-se uma alternativa muito utilizada por pessoas acometidas pelas DCNT, contudo o seu uso ocorre de forma indiscriminada, partindo da ideia empírica de que as mesmas não possuem efeitos adversos. Dentre o grupo de plantas utilizadas na medicina popular, encontram-se aquelas que possuem efeito hipoglicemiante. Diante disto estudos que comprovem a eficiência e eficácia destas plantas, bem como os efeitos tóxicos, dose efetiva e biodisponibilidade tornam-se necessários e importantes.

Dentre as diversas plantas utilizadas para obter o efeito hipoglicemiante no DM encontra-se a *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) altamente utilizada de forma popular por suas propriedades cicatrizantes e hipoglicemiantes, entretanto, apesar de ser amplamente estudada, se desconhece a existência de estudos envolvendo o uso de zebrafish.

O zebrafish é um peixe de água doce, pequeno e que atualmente vem tendo o uso ascendente nas pesquisas científicas, por ser de baixo custo, diminuir o uso de mamíferos em pesquisas experimentais, possuir fácil reprodução e adaptação, além de ter uma alta semelhança genética com os seres humanos, principalmente nas vias fisiopatológicas de grande número de doenças, como é o caso do diabetes mellitus. Sendo assim, o escopo deste trabalho é estudar aspectos referentes à *L. ferrea*, além de elucidar seus principais compostos, aspectos referentes a sua toxicidade e sua atividade antidiabética.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Diabetes Mellitus

1.1.1.1 Definição e Magnitude

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome resultante de um distúrbio no metabolismo de açúcares, gorduras e proteínas, constituindo assim um conjunto heterogêneo de alterações metabólicas que apresentam como principal característica a hiperglicemia (WHO, 1999; ADA, 2014; SBD, 2017). É uma doença considerada endêmica, e conseqüentemente um problema de saúde pública no mundo, alcançando proporções crescentes no que se refere ao aparecimento de novos casos (CDC, 2014).

Atualmente o DM se classifica de acordo com a etiologia, em quatro grupos: DM Tipo 1 (DM1), que se subdivide em DM1 tipo A e DM1 tipo B, DM Tipo 2 (DM2), DM Gestacional e outros tipos específicos de DM (estão incluídos defeitos genéticos nas células beta do pâncreas que variam desde a produção até a secreção de insulina, além de incluir DM secundários a processos infecciosos ou a patologias) (WHO, 1999; BRASIL, 2013; SBD, 2017). No entanto as principais literaturas que servem como suporte nacional para os profissionais da área da saúde citam apenas as três primeiras como classificação principal (DM1, DM2 e DM gestacional), isso ocorre devido ao difícil diagnóstico das demais (CDC, 2014).

Segundo o atlas da *International Diabetes Federation* (IDF) de (2015), apesar da predominância mundial do DM ocorrer principalmente na população urbana, esta epidemia está se tornando preocupante na população rural e de média e baixa renda, além da baixa escolaridade, o que contraria com um dos pilares para o sucesso no tratamento, que é a educação para o monitoramento da doença, bem como para a manutenção de sua própria saúde (IDF, 2015, SBD, 2019). Além disso, a população que se destaca e encontra-se em situação altamente vulnerável como é o caso da população indígena. Mundialmente 382 milhões de pessoas vivem com DM, ou seja, 8,3% da população global, com estimativa que esse número aumente para 595 milhões

em 2035. Com essa perspectiva, em menos de duas décadas, uma a cada dez pessoas terá diabetes (IDF, 2015). Além do exposto, vale ressaltar que existem aproximadamente 175 milhões de pessoas em todo mundo que ainda não são diagnosticadas, porém vivem com DM.

No ano de 2013, os custos com as despesas de saúde relacionadas à DM chegaram a aproximadamente 548 bilhões de dólares o que equivale a 11% do total gasto em todo mundo com a saúde humana, com alta taxa de morbimortalidade, apresentando aproximadamente cinco milhões de mortes (CDC, 2014). Em contraste com a problemática relacionada ao DM e, do grande investimento no controle das DCNT, grande parte das pesquisas a cerca da fisiopatologia, tratamento, diagnóstico e novas tecnologias aplicadas a este grupo de doenças estão localizados em países como Estados Unidos e Inglaterra (DUNCAN *et al.*, 2012).

Segundo Malerbi e Franco (1992), no único estudo multicêntrico realizado no Brasil, o DM é um importante problema de saúde pública e está em comparação com países em desenvolvimento, obtendo a prevalência de 7,6% entre adultos de 30 a 69 anos de idade, vale ressaltar que o Brasil está em quarto lugar no ranking mundial com maior prevalência de DM (CDC, 2014). No Brasil, as DCNT atualmente representam cerca de 70% das causas de morte e na pesquisa nacional de saúde realizada em 2013 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 6,9% da população brasileira com idade igual ou maior que 18 anos referiram ter DM, o que equivale a 9,1 milhões de pessoas com a doença. No entanto as regiões Norte e Nordeste foram as que apresentaram os menores resultados, alcançando valores de 4,3% e 5,4% (ISER *et al.*, 2015).

1.1.1.2 Fisiopatologia

Segundo Miranda (2018), a fisiopatologia da diabetes, está vinculada de forma inicial com fatores influenciadores/desencadeadores, estes podem ser classificados como fatores genéticos e ambientais. O primeiro está estritamente ligado a DM1, já o segundo está relacionado com os dois tipos de diabetes, podendo potencializar a destruição das células pancreáticas no DM1. Além disso os fatores ambientais (estilo de vida não saudável, sedentarismo, etilismo, tabagismo, algumas infecções virais e bacterianas) podem influenciar

na produção e/ou ação da insulina nos tecidos periféricos (BARREIROS, 2015).

Na DM1 a fisiopatologia pode ser descrita através da destruição auto-imune de células produtoras de insulina no pâncreas, a chamada célula β pancreática. Dentro deste processo, a destruição dá-se por células T CD4+, CD8+ e macrófagos, a destruição destas células leva a uma deficiência na secreção de insulina que resulta em distúrbios metabólicos (BAYNES, 2015). A presença de anticorpos circulantes para células de ilhotas e insulina também são marcadores importantes nesse processo, gerando assim então uma subclassificação a DM1 tipo A, que mesmo não tendo sua fisiopatologia totalmente esclarecida, exposições ambientais como infecções virais, por exemplo, estão envolvidas nesse processo, dentro deste contexto, o mesmo processo pode ser gerado por causa idiopática e neste caso subdivide-se como DM1 tipo B (SBD, 2017).

Segundo a SBD (2017), diferente dos marcadores auto-imunes presentes na DM1, a DM2 não os possui, no entanto sua fisiopatologia está associada diretamente ao excesso de peso e a síndrome metabólica, gerando falência das células β pancreática, resistência hepática a insulina, aumento da produção hepática de glicose, aumento da filtração renal e aumento da lipólise. Descreveno de forma sucinta os eventos fisiopatológicos em que a DM2 perpassa, podemos colocar de forma subsequente que inicialmente existe um aumento do tecido adiposo, principalmente abdominal, o que leva a um aumento da oxidação lipídica, gerando o início da tão fala resistência insulínica, bloqueando assim a função do ciclo fisiológico do glicogênio, sendo assim, apesar da secreção de insulina ser mantida, a não utilização do glicogênio acaba impedindo o armazenamento adicional de glicose, levando a instalação de um quadro de DM2, que consequentemente leva ao processo de exaustão das células β pancreáticas (BAYNES, 2015).

O tratamento para os diversos tipos de diabetes, incluem medidas fundamentais para se obter sucesso terapêutico e se dividem em tratamento farmacológico (insulinas e antidiabéticos orais) e não farmacológicos (atividade física, alimentação equilibrada e, educação para a saúde), além de se fazer necessária a atuação de equipe multiprofissional para subsidiar o suporte

necessário para alcançar a normoglicemia (CONCEIÇÃO et al., 2017; BRASIL, 2019; SBD, 2019).

1.1.3 Plantas medicinais e fitoterápicos aplicados a diabetes

Os tratamentos atuais para diabetes atendem algumas, mas não todas as necessidades dos pacientes. Portanto, novos medicamentos antidiabéticos estão em grande demanda. Mundialmente a utilização de plantas medicinais tem servido como base para início da descoberta de muitos produtos alternativos que podem auxiliar no tratamento de diversas doenças (ROCHA et al., 2015). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), plantas medicinais são aquelas utilizadas de forma geral pela população com o objetivo de aliviar sintomas, prevenir ou curar enfermidades, enquanto os fitoterápicos são medicamentos que possuem seu princípio ativo obtido de matérias primas vegetal (BRASIL, 2010). Atualmente o crescimento dos estudos acerca das plantas medicinais e dos fitoterápicos, constituem uma forte alternativa de inovação farmacêutica, bem como fonte estratégica para propiciar melhor desenvolvimento social e econômico no país. Neste contexto, a biodiversidade brasileira mostra uma rica fonte para estudos que visem à ampliação das alternativas terapêuticas para a saúde da população (BRASIL, 2016).

Na cidade de Assunção no Paraguai 78,1% dos pacientes atendidos no Programa Nacional de Diabetes fazem a utilização de plantas medicinais, 48,5% desta população utilizava a infusão preparada através das folhas, porém relatavam utilizar raiz, folha, fruto, caule, bem como a planta inteira (MAIDANA; GONZÁLEZ; DEGEN, 2015).

A população brasileira é constituída por uma mistura de povos e raças e, dentro desta vertente, a utilização de produtos naturais, bem como de plantas medicinais ocorre de forma predominante na população indígena, quilombolas e as comunidades tradicionais de cada localidade, seu uso chega a 82% com transmissão destes conhecimentos de forma oral entre as gerações (GADELHA et al., 2013). A grande maioria dos pacientes que possuem DCNT no Brasil, bem como o DM, utilizam plantas medicinais como tratamento auxiliar para ajudar a minimizar os níveis glicêmicos, porém esse uso, na maior parte das vezes, não segue um protocolo e acaba não sendo levado em

consideração os efeitos adversos ou efeitos sinérgicos que esta alternativa pode ocasionar a estas pessoas (SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012; DEFANI; OLIVEIRA, 2015).

Segundo a SBD (2017) o tratamento para DM tem como principal pilar as terapias farmacológicas, embora a mudança nos hábitos alimentares e atividade física tenham um papel de grande importância nesse processo. Neste contexto, toda pessoa com DM deve realizar tratamento com pelo menos um medicamento que diminua efetivamente os níveis de glicose. Em um país com grandiosa biodiversidade como o Brasil, apesar da nova diretriz da SBD descrever três plantas: *Bauhinia variegata* (pata de vaca), *Cissus sicyoides* (insulina vegetal) e *Syzygium cumini* (Jabolão), como adjuvantes do tratamento fitoterápico para DM, ela não as recomenda para uso, pois ressalta a necessidade de mais estudos que descrevam o potencial da planta, seu metabolismo, mecanismo e local de ação, dose ideal e letal, e principalmente seus riscos para a saúde humana.

Com o rápido avanço de novas tecnologias e o aumento das pesquisas sobre produtos naturais, muitas espécies de plantas e seus derivados demonstraram efeitos antidiabéticos promissores, fornecendo assim pistas valiosas para o desenvolvimento de novos agentes que poderiam suplementar as terapias atuais (HUNG et al., 2012). Como um dos principais exemplos de espécie vegetal para o tratamento da diabetes podemos citar o extrato de *Galega officinalis* L. (Fabaceae – Papilionoideae). Seu uso por via oral demonstrou resultados promissores ao reduzir os sinais e sintomas clássicos de DM descompensado. Devido a esse efeito terapêutico, muitos estudos foram realizados com essa espécie que demonstrou ser rica em guanidina. A partir de então foi sintetizada a metformina, um importante hipoglicemiante oral e uma das drogas mais prescritas nos Estados Unidos para tratamento com DM2 (MUNHOZ; FRODE, 2017).

Outros estudos recentes com a espécie tem mostrado novos mecanismos de ação como a restauração da produção de células sanguíneas pela medula óssea a fim de prevenir o desenvolvimento e complicações da doença (NAGALIEVSKA et al., 2018).

1.1.3 *Libidibia ferrea*

A família Fabaceae é uma das maiores e mais representativas dentre as dicotiledôneas. Nativa da flora brasileira e considerada uma das mais importantes famílias botânicas distribuídas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, destaca-se por sua variedade de formas de vida e ampla ocorrência. Também conhecida como Leguminosae, tem sua presença confirmada em estados de todas as regiões do Brasil, sendo considerada a maior família em número de espécies do país (SOUZA, LORENZI, 2012). O fruto duro e impermeável do tipo vagem é bastante característico da família (COELHO et al., 2009), além da riqueza de compostos bioativos da classe dos flavonóides e isoflavonóides presentes nos seus derivados vegetais (LORENZI, 2014). Três subfamílias a representa: Papilionoideae (ou Faboideae), Mimosoideae e Caesalpinoideae (SOUZA, LORENZI, 2012).

Dentro dessa última subfamília citada, temos o gênero *Libidibia* que compreende aproximadamente 500 espécies distribuídas em todo o mundo (FERREIRA, SOARES, 2015). Vários estudos realizados com algumas destas espécies demonstram sua eficácia como fonte natural de novas entidades químicas e novas aplicações terapêuticas, revelando diversidade estrutural, e demonstrando propriedades úteis para o desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais (ZANIN et al., 2012).

Uma espécie importante e bastante explorada em relação a seus fitoquímicos e atividades farmacológicas é a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) (tabela 1) basônimo *Caesalpineia ferrea* (Mart. ex Tul.) (Queiroz, L.P., 2009), popularmente conhecida como pau-ferro, jucá, miureitá, pau-ferro-do-Norte, pau-ferro-da-Mata pau-ferro-verdadeiro, jucaína e pau de jucá (LEWIS, 2015).

Tabela 1. Informações taxonômicas e populares da espécie *Libidibia ferrea* (FLORA DO BRASIL, 2018)

<i>Libidibia ferrea</i>	
	
CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae
Ordem	Fabales
Familia	Fabaceae (Leguminosae)
Subfamília	Caesalpinoideae
Gênero	<i>Libidibia</i> (DC.) Schltdl.
Espécie	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.)
BASINÔMIO	
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. ex Tul.	
SUBSP. /VARIAÇÃO	
<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P.Queiroz var. <i>ferrea</i> , <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>glabrescens</i> (Benth.) L.P.Queiroz, <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>leiostachya</i> (Benth.) L.P.Queiroz, <i>Libidibia ferrea</i> var. <i>parvifolia</i> (Benth.) L.P.Queiroz	
NOME POPULAR	
Jucá, Pau-ferro, ibirá-obi, imirá-itá, jucaína, muira-ita, muira-obi, miureitá, pau-ferro-do-Norte, pau-ferro-da-Mata, pau-ferro-verdadeiro, quebra-foice, quiriripianga, bois de fer dos franceses, iron wood dos ingleses, mururé, muirapixuna, giúna.	

1.1.3.1 Características botânicas

Libidibia ferrea, ou jucá é uma árvore nativa e endêmica do Brasil, presente em vários domínios fitogeográficos, tais como Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Figura 1). De ampla dispersão, tem sua distribuição registrada em todo o território brasileiro, principalmente no Norte e Nordeste, estendendo-se a região sudeste na Floresta Pluvial Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2018).

Espécie arbórea, heliófita, de tronco curto, liso e com bifurcações, a *L. ferrea* possui alto porte, medindo entre 10-15 metros (figura 1). Sua cerne dura e resistente faz crescer o interesse da indústrias moveleira e de construção civil pela sua madeira que é pesada e de durabilidade natural. Apresenta importância na vegetação marginal dos cursos de água, controlando a erosão, o assoreamento e auxiliando no controle da temperatura. Além disso, mostra boa regeneração sendo muito utilizada para arborização de parques e praças (SANTOS et al., 2010).

Seus frutos são secos, do tipo vagem (figura 2) e, na maturação, adquirem coloração escura (amarelo-amarronzada). O tamanho e morfologia podem ser influenciados pelas condições edafoclimáticas de cada local de cultivo (SILVA et al., 2017). Estes, por serem indeiscentes e de casca dura, podem ser coletados no chão após queda espontânea e aparecem de forma mais intensa nos meses de maio e junho (LORENZI, 2002). Geralmente surgem no período de menor índice pluviométrico, que coincide com os meses de agosto a novembro (COSTA et al., 2016).

As sementes exotestais geralmente são de 6 a 10 por fruto (GALDINO et al., 2007). Possuem um endosperma bem desenvolvido, constituído em grande parte por um carboidrato de armazenamento, o galactomanano, que fica entre o revestimento da semente e os cotilédones (GALLAO et al., 2013). O tegumento é duro e impermeável, o que pode dificultar a absorção de água, prolongar o tempo de germinação e desuniformizar a produção racional de mudas (NASCIMENTO, OLIVEIRA 1999). A posição da semente no fruto também pode interferir nesses fatores, quando na posição mediana, possuem menor grau de dormência quando comparadas com a distal e proximal (NOGUEIRA et al., 2010). Apresentam germinação baixa e irregular (ALVES et al., 2009). Sua propagação é limitada pela dormência das sementes, que é

imposta pela impermeabilidade do tegumento à água, proporcionando menor emergência e vigor (SANTANA et al., 2011; CARVALHO et al., 2017). Em sementes escarificadas foi comprovado que a velocidade de emergência de plântulas aumenta (ARAUJO et al., 2017) e que pode ocorrer também influência da temperatura (LIMA et al., 2006).

Suas flores amarelas são pequenas e crescem em cachos que aparecem, nos meses de abril a junho, geralmente coincidindo com o período chuvoso (COSTA et al., 2016). Perenifólia ou semi-decídua, apresenta folhas alternas, compostas, folioladas que, na árvore adulta, podem medir entre 7-20 cm apresentando de 4 a 7 pinas e com até 6 pares de folíolos (GALDINO et al., 2007). Recomenda-se a coleta e uso das folhas para uso terapêutico nos meses em que ocorrem os menores números de dias das fenofases, pelo fato de que nessa época as substâncias ativas do vegetal podem estar em maiores quantidades nas flores e frutos, o que prejudicaria a coleta de folhas (COSTA et al., 2016).

Figura 1. Árvore de *Libidibia ferrea*



Fonte: Próprio autor

Figura 2. Frutos de *Libidibia ferrea*



Fonte: Próprio autor

1.1.3.2 Atividade biológica

As plantas medicinais têm sido usadas pela população como um tratamento alternativo para várias doenças há milhares de anos. Atualmente, a

substituição da terapia convencional por novos medicamentos à base de produtos naturais tem sido crescente (DUTRA et al., 2016).

O Jucá é profundamente utilizado na medicina tradicional do Brasil principalmente nas regiões Norte e Nordeste (MACEDO et al., 2018). A diversidade de compostos bioativos presentes em vários derivados vegetais da entrecasca, frutos, sementes, folhas, casca e as raízes a torna uma espécie importante e alvo de pesquisas que indicam seu grande potencial biológico (CAVALHEIRO et al, 2009; FERREIRA JUNIOR et al., 2011). Existe uma forte associação entre a alta quantidade de taninos presentes na espécie e os efeitos cicatrizantes, anti-inflamatórias (ARAUJO et al., 2008) e antidiarréicos popularmente nela observados (SIQUEIRA et al., 2012).

Sua entrecasca, posta em infusão, é amplamente utilizada para o tratamento de feridas e também para combater a tosse crônica, a asma, diabetes mellitus e dores ósseas (RIBEIRO et al., 2014). Além disso, é reportado o uso das suas sementes para o tratamento de tuberculose (STOREY, SALEM, 1997), melhora da imunidade (RODRIGUES, 2006), como depurativo e para alívio de cólicas, de suas raízes como antipirético e antidiarréico (SOUZA et al., 2015). Externamente, usa-se sua tintura para contusões e dores, e seu decocto para aftas e afecções na mucosa oral, dentre outras indicações (BRAGANÇA, 1996). Devido a sua importância etnofarmacológica, compõe a lista de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus (BRASIL, 2011) e a relação de plantas medicinal e fitoterápica do Formulário Fitoterápico Nacional, onde o gel do extrato glicólico dos seus frutos é indicado para o uso externo como cicatrizante e antisséptico (BRASIL, 2011; SILVA et al., 2017). Seu uso em animais também é citado como alternativa para o controle químico de doenças parasitárias gastrointestinais (SILVA et al., 2014).

1.1.3.3 Frutos

Diversas pesquisas com os frutos já demonstraram seu potencial terapêutico. O extrato aquoso bruto administrado por via oral em ratos reduziu significativamente o processo inflamatório mediado por carragenina, além de proporcionar uma discreta ação analgésica (CARVALHO et al., 1996). Em outro estudo com o mesmo derivado vegetal, que visou avaliar sua atividade

biológica, comprovou-se sua ação anti-inflamatória, antitumoral e antinociceptiva, em experimentos com ratos albinos suíços por administração via oral (FREITAS *et al.*, 2012). O extrato etanólico demonstrou atividade anti-inflamatória, por inibição de mediadores da fase inflamatória aguda além de atividade analgésica também quando administrados por via oral em camundongos (LIMA *et al.*, 2013). O extrato bruto e frações dos frutos de *L. ferrea* exibiram atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antinociceptivas periférica *in vivo* e viabilidade celular aumentada *in vitro*, atividades supostamente relacionadas a presença dos compostos ácido gálico e ácido elágico (FALCÃO *et al.*, 2019b). Já a fração polissacarídica demonstrou potente atividade anti-inflamatória ao modular de forma negativa a liberação de mediadores químicos da inflamação, com envolvimento dos mastócitos, no edema induzido. Sugere-se que essa atividade está relacionada não somente aos eventos vasculares, mas também celulares do processo inflamatórios (PEREIRA *et al.*, 2012).

Frutos de Jucá foram submetidos à extração por fluido supercrítico e impregnados a uma matriz polimérica com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória e cicatrizante do curativo bioativo obtido. Com o uso de curativos, objetiva-se melhorar o mecanismo de cicatrização da ferida, criando um ambiente fisiológico adequado. Além disso, pode agir como uma barreira para micro-organismos e facilitar a liberação das substâncias bioativas presentes na matriz para o local da ferida. Nesse estudo, os curativos carregados com o Jucá não se mostraram tóxicos contra macrófagos, porém inibiram a adesão de fibroblastos. Isso pode ser vantajoso no caso de aplicações de curativos, uma vez que evita que novas células de reepitelização adiram ao curativo e sejam removidas sem comprometer o processo de cicatrização. Adicionalmente, foi capaz de atuar no processo inflamatório com regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias e aumento na produção de óxido nítrico. Esse produto inovador agiu de forma eficiente em vários estágios do processo de cicatrização de feridas (DIAS *et al.*, 2013). Já o extrato hidroetanólico apresentou atividade cicatrizante semelhante à solução fisiológica na concentração de 0,9% (solução padrão utilizada na rede hospitalar para realizar curativos). Esta atividade foi avaliada pelo tempo de retração da ferida induzida em ratos Wistar (KOBAYASHI, *et al.*, 2015).

Do extrato etanólico dos frutos secos e frações foram extraídos o ácido elágico e o ácido 2- (2,3,6-tri-hidroxi-4-carboxifenil) elágico. Eles se mostraram potentes inibidores da aldose redutase, enzima dependente do NADPH e responsável em converter glicose plasmática e tecidual em sorbitol. O sorbitol, quando presente em altos níveis, como no diabetes, acumula-se nas células do paciente podendo causar perda da integridade osmótica e danos celulares. Ao inibir a atividade da aldose redutase de maneira não competitiva, esses derivados do Jucá podem evitar danos em órgãos e tecidos, evitando complicações crônicas do diabetes melitus (UEDA *et al.*, 2001). Em estudo posterior a ação hipoglicêmica dessas moléculas foi investigada in vivo e in vitro, e comprovou-se que o sorbitol acumulado em eritrócitos, cristalino e nervo ciático foi reduzido após o tratamento com o ácido elágico, principalmente (UEDA *et al.*, 2004). Apesar da comprovada atividade antidiabética dos frutos, estudo de Carvalho e colaboradores (2010) indicou que seu extrato aquoso, quando utilizados no tratamento crônico da reatividade vascular de ratos diabéticos induzidos por aloxana, não foram capazes de modificar as contrações ou relaxações nos anéis das artérias mesentéricas.

A atividade leishmanicida frente a várias espécies do gênero *Leishmania* do extrato metanólico dos frutos foi avaliada in vitro em promastigotas, mostrando-se bastante ativo contra a forma infectante do protozoário (LC50= 15.04 µg.ml⁻¹). A atividade frente formas amastigotas também foi avaliada mostrando atividade contra as formas intracelulares do parasito e baixa citotoxicidade em macrófagos. No modelo animal em hamsters infectados e com ferida ulcerada causada por *L. amazonensis*, após o uso tópico por 40 dias do gel contendo o extrato metanólico dos frutos, observou-se que os mesmos apresentaram redução do volume da lesão, diminuição do processo inflamatório na região e menor carga parasitária quando comparados aos animais infectados e não tratados. Esse achado se mostra importante no controle de uma doença negligenciada, com pouca opção de tratamento e baixa adesão dos pacientes (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017).

O efeito antiviral de um polissacarídeo sulfatado obtido do extrato aquoso das sementes de Juca foi avaliado frente as vírus causador da herpes simples, (um dos patógenos humanos mais comuns e agente causal de várias doenças), e sobre um vírus entérico causador de poliomielite parálítica,

conhecido como poliovírus. Neste estudo, foi possível demonstrar a inibição da adsorção e replicação dos vírus na fase inicial do ciclo viral e da síntese da proteína viral, comprovando o efeito virucida deste polissacarídeo que concomitante apresentou baixa toxicidade (LOPES *et al.*, 2013).

O extrato proteico das sementes mostrou-se promissor como agente fungicida natural ao ser ativo contra agentes fitopatogênicos diminuindo o crescimento micelial e a esporulação de espécies como *Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii* (BARIANI *et al.*, 2012). Em 2014, Martins e colaboradores demonstraram que a atividade do extrato etanólico dos frutos no diâmetro de crescimento da colônia de fungos *Aspergillus parasiticus* foi dependente do tempo e da concentração. Além disso, agiu de forma eficaz no controle do crescimento e produção de aflotoxinas pela espécie sugerindo que os compostos fitoquímicos possam ser utilizados isoladamente ou em conjunto com outras substâncias em processos para controlar a produção de metabólitos tóxicos de micro-organismos patogênicos. Produtos em escala nanométrica com atividade fungicida também foram desenvolvidos na tentativa de otimizar a ação farmacológica da espécie. Assim sendo, nanopartículas de prata contendo o extrato de sementes de Jucá foram desenvolvidas e após avaliada frente a leveduras do gênero *Candida* sp. mostraram-se efetiva atividade (SOARES *et al.*, 2018).

Marreiro e colaboradores (2014), concluíram que o extrato hidroalcólico de *L. ferrea* possui atividade antibacteriana contra os microrganismos presentes no biofilme dental, além de estabilidade e qualidade satisfatórias. O objetivo do estudo era obter mais informações para uma futura formulação de um enxaguatório bucal natural capaz de promover o controle químico da formação de biofilme e aplicável em odontologia. Produtos naturais com atividade antimicrobiana podem ser importantes agentes terapêuticos para prevenir e tratar cárie, doença periodontal e candidíase oral (DROZINO *et al.*, 2011).

A capacidade de inibição da proliferação de células da linhagem de câncer colorretal humano HT-29 foi estudada usando o extrato dos etanólico dos frutos de Jucá. Os resultados revelaram alto potencial antiproliferativo e indução da morte celular ao afetar a via intrínseca da apoptose, com menor expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e ativação de enzimas efetoras como caspase-3

em relação aos controles. Além disso, *L. ferrea* revelou antioxidantes, peroxidação lipídica e efeitos quimioprotetores em células saudáveis (GUERRA *et al.*, 2017). No estudo de Inada e colaboradores (2003), o ácido 2- (2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) elágico isolado dos frutos foi capaz de atuar na a carcinogênese em dois estágios dos papilomas da pele de camundongo. Esses são importantes e promissores achados para terapias anticâncer.

O uso da espécie no setor de cosméticos também merece atenção. Os extratos etanólicos de frutos e cascas de *L. ferrea* mostraram eficiente ação antirrugas e despigmentantes ao inibir as enzimas hialuronidase, a metaloproteinase-2 e o processo de melanogênese, principalmente devido à presença de agentes ativos como o kaempferol, ácido elágico, catequina e conteúdo de epicatequina podendo ser um agente promissor antienvhecimento (PEDROSA *et al.*, 2016).

1.1.3.4 Cascas

O extrato hidroetanólico cascas do caule mostrou seu efeito anti-ulcerativo ao promover diminuição do tamanho da ferida, redução da secreção gástrica e aumento das fibras de colágeno em modelo de úlcera crônica induzida por estresse em ratos (BACCHI *et al.*, 1994). Estudo posterior comprovou a atividade anti-ulcerativa em modelo induzido por ácido acético, associando esse efeito a grande quantidade de taninos e sua conhecida atividade anti-inflamatória e cicatrizante. Além disso, foi observado que quando administrado por via oral, este derivado vegetal do Jucá, não causou sinais de toxicidade aguda (TA) durante 30 dias de tratamento (BACCHI *et al.*, 1995).

O uso tópico de pomada contendo extrato das cascas de Jucá foi estudado no tratamento de feridas cutâneas em caprinos. Observou-se a ausência de exsudato inflamatório, edema e hiperemia nos animais tratados com a pomada sugerindo a sua atividade anti-inflamatória. Notou-se também que com o uso do gel era formada uma película protetora na ferida que agiu impedindo a penetração e multiplicação de micro-organismo do meio externo. A formação dessa película foi atribuída a riqueza de taninos da espécie vegetal, que atuou revestindo a lesão e favorecendo a reparação do tecido lesionado (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em outro estudo de cicatrização, Pereira e colaboradores (2016) concluíram que, o extrato rico em polissacarídeo das

cascas de Jucá, quando usado topicamente em úlcera excisional em ratos wistar, acelerava a cicatrização de feridas pelo controle da fase inflamatória. Observou-se redução de sinais clínicos característicos do processo tais como edema, hiperemia e formação de exsudato, além de atenuar a hipernocicepção através da modulação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , NO, TGF- β), proliferação de fibroblastos e redução do infiltrado celular e permeabilidade vascular. Esse é um importante achado, visto que o uso de cascas de *L. ferrea* na medicina popular como cicatrizante é bastante difundido. A casca de *L. ferrea* também demonstrou atividade anti-inflamatória in vitro em um modelo de migração de leucócitos e atividade analgésica no teste de contorção abdominal induzido por ácido acético (ARAUJO et al., 2017).

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólico, aquoso e acetônico das cascas do caule sobre leveduras do gênero *Candida* também foi avaliada comprovando o potencial fungicida da espécie (FERREIRA et al., 2013). O extrato metanólico das cascas foi usado para inibir o crescimento bacteriano sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter gergoviae* mostrando-se bastante eficiente, principalmente frente a primeira (PEREIRA et al., 2006).

A atividade hipoglicêmica do extrato aquoso da casca do caule de *L. ferrea* foi investigada em modelo de diabetes induzida por estreptozotocina em ratos wistar. A administração do extrato por via oral foi causou redução nos níveis de glicose em jejum e aumento na tolerância a glicose dos animais tratados. Foi sugerido um efeito extra pancreático para justificar a hipoglicemia, visto que os níveis de insulina permaneceram inalterados. Somado a isso, notou-se que a melhora no metabolismo da glicose nos animais diabéticos tratados poderia estar relacionada ao aumento do glicogênio hepático e à ativação de proteína quinase B no fígado e no músculo. Esse efeito pode ser atribuído a presença de catequinas no extrato. Foi notado também supressão na ativação da AMP- proteína quinase ativada no músculo, o que contribuiu para uma restauração dos níveis metabólicos dos animais diabéticos que receberam o extrato (VASCONCELOS et al., 2011).

A indução de apoptose por *L. ferrea* foi descrita por Nozaki e colaboradores (2007) após o isolamento de uma chalcona do extrato acetônico

do caule na linhagem de leucemia mielóide aguda (HL-60). Além disso, ela mostrou potente atividade inibitória contra a topoisomerase II humana.

A atividade antioxidante in vitro e hepatoprotetora em dano causado em ratos por CCl₄ dos extratos seco por pulverização das cascas e frutos de Jucá foi avaliado. Os extratos parecem proteger o fígado contra danos oxidativos induzidos e podem ser considerados um bom antioxidante in vitro e in vivo pelos testes realizados neste estudo. Esses efeitos podem estar correlacionados com seus efeitos antioxidantes e eliminadores de radicais livres. Esses ensaios indicam que esse extrato vegetal é uma fonte significativa de antioxidantes naturais, o que pode ajudar a impedir o progresso do estresse oxidativo (BARROS et al., 2014).

1.1.3.5 Folhas

O extrato etanólico aquoso de suas folhas reduziu os níveis glicêmicos enquanto diminuiu a progressão do estresse oxidativo quando administrado por via oral em ratos Sprague-Dawley (HASSAN et al., 2015). Em outro estudo, este derivado vegetal de *L. ferrea* foi testado quanto a atividades moluscicidas contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário da esquistossomose; sua atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, mosquito transmissor de importantes doenças como Dengue, Chikungunya e Zica vírus; além da toxicidade frente ao crustáceo, *Artemia salina*. O extrato testado mostrou baixa atividade contra *Aedes aegypti* numa concentração de 500ppm (10% de mortalidade em larvas 4º instar), toxicidade para *Artemia salina* (68% de mortalidade na presença do extrato a 1000ppm) e a 100ppm não mostrou atividade contra caracóis e ovos de *Biomphalaria glabrata* (LUNA et al., 2005).

A atividade anti-inflamatória foi estudada em um modelo experimental de inflamação intra-articular induzida por zymosan, realizado em ratos Wistar tratados por gavagem com o extrato aquoso das folhas nas doses de 100, 200 e 300 mg / kg. Este modelo experimental animal é caracterizado por inflamação sinovial, destruição de cartilagem, erosão óssea e um influxo significativo de leucócitos, sendo considerado uma representação adequada dos processos patogênicos da artrite reumatóide humana. Neste caso, o tratamento com o extrato foi capaz de causar mudanças substanciais no quadro patológico como diminuição do influxo de leucócitos, verificado tanto na contagem no líquido

quanto na observação histopatológica da membrana sinovial. Somado a isso, houve redução na atividade da mieloperidase e no teor do marcador plasmático de estresse oxidativo, o malondialdeído (geralmente elevado em pacientes com artrite reumatóide), quando comparado ao grupo controle. O extrato também exibiu um papel protetor significativo contra a depleção da glutathione e reduziu os níveis de marcadores pró-inflamatórios como IL-1 β e TNF- α no tecido articular. Em conjunto, esses resultados sugerem que o extrato das folhas evitou o estresse oxidativo nas articulações dos ratos o que corrobora com o potencial antioxidante da *L. ferrea* relatado no estudo de Silva et al., 2011. O estudo demonstrou que a administração oral do extrato teve um efeito benéfico na gravidade da inflamação artrítica, sendo um agente promissor para o tratamento da artrite reumatóide, uma doença autoimune com fisiopatologia complexa e alternativas terapêuticas limitadas (FALCÃO et al., 2019a).

Um estudo farmacológico avaliou o extrato alcóolico das folhas de Jucá e seu potencial antifúngico para contribuir como estratégia de controle e gerenciamento na transmissão de fitopatógenos. Foi verificado o efeito dos tratamentos de biotecnológicos na limitação da transmissibilidade de *Colletotrichum sp.*, um fungo fitopatogênico hospedeiro de sementes e que, geralmente, afeta a capacidade de germinação de espécies vegetais tais como a *Sideroxylon obtusifolium*. O tratamento com o Jucá proporcionou maior proteção às sementes e plântulas de *S. obtusifolium* frente ao fungo *Colletotrichum sp.* (MELO et al., 2016). Outro estudo semelhante frente ao mesmo patógeno certificou que houve maior proteção às sementes e mudas de *S. obtusifolium* na presença do extrato aquoso das folhas de *L. ferrea*. Esse achado fortalece a hipótese de que derivados do Jucá são recursos biotecnológicos viável e sustentável contra patógenos, e promissores para o desenvolvimento de novas substâncias antifúngicas (MELO et al., 2017).

Apesar da grande variedade de ações terapêuticas atribuídas e estudadas de *L. ferrea*, seus derivados vegetais e compostos isolados pouco se conhece sobre os mecanismos de ação e vias de atuação dos seus bioativos, sendo necessários mais estudos e investigações. O quadro abaixo (Quadro 1) mostra um levantamento de importantes estudos com a espécie.

Quadro 1. Descrição de estudos que utilizaram *L. ferrea* de acordo com cada porção da planta e atividade biológica

Parte da planta	Derivado vegetal	Atividade biológica	Modelo experimental	Referência
Casca do caule	Extrato hidroetanólico	Anti-ulcerativo	Úlcera crônica induzida por estresse em ratos	Bacchi <i>et al.</i> , 1994.
	Extrato hidroetanólico	Anti-ulcerativo e toxicidade aguda	Úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos	Bacchi <i>et al.</i> , 1995.
	Extrato aquoso	Efeitos cardiovasculares	Avaliação de parâmetros cardíacos em ratos não anestesiados	Menezes <i>et al.</i> , 2007
	Extrato aquoso	Hipoglicêmica	Diabetes induzida por estreptozotocina em ratos	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2011
	Chalcona isolada do extrato acetônico	Antitumoral	Avaliação <i>in vitro</i> frente a linhagem de leucemia mielóide aguda humana (HL-60)	Nozaki <i>et al.</i> , 2007
	Extratos aquoso, etanólico e acetônico	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> : microdiluição e determinação da concentração fungicida mínima	Ferreira <i>et al.</i> , 2013
Casca	Casca seca e moída	Cicatrizante e anti-inflamatória	Avaliação da cicatrização de feridas em caprinos	Oliveira <i>et al.</i> , 2010
	Extratos aquoso e aceto-aquoso	Antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória	Avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> , peritonite induzida por carragenina, avaliação da atividade antinociceptiva por contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da placa	Araujo <i>et al.</i> , 2014

			quente em ratos	
	Extrato rico em polissacarídeos	Cicatrizante	Ferida cutânea excisional em ratos wistar tratadas topicamente	Pereira <i>et al.</i> , 2016
	Extrato metanólico	Antimicrobiana	Método bioautográfico e determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)	
Casca e frutos	Extrato seco por pulverização	Antioxidante e hepatoprotetora	Ensaio antioxidantes in vitro e atividade hepatoprotetora contra CCl ₄ em ratos	Barros <i>et al.</i> , 2014
	Extrato etanólico	Antirrugas e clareadora	Atividade enzimática inibitória contra elastase, hialuronidase e collagenase, viabilidade celular em fibroblastos primários e efeitos anti-metilogênicos	Pedrosa <i>et al.</i> , 2016
Folhas	Extrato hidroetanólico	Citotóxica frente a <i>Artemia salina</i>	Ensaio in vitro	Luna <i>et al.</i> , 2005
	Extrato aquoso	Anti-ártrica	Modelo de artrite reumatoide induzido por Zymosam in vivo	Falcão <i>et al.</i> , 2019a
Frutos	Extrato etanólico	Antifúngica e antimicotoxigênica	Método de diluição em ágar contra <i>Aspergillus parasiticus</i>	Martins <i>et al.</i> , 2014
	Extrato etanólico	Antitumoral e quimioprotetora	Avaliação in vitro da viabilidade e desenvolvimento celular frente a células da linhagem de câncer	Guerra <i>et al.</i> , 2007.

			colorretal humano HT-29	
	Extrato etanólico	Anti-inflamatório e analgésico	Peritonite, edema, permeabilidade vascular, teste de contorção e teste da formalina em camundongos	Lima <i>et al.</i> , 2013.
	Extrato e frações	Antidiabética	Inibição da enzima aldose redutase	Ueda <i>et al.</i> , 2001.
Frutos	Isolados do extrato	Hipoglicemiante	Inibição da enzima aldose redutase in vivo e in vitro	Ueda <i>et al.</i> , 2004.
	Extrato metanólico	Antimicrobiana	Atividade contra microorganismos in vitro em estado plantônico ou biofilme.	Sampaio <i>et al.</i> , 2009.
	Extrato aquoso	Anti-inflamatória e analgésica	Atividade antiinflamatória em edema de pata induzido por carragenina, avaliação da atividade antinociceptiva por Contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da placa quente em ratos	Carvalho <i>et al.</i> ; 1996
	Extrato metanólico	Atividade leishmanicida	Atividade in vitro contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. Atividade cicatrizante em lesões causadas por <i>L. amazonensis</i> em hamsters.	Comandolli-Wyrepkowski <i>et al.</i> , 2017
	Compostos isolados	Antitumoral	teste de ativação do antígeno precoce do vírus Epstein-Barr (EBV-EA) in vitro	Nakamura <i>et al.</i> , 2002a
	Compostos isolados	Antitumoral	Avaliação de in vivo de dois estágios da	Nakamura <i>et al.</i> , 2002b

			carcinogênese	
Frutos	Extrato bruto e frações	anti-inflamatórias e antinociceptivas	Modelo de peritonite induzida por carragenina, modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético e teste de placa quente <i>in vivo</i> . Viabilidade celular <i>in vitro</i> frente a fibroblastos embrionários de camundongo (células 3T3).	Falcão <i>et al.</i> , 2019b
	Extrato proteico	Antifúngica	Avaliação do crescimento micelial e esporulação de fungos fitopatogênicos filamentosos	Bariani <i>et al.</i> , 2012
	Extrato hidroalcoólico	Atividade antibacteriana	Determinação da concentração inibitória mínima	Marreiro <i>et al.</i> , 2014
	frações polissacarídicas	Atividade anti-inflamatória	Modelos de inflamação aguda em ratos wistar	Pereira <i>et al.</i> , 2012
Sementes	Extrato aquoso	Atividades celulásica, amilásica, anticoagulante e larvícida	Avaliação enzimática <i>in vitro</i> e larvícida <i>in vitro</i>	Cavalheiro <i>et al.</i> , 2009
	Polissacarídeo obtido do extrato aquoso	Antiviral	Ensaio de redução de placa, avaliação da síntese da proteína viral e ácido nucleico por imunofluorescência e PCR	Lopes <i>et al.</i> , 2013
	Nanopartículas de	Antifúngica	Ensaio <i>in vitro</i> : Minimum inhibitory concentration	Soares <i>et al.</i> , 2018

	prata do extrato		(MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC)	
	Extrato acetônico e porção lipídica	Atividade antinociceptiva	Constrição abdominal induzida por ácido acético, dor induzida por formalina e teste de placa quente em camundongos	Sawada <i>et al.</i> , 2014

1.1.3.6 Fitoquímica

A família Fabacea é ampla e possui gêneros conhecidos por sua variedade de compostos bioativos. Essa riqueza de produtos coloca-a em destaque e leva a pesquisas com a finalidade de isolar produtos de atividade conhecida e identificação de novas moléculas de interesse fitofarmacêutico (KUMAR et al., 2015). Investigações químicas anteriores em plantas do gênero *Libidibia* revelaram a presença de flavonóides, triterpenóides, esteróides, lignanas, fenilpropanóides, alcalóides e também diterpenóides (JING et al., 2019, DAS et al., 2010).

A avaliação fitoquímica do extrato hidroetanólico da casca, caule e folhas demonstrou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (GONZALEZ et al., 2004; ARAÚJO et al., 2014). Quanto a composição dos seus derivados, estudos mostram que suas cascas são ricas em taninos e flavonóides (ARAÚJO et al., 2008), polifenóis (ARAÚJO et al., 2014) além de derivados antracênicos, traços de saponinas, glicosídeos cardiotônicos e alcalóides (DA COSTA et al., 2015) e as folhas em saponinas, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (GONZALEZ et al., 2004; ZANIN et al., 2012).

A análise das folhas de várias espécies vegetais consumidas na forma de chá mostrou que a *L. ferrea* apresenta quantidade de compostos fenólicos totais superior frente as demais, com destaque para o ácido gálico. A riqueza desses compostos relaciona-se a sua alta capacidade antioxidante, colocando a infusão das folhas de Jucá como um importante nutracêutico (PORTS et al., 2013).

A avaliação das propriedades fitoquímicas dos extratos metanólico de frutos, folhas e galhos de *L. ferrea* mostrou grande teor de compostos fenólicos especialmente nos frutos, flavonóides, terpenóides e saponinas (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017). Estudo da prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico produzido a partir dos frutos, apresentou saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis, taninos, sesquiterpenos, lactonas e antraquinonas (KOBAYASHI, et al., 2015). Os frutos de *L. ferrea* são conhecidos por um alto teor de polifenóis (FERREIRA et al., 2016). O seu extrato hidroetanólico apresentou um teor de fenólicos totais

médio de 460 mg/g (expresso em equivalentes de ácido gálico) (SILVA et. al., 2011). Dentre as substâncias previamente identificadas no extrato de benzênico dos frutos estão o sitosterol, ácidos palmítico e octacosanóico, e o extrato alcoólico também forneceu ácido gálico, além de galato de etila e ácido elágico (UEDA et al., 2001; NAKAMURA et al., 2002; GUERRA, et. al., 2017, FALCÃO et al, 2019). Em outro estudo, foi identificado nos frutos a presença os dois importantes compostos, ácido gálico e galato de metila, foram apontados como capazes de promover a atividade antitumoral (NAKAMURA et al., 2002). Pauferrol, um trimero de chalconas isolado de um extrato de acetona dos caules é um importante marcador fitoquímico da espécie (NOZAKI et al., 2007).

Polissacarídeos foram relatados nas sementes de *L. ferrea* (SOUZA et al., 2010; PEREIRA et al., 2012; LOPES et al., 2013; GALLÃO et al., 2013). Em muitas leguminosas, as sementes são compostas principalmente de lipídios e carboidratos. A análise química e físico-química dos polissacarídeos extraídos das sementes de *L. ferrea*, indicou riqueza em galactomanano, o principal carboidrato do endosperma como componentes de armazenamento da parede celular e fonte de energia importante do processo de germinação. O estudo de Gallão et al. (2013) comprovou a presença de galactomananos nas paredes celulares das células do endosperma das sementes de *L. ferrea* numa relação manose/galactose de 2.65:1.00. A solução de galactomanano *L. ferrea* (1%) apresentou um comportamento pseudoplástico, especialmente, em baixas taxas de cisalhamento. Devido a relação manose/galactose e ao comportamento reológico os galactomananos da *L. ferrea* pode ser um polissacarídeo útil para indústria alimentícia.

A porção lipídica proveniente do extrato acetônico das sementes de *L. ferrea*, mostrou como principais componentes o ácido cáprico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoléico e ácido linolênico, que apresentou um efeito antinociceptivo dose-dependente indicando propriedades anti-inflamatórias periféricas e analgesia central em experimentos com modelos animais. Essa atividade antinociceptiva está possivelmente relacionada a sua capacidade de inibir os opióides, os receptores colinérgicos e a via da ciclooxygenase-2 (SAWADA et al, 2014). O extrato de fluido supercrítico dos frutos mostrou-se rico em ácidos

graxos insaturados (52%) e saturados (26%), bem como em terpenóides (13%), como lupenona e gama-sitosterol (DIAS et al., 2013).

Em estudos fitoquímicos para avaliar o teor e biodisponibilidade de ferro, manganês e zinco em extratos da casca do fruto e das folhas por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS), evidenciou-se que os níveis de ferro e manganês foram maiores nas folhas da espécie quando comparados com os valores obtidos na casca do fruto. Dentre os elementos analisados, o ferro apresentou melhor biodisponibilidade na casca do fruto e nas folhas. Manganês e zinco estavam mais biodisponíveis nas folhas, esses resultados permitiram os autores a sugerirem que o Jucá pode ser uma fonte de alternativa complementar de ferro, manganês e zinco na dieta alimentar (SILVA et al., 2010)

O extratos hidroetanólicos das cascas e sementes mostraram grande quantidade de ácido elágico, sendo que nas sementes a quantidade era três vezes maior (PICLER et al., 2019). Em estudo com os extratos aquoso e aceto aquoso das cascas de *L.ferrea*, Araujo e colaboradores (2014) comprovaram a atividade analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana contra bactérias gram positivas e negativas da espécie. Atribuíram o efeito a grande quantidade de catequinas e ácido gálico presentes nos extratos avaliados. Outras pesquisas também evidenciaram a atividade antibacteriana contra *Helicobacter pylori* (DIAS-GOMEZ et al., 2013) e contra bactérias patogênicas (BORGES et al., 2013) do ácido gálico; inclusive em isolados do extrato metanólico dos frutos de *Caesalpinia coriaria* (Jacq) Willd, outra espécie do gênero, mostrando o potencial biológico dessas moléculas (OLMEDO-JUÁREZ et al., 2019).

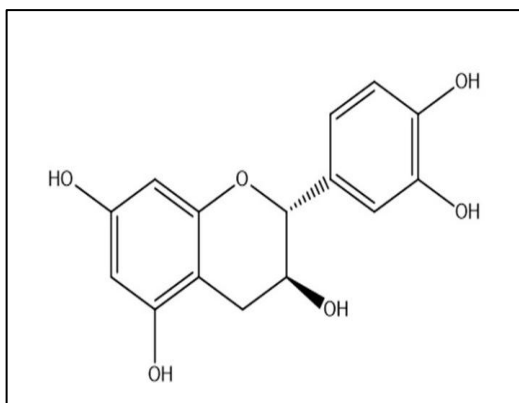
Teste realizado com material vegetal do caule, para mensurar o índice de espuma e o teste de hemólise o qual foi negativo até a concentração de 5% do extrato, somados ao perfil cromatográfico do extrato etanólico bruto e suas frações, indicou ausência de saponinas no material analisado. O teste de determinação de taninos, através da determinação de polifenóis totais e polifenóis não absorventes demonstraram baixo teor de taninos totais (0,0208%) (FRASSON et al., 2003).

O isolamento de compostos ativos do extrato etanólico de cascas e frutos apontou a presença de ácido gálico e epicatequinas como compostos bioativos. A grande quantidade desses polifenóis foi atribuída a alta atividade

antioxidante dos extratos (BARROS et al., 2014). No estudo de Wyrepkowski et al. (2014), vinte compostos foram identificados no extrato etanólico das cascas do caule por espectrometria de massas, sendo principalmente taninos hidrolisáveis. Pedrosa et al.(2016) evidenciou a presença de ácidos fenólicos e flavonóides como as substâncias mais recorrentes no extrato etanólico de cascas e frutos e em proporções menores ácidos orgânicos, secoroides e fito-hormônios. Na casca o componente principal foi o kaempferol, seguido pelos ácidos gálico e quinico, respectivamente, enquanto para o as folhas o ácido elágico, a catequina e a epicatequina foram os três principais compostos identificados

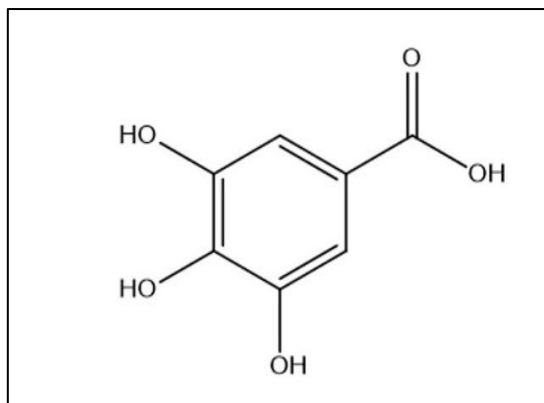
A identificação química dos constituintes da casca de Jucá corroborou com trabalhos anteriores, revelando que também neste derivado os compostos principais são taninos condensados – catequinas e taninos hidrolisáveis – ácidos gálico e elágico (figuras 3 e 4). À grande quantidade de catequinas do extrato atribui-se o efeito hipoglicemiante em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina observado neste estudo (VASCONCELOS et al., 2011).

Figura 3. Estrutura química do ácido elágico



Fonte: Próprio autor

Figura 4. Estrutura química do ácido gálico



Fonte: Próprio autor

Estudos etnofarmacológicos mostram que as espécies de origem vegetal são muito importantes e usadas para o tratamento de diversas patologias. O Jucá mostra-se como uma fonte promissora de compostos bioativos de interesse farmacológicos com atividades diversas, dentre as quais a antidiabética. Além disso, mostrou-se potencialmente seguro para uso *in vivo*.

1.1.3.7 Toxicidade de *L. ferrea*

A toxicidade do extrato aquoso de frutos secos de *L. ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozóides de ratos Wistar foi avaliada. Os animais receberam o extrato por 5 dias (via intragástrica) e foram eutanasiados 14 dias após o término do tratamento. Neste período não houve mortes e não foi detectada a ocorrência de piloereção, alteração da atividade locomotora e não foi evidenciada alteração no peso da hipófise, testículos, epidídimo e próstata. Além disso, a produção e a morfologia de gametas não foi afetada, considerando que as proporções de gametas normais e anormais foram comparativamente semelhantes nos grupos tratados e controle (LUCINDA et al., 2010).

Peters e colaboradores (2008) avaliou a toxicidade do extrato aquoso dos frutos de *L. ferrea* quando administrada por via oral em ratas no 5º a 7º dia de gestação. Neste período foi avaliado a implantação do blastocisto, outros parâmetros da toxicidade materna, tais como sangramento vaginal, diarreia, piloereção, além da avaliação da embriotoxicidade: número de corpos lúteos, fetos vivos, reabsorções, implantes, perdas pré e pós-implante. Nenhum desses parâmetros foi significativamente alterado quando comparado as ratas tratadas e não tratadas, mostrando que na dose de 300mg/kg o extrato de Jucá não se mostrou tóxico para a mãe e também não interferiu na implantação do blastocisto. Outro estudo com ratas prenhas entretanto, demonstrou que os extratos hidroetanólico das cascas e sementes de Jucá não se mostraram seguros para uso durante o período gestacional. As ratas prenhes que receberam os extratos apresentaram múltiplas alterações nos parâmetros bioquímicos do líquido amniótico interferindo moderadamente na capacidade reprodutiva das mesmas (PICLER et al., 2019).

Em estudo de toxicidade genética, foi avaliado o potencial citotóxico e clastogênico do extrato aquoso bruto dos frutos secos em células da medula óssea de ratos Wistar utilizando o teste de aberração cromossômica e micronúcleo. Os animais foram tratados com o extrato de Jucá por via oral em três concentrações 500; 1000 e 1500 mg/kg, o grupo controle negativo recebeu água destilada e o grupo controle positivo recebeu ciclofosfamida 30 mg/kg. Os dados indicaram que o extrato bruto de *L. ferrea* não tem efeito citotóxico nas

doses testadas. Quando tratados camundongos infectados com *Listeria* e portadores de tumor com doses de 500 e 1000 mg / kg do extrato, ocorreu a estimulação significativa de mielopoiese. Esse estudo foi o primeiro a avaliar o potencial clastogênico, os resultados evidenciam que o extrato não induziu um número significativo de células com micronúcleos ou aberrações cromossômicas quando administradas em doses de 500, 1000 e 1500mg/kg, permitindo os autores concluir que as condições científicas empregadas no estudo o extrato de *L. ferrea* não tem efeito clastogênico em células da medula óssea de ratos Wistar (DE SOUZA et al., 2006).

A mutagenicidade pode levar a graves alterações genéticas e câncer em doses muito inferiores às necessárias para exibir TA. A ausência de um efeito mutagênico detectável do extrato etanólico da casca do caule, quando realizado os testes de Salmonella e Ames é um ponto positivo na determinação do uso seguro dessa espécie. Esses modelos são baseados em uma variedade de cepas bacterianas, que juntas são sensíveis a agentes danosos ao DNA nos fornecendo informações importantes sobre o potencial carcinogênico e/ou mutagênico de constituintes a longo e curto prazo (WYREPKOWSKI et al., 2014).

1.1.4 *Danio rerio*

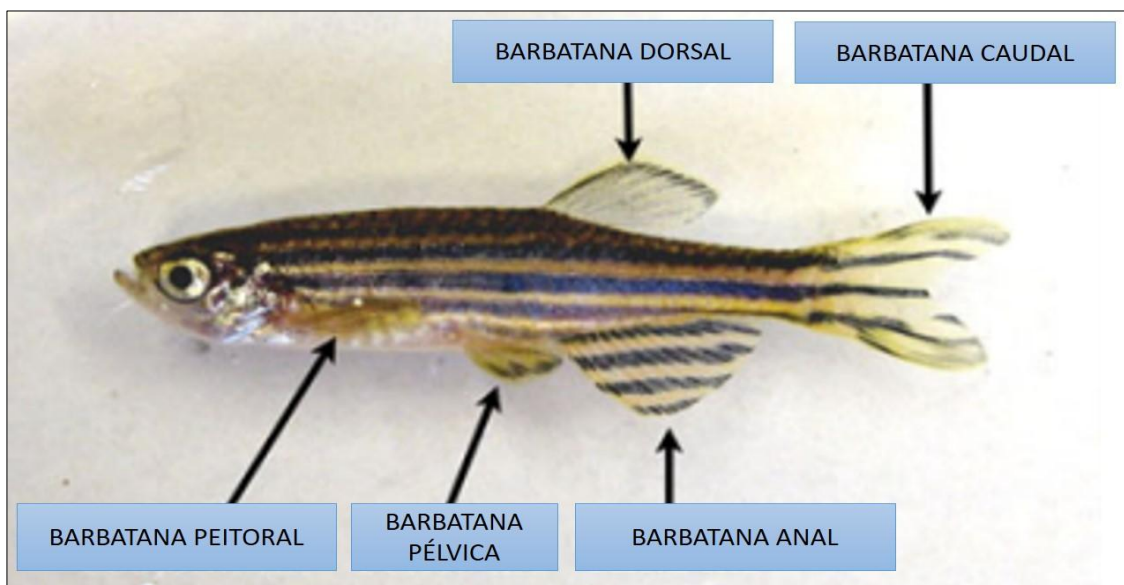
Os peixes atualmente tem sido amplamente utilizados como modelo animal em pesquisas científicas, principalmente nas que testam toxicidade e atividades biológicas de substâncias. Neste contexto, a utilização de *D. rerio* vem substituindo o uso de mamíferos como ratos, camundongos e coelhos. Utilizados pela primeira vez para pesquisas nos anos 50, seu uso traz diversas vantagens: baixo custo, semelhança genética com genoma humano, desenvolvimento embrionário rápido, alta taxa de fecundação, além de possuir embriões grandes e transparentes (SIEBEL et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Popularmente conhecido como paulistinha e cientificamente chamado de *Danio rerio*, o zebrafish é um peixe nativo do sul asiático. De água doce e pequeno porte é muito utilizado no aquarismo como peixe ornamental. Quando adulto pode medir de 3 a 4 centímetros e é extremamente adaptável,

podendo suportar variações de pH (5,9 – 8,5) e de temperatura (16 – 38°C) (DAMMSKI et al., 2011; SIEBEL et al., 2015).

Uma forma fácil para localizar as estruturas anatômicas do *D. rerio*, pode ser utilizando as barbatanas, ou nadadeiras como referência como descrito abaixo (figura 5).

Figura 5. Localização anatômica referente as barbatanas de *D. rerio*



Fonte: Adaptado de Gupta e Mullins (2010)

1.1.4.1 Brânquias

Localizadas na região opercular, as brânquias no *D. rerio* se dividem em 4 arcos branquiais, com duas fileiras de filamentos cada, contendo as lamelas secundárias de ambos os lados (SOUZA, 2015). A estrutura padrão de um arco branquial de um teleósteo apresenta células epiteliais, melanócitos, linfócitos, macrófagos, granulócitos e eosinófilos no epitélio estratificado que recobre o filamento branquial, além de possuir células de cloreto e da mucosa (FLORES-LOPEZ; THOMAZ, 2011). A troca gasosa é realizada por capilares sanguíneos localizados nas lamelas que são resvestidas de epitélio pavimentoso simples e protegido por pilares, onde localizam os capilares responsáveis pela alta vascularização das lamelas (VIRGENS et al., 2015).

Dentre as principais funções das brânquias, estão as vitais para a sobrevivências dos peixes, como por exemplo: respiração, osmorregulação e

excreção. Atua como primeiro órgão (órgão alvo) ao detectar poluente, agentes tóxicos ou qualquer mudança físico-química no ambiente aquático (FLORES-LOPEZ; THOMAZ, 2011).

1.1.4.2 Fígado

O fígado de *D. rerio* é semelhante com o de outros mamíferos, uma glândula digestiva é localizado ventralmente ao esôfago e bulbo intestinal, possui fluxo de entrada sanguínea por veia porta e artéria hepática, constituído basicamente por hepatócitos e cordões hepáticos, este ultimo responsável por promover sustentação celular (SANTOS, 2016; CORRÊA, 2016). Em casos de hepatócitos normais, estes possuem seus núcleos localizados de forma centralizada, sendo então, o deslocamento deste para a periferia considerado uma anormalidade, o que chamamos de vacuolização (CORRÊA, 2016).

O fígado é responsável por algumas funções essenciais no organismo do *D. rerio*, alterações neste órgão podem indicar danos relacionados com o metabolismo, biotransformação e excreção de determinadas substâncias (HONORATO et al., 2014; NOVAES et al., 2018). Uma vez instalada lesões hepáticas, a homeostase do organismo como um todo pode ser afetada, interferindo em algumas funções básicas deste órgão, como por exemplo a síntese de moléculas (ALKIMIN, 2016). A principal diferença do fígado dos peixes teleósteos para o fígado dos mamíferos é a ausência do lóbulo hepático, bem como as estruturas que o compões (SCHNEDER, 2015).

1.1.4.3 Rim

Responsáveis pela filtração sanguínea, homeostase e eliminação farmacológica em seres humanos, seu mal funcionamento pode ser prejudicial para o equilíbrio do organismo (CLARCK et. al., 2011; BORGES; EHRHARDT, 2018). No zebrafish, os rins possuem função semelhante aos seres humanos, são divididos em porções cranial e caudal, e responsáveis pela hematopoiese, filtração sanguínea (DAMMSKI et. al., 2011). A urina nos peixes teleósteos, como o zebrafish, é diluída e sua eliminação tem como principal função eliminar o líquido captado pelas brânquias (SANTOS, 2016)

Os rins tem grande importância para o metabolismo de substâncias bioativas no organismo humano, uma vez que desempenham papel fundamental na sua eliminação, bem como de seus metabólitos, podendo influenciar diretamente na meia vida dessas substâncias no organismo. Nos peixes, ele desempenha potencial papel na homeostase. A urina é o principal fluido biológico responsável pela excreção da grande maioria dos fármacos, este processo de eliminação pode se dar por três vias: filtração glomerular, secreção tubular ativa e reabsorção tubular passiva (CLARK et al., 2013; GOLAN et al., 2014).

1.1.4.4 Intestino

O sistema digestivo do zebrafish, é diferente dos mamíferos principalmente pela ausência de estômago e ceco. É basicamente composto por boca, faringe, esôfago, intestino e ânus. O intestino, localizado na cavidade abdominal pode ser dividido em três segmentos:

- Bulbo intestinal (segmento anterior), no peixe-zebra desempenha uma função parecida com a do estômago, armazena alimentos, possui uma camada lipídica com células: califormes, inflamatórias e enterócitos, responsáveis por absorver proteínas e lipídeos;
- Segmentos médio e posterior, considerados análogo ao intestino grosso nos mamíferos (DAMMSKI et. al., 2011; ARIAS-JAYO et. al., 2018; BORGES, 2019)

1.1.4.5 Reprodução em *D.rerio*

Algumas vantagens de se utilizar o zebrafish como modelo experimental, estão relacionadas com a reprodução: o amadurecimento reprodutivo precoce (entre 3-6 meses); a alta taxa de fecundação, sendo capaz de desovar de 100 a 500 ovos por cópula (diariamente); além de possuir embriões grandes, transparentes e de fácil visualização (figura 8). Dentro deste contexto, criar condições ambientais o mais parecido possível com o habitat natural desta espécie pode ser um fator primordial para obter sucesso com a reprodução em laboratório, entretanto, é importante frisar que fatores como: qualidade da

água, temperatura, nutrição, estímulo luminoso e sonoro e aquário ideal (aquário de reprodução), podem influenciar de forma prejudicial no processo reprodutivo (SIEBEL et. al., 2015).

O comportamento do zebrafish, tem total influência no processo reprodutivo destes, quando se propõe controlar esta ação, faz-se necessário alguns ajustes para se obter sucesso. O aquário utilizado para este fim (aquário de reprodução) (figura 7), tem estrutura pensada para estimular a atração dos casais de zebrafish (divisória transparente), uma vez que se faz necessário a presença destes por no mínimo 12 horas na mesma água para que haja liberação de feromônios que estimulem as fêmeas na ovulação e os machos no acasalamento (DAMMSKI et al., 2011; MACHADO, 2018). Logo, a estrutura deste tipo de aquário foram pensadas para manter o estímulo olfativo preservado, sendo assim, estes possuem uma divisória no centro para manter a separação de fêmea e machos, de modo que os mesmos se mantenham na mesma água para que a liberação destes feromônios possam estimular o comportamento de ambos, além de possui um fundo falso, com janelas, para que os ovos sejam capturados e os peixes não realizem o canibalismo dos mesmos.

Figura 6. Aquário de reprodução em momento em ocorria a postura.



Fonte: Próprio autor

Figura 7. Ovos coletados, com aproximadamente 0,75 hpf.



Fonte: Próprio autor

Após o acasalamento, onde o macho (figura 9) seduz a fêmea (figura 10) realizando estímulo hormonal, visual e comportamental, de forma a induzir o local de desova, nadam juntos, simultaneamente em disposição corporal

pararela, até que fiquem parados para realização da postura (fertilização externa do ovo) (DAMMSKI et al., 2011; COUTINHO, 2018).

Basicamente os estágios da embriogênese do zebrafish descritos na literatura são sete (incluindo a eclosão): zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, faríngula; e após a eclosão: larva, dentro deste contexto, os batimentos cardíacos normais nos embriões tem como valores: 120 a 180 batimentos por minutos (KIMMEL et al., 1995; SIEBEL et al., 2015; COUTINHO, 2018; THIAGARAJAN et al., 2019).

Figura 8. Macho de *D. rerio*.



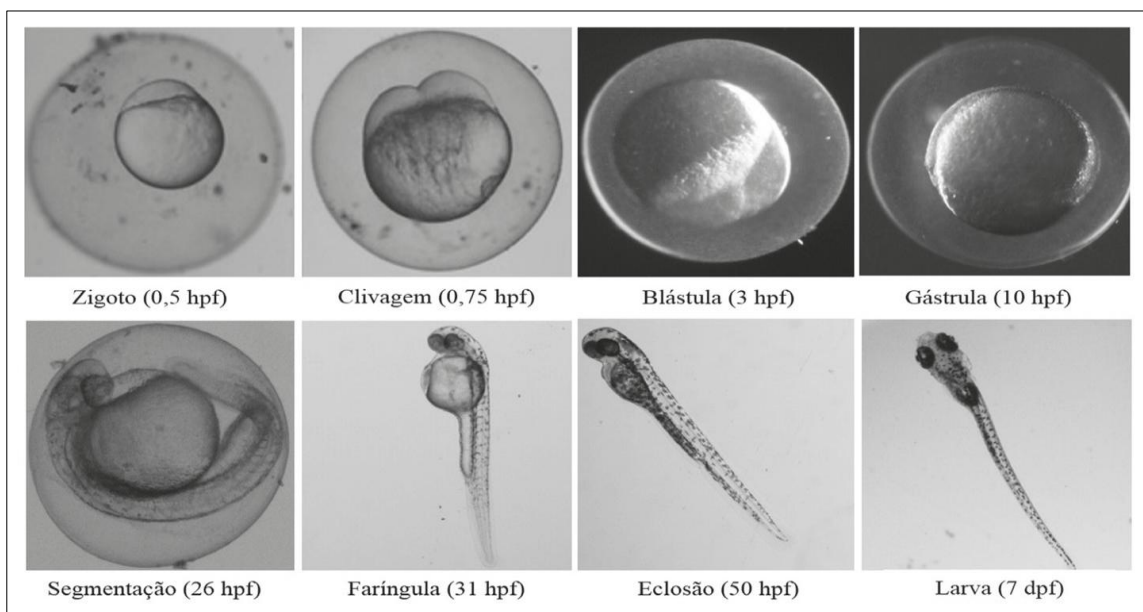
Fonte: Próprio autor

Figura 9. Fêmea de *D. rerio*.



Fonte: Próprio autor

Figura 10. Estágios de desenvolvimento embrionário do *D. rerio* até 7 dias pós fertilização



Fonte: (SIEBEL et al., 2015)

1.1.4.6.Toxicidade aguda em *D rerio*

A toxicidade está relacionada aos danos causados no organismo humano por determinados agentes tóxicos, estes, geralmente oriundos de plantas, microorganismos, fármacos e animais. Os testes que avaliam os efeitos tóxicos e grau de toxicidade são guiados por organizações que padronizam estes ensaios, com o intuito de causar menos sofrimento possível para os animais utilizados para estes testes, como por exemplo: *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) e *International Organization for Standardization* (ISO) (SANTOS, 2016; MACHADO, 2018; THIAGARAJAN et al., 2019).

A utilização do zebrafish na avaliação da toxicidade é uma opção ascendente no meio científico, principalmente no rastreamento do efeito tóxico nas fases reprodutivas e de desenvolvimento, podendo então se avaliar os efeitos tóxicos desde a embriogênese, fase larval e por fim adulta (BEEKHUIJZEN et al., 2015; BRIDI, 2017). Dentre os tipos de ensaios de toxicidade em zebrafish, destacam-se a TA de peixes adultos, toxicidade aguda reprodutiva e toxicidade aguda de embriões, também chamada de embriotoxicidade, além de respeitar os princípios de redução, substituição e refinamento.

Em peixes adultos, o teste de TA que envolva substâncias químicas, requer sempre a escolha de um curto período de tempo e, é imprescindível para descobrir a dose máxima que estes peixes podem tolerar de determinada substância, além de permitir comprovar a viabilidade e segurança de produtos utilizados comumente na medicina tradicional (KOVRIŽNYCH et al., 2013; KHEDKAR et al., 2018; THIAGARAJAN et al., 2019). Dentre os danos tóxicos causados nos órgãos dos peixes adultos podemos citar: lesões de intestino, fígado, brânquias e rins, além dos danos tóxicos que podem influenciar no processo reprodutivo tanto em machos, quanto fêmeas.

A utilização de embriões de *D. rerio* em ensaios de toxicidade são imprescindíveis como modelo alternativo frente aos mamíferos, além de os ovos de zebrafish serem fonte de exposição de produtos químicos, além de permitir a transferência das fêmeas para os ovos (HILL et al., 2005; VRANIC et

al., 2019). As principais alterações dentro da embriotoxicidade em zebrafish são avaliadas em 96 horas após exposição a substância testada, ou seja 100 hpf, sendo assim as principais alterações são: mortalidade, malformações da cabeça, edema cardíaco, edema de saco vitelino, malformações da cauda, desprendimento da cauda (BEEKHUIJZENA et al., 2015).

1.1.4.7 *D. rerio* como modelo animal para estudos voltados para diabetes

O zebrafish apresenta grande semelhança genética e fisiológica com o organismo humano (BENCHOULA et al., 2019), sendo assim é um modelo animal bastante atrativo para estudar doenças metabólicas pois conserva parâmetros como o perfil lipídico estrutura do pâncreas e homeostase da glicose (ZANG et al., 2017).

A morfogênese e arquitetura celular do pâncreas do zebrafish é semelhante a do mamífero (TEHRANI; LIN, 2011). Ambos possuem produção exócrina e endócrina pancreática produzindo assim hormônios e enzimas de forma similar (BIEMAR et al., 2001). Além do pâncreas, também são conservados o desenvolvimento e a função de outros sistemas orgânicos envolvidos na homeostase da glicose, tais como cérebro, fígado, tecido adipócito e músculo esquelético (MADDISON; CHEN, 2017; ZANG et al., 2018)

Dentro deste contexto, um dos principais desafios é a escolha da metodologia a ser utilizada para induzir hiperglicemia, de forma a garantir uma curva hiperglicêmica no tempo necessário para intervir com o algum tratamento proposto (ZANG et al., 2018).

Atualmente temos quatro formas para indução de hiperglicemia no zebrafish:

a) indução por imersão em glucose - incubação do peixe adulto em solução de glucose em concentrações variadas (GLESSON et al., 2007);

b) ablação química das células β pancreáticas - injeção intraperitoneal com aloxano ou estreptozotocina (INTINE et al., 2013; BENCHOULA et al., 2019);

c) por alimentação - utilizando alimentos com alterações em sua composição nutricional e/ou na quantidade de vezes de oferta nutricional (ZANG et al., 2017);

d) e por linhagens de peixes transgênicos (EMFINGER et al., 2019).

A *L. ferrea* é conhecida popularmente por sua atividade antidiabética e hipoglicemiante e alguns estudos também sugerem essa atividade biológica. Derivados do extrato etanólico dos frutos secos mostraram-se potentes inibidores da aldose redutase, enzima dependente do NADPH e responsável em converter glicose plasmática e tecidual em sorbitol (UEDA *et al.*, 2001). A ação hipoglicêmica dessas moléculas foi investigada *in vivo* e *in vitro*, e comprovou-se que o sorbitol acumulado em eritrócitos, cristalino e nervo ciático foi reduzido após o tratamento com o ácido elágico, principalmente (UEDA *et al.*, 2004). O extrato etanólico aquoso de suas folhas reduziu os níveis glicêmicos por via oral em ratos (HASSAN *et al.*, 2015). A atividade hipoglicêmica do extrato aquoso da casca do caule de *L. ferrea* foi investigada em modelo de diabetes induzida por estreptozotocina causando redução nos níveis de glicose em jejum e aumento na tolerância a glicose dos animais tratados (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

Apesar disso, não existem dados na literatura sobre a toxicidade e atividade antidiabética de *L. ferrea* em zebrafish, além de também existir apenas um estudo que aplica um tratamento com base em produto natural no zebrafish enquanto modelo animal de indução de diabetes. Sendo assim, este trabalho espera contribuir para avaliação da toxicidade e ação antidiabética de *L. ferrea*.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antidiabética do extrato hidroetanólico de *L. ferrea* em zebrafish com diabetes induzida por aloxano intraperitoneal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar o extrato hidroetanólico dos frutos de *L. ferrea*;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato hidroetanólico de *L. ferrea* em zebrafish adultos;
- Analisar os aspectos histopatológicos de brânquias, fígado, intestino e rins dos animais submetidos a toxicidade aguda
- Realizar a toxicidade aguda do extrato hidroetanólico de *L. ferrea* em embriões de zebrafish;
- Realizar a indução de hiperglicemia com aloxano em zebrafish
- Avaliar a ação antidiabética do extrato hidroetanólico dos frutos de *L. ferrea* em de zebrafish através da análise de parâmetros bioquímicos tais como: glicose, TGO, TGP, uréia e creatinina;

3.1 MATERIAIS

Os solventes utilizados na preparação de reagentes, soluções, extração, partições e métodos cromatográficos apresentaram grau de análise (P.A.), foram obtidos do fabricante VETEC[®] (Rio de Janeiro, Brasil). O aloxano foi adquirido da Sigma (São Paulo, Brasil). Os demais insumos foram adquiridos de fornecedores qualificados.

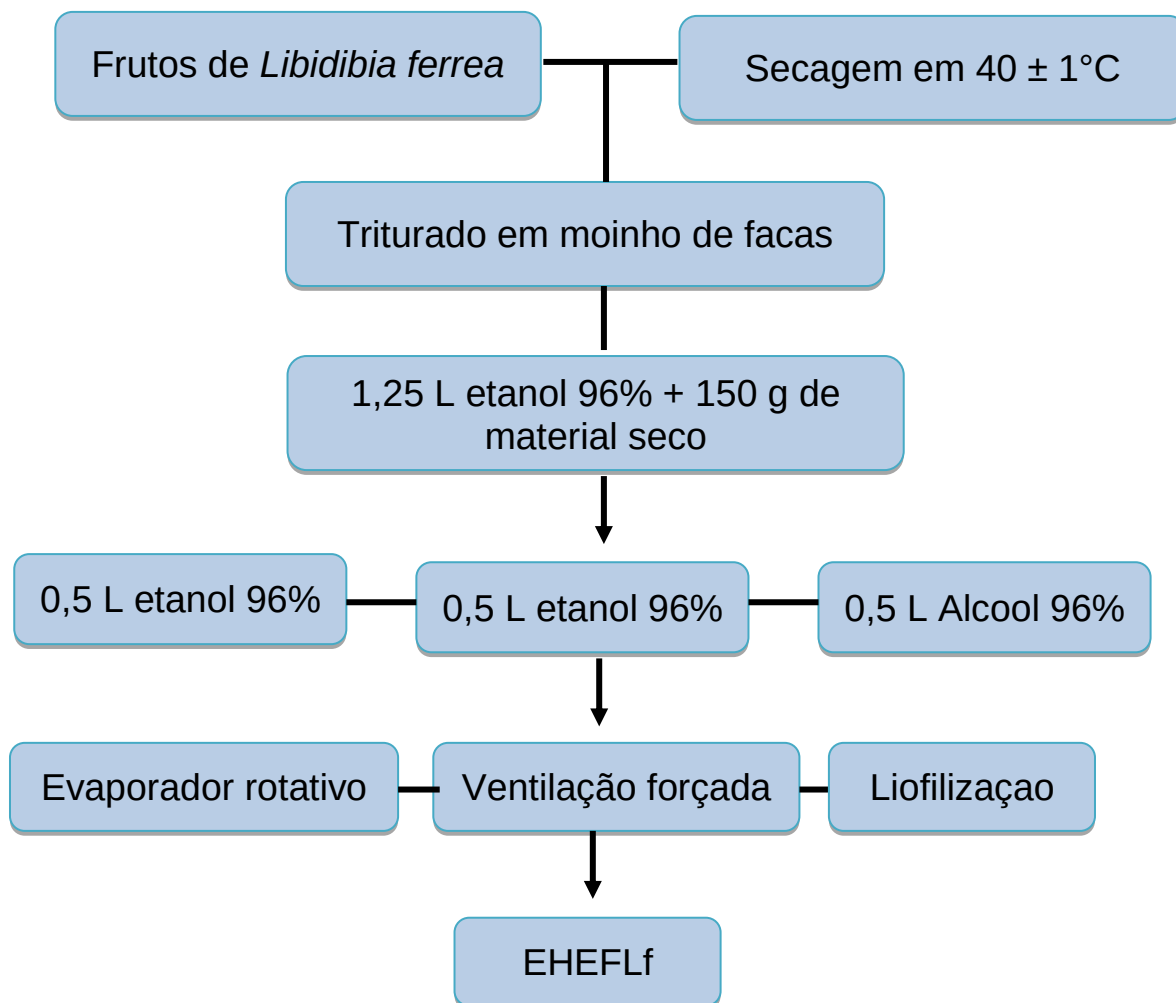
3.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico, constituído da parte aérea com frutos de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz, foi coletado no município de Macapá, no horto de plantas medicinais do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá - IEPA, sob as coordenadas geográficas N 00°02'49.4" W 51°03'40.5". A identificação do material vegetal foi realizada por comparação à exsicatas depositadas em herbário regional pela botânica Dr^a. Rosângela do Socorro F. R. Sarquis. Amostras da espécie foram depositadas no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental sob o número de registro 195949.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Os frutos de *L. ferrea* coletados foram espalhados em bandejas e submetidos a secagem em estufa, com temperatura controlada em $40 \pm 2^\circ\text{C}$, por 4 dias. Após a secagem, o material resultante foi submetido a quebra manual das favas e moído em moinho de facas. Após, foi submetido a extração pela técnica de percolação em etanol 96 % (v/v), sendo efetuada a renovação do solvente após 24, 12 e 6 horas. No primeiro ciclo adicionou-se 1,25 L de solvente (etanol 96%) e nos demais 0,5 L. Após este período, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório, Fisatom (São Paulo, Brasil) em temperatura de 45°C e posteriormente colocado sob ventilação forçada (48 horas) para remoção do excesso do solvente. Ao final do processo, o extrato foi liofilizado e armazenado sob refrigeração em ambiente hermeticamente fechado.

Figura 11. Fluxograma de obtenção do EHEFLf.



Fonte: Próprio autor

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

O EHEFLf foi analisado por LC-MS/MS utilizando um sistema de espectrometria de massa UPLC-Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por electrospray operando em modo negativo a uma voltagem de 2,9 kV. A coluna utilizada foi uma Thermo Synchronis C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 µm) mantida a 40 °C. A fase móvel consistiu em (A) formiato de amônio 5 mM e (B) metanol em modo de eluição por gradiente (0-2 min, 20% B; 2-4 min, 60% B; 4-10 min, 95% B; 10-12 min, 95% B e 12,1-23 min, 20% B) a uma vazão de 400 µL min⁻¹.

3.5 ANIMAIS

Os animais foram provenientes da Aqua New Aquários e Peixes Ltda (PE, Brasil). Foram utilizados peixes de ambos os sexos, com idade entre 8 meses e 2 anos, de linhagem AB selvagem. Foram acondicionados em aquários na Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), e passaram por um período de adaptação (40 dias). A temperatura foi controlada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), além de obedecer a um ciclo claro/escuro de 12 horas (período claro das 7:00 h da manhã as 19:00 h da noite) recebendo ração comercial em flocos Alcon Colors (Santa Catarina, Brasil) duas vezes por dia. Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAP (Brasil) sob o número de registro 005/2018.

3.6 ESTUDO DE TOXICIDADE AGUDA

3.6.1 Toxicidade em embriões

O teste seguiu as recomendações com base na *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) 236 e realizou algumas adaptações. Foi realizado o acondicionamento (pelo menos 12 horas) de oito grupos de animais, cada grupo era composto por dois machos e 1 fêmea, mantidos separados por uma divisória de vidro transparente em aquário de reprodução, onde os ovos são capturados para o fundo para que não haja canibalismo. Após pernoite, foi acendidas luminárias, simulando o amanhecer (estímulo luminoso) de forma a incitar a postura (OECD, 2013). Segundo metodologia descrita por Yang e colaboradores (2018), para evitar variantes do tipo genético optou-se por coletar ovos de no mínimo três grupos. Após coleta, os ovos foram lavados com água de aquário, randomizados, selecionados triplicatas de 10 ovos por concentração e transferidos para placas de petri contendo 5 ml das concentrações de EHEFLf a serem testadas: 25, 50, 75, 125, 250 e 500 mg/L, além dos controles utilizando Solução de Propilenoglicol 1% (SP1%) e água de aquário, para cada concentração avaliou-se grupos de 10 embriões (em triplicata), totalizando 30 embriões por concentração. Posteriormente, foi retirado um ovo de cada vez e adicionado em placa de 96

poços previamente preparada contendo 250 µl das concentrações e controles em cada poço. Posteriormente, acondicionado em estufa (SOLAB - SL, Brasil) na temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. A observação quanto a alterações teratogênicas, bem como vitalidade, foi realizada através de microscópio nas seguintes horas: 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) (OECD, 2013).

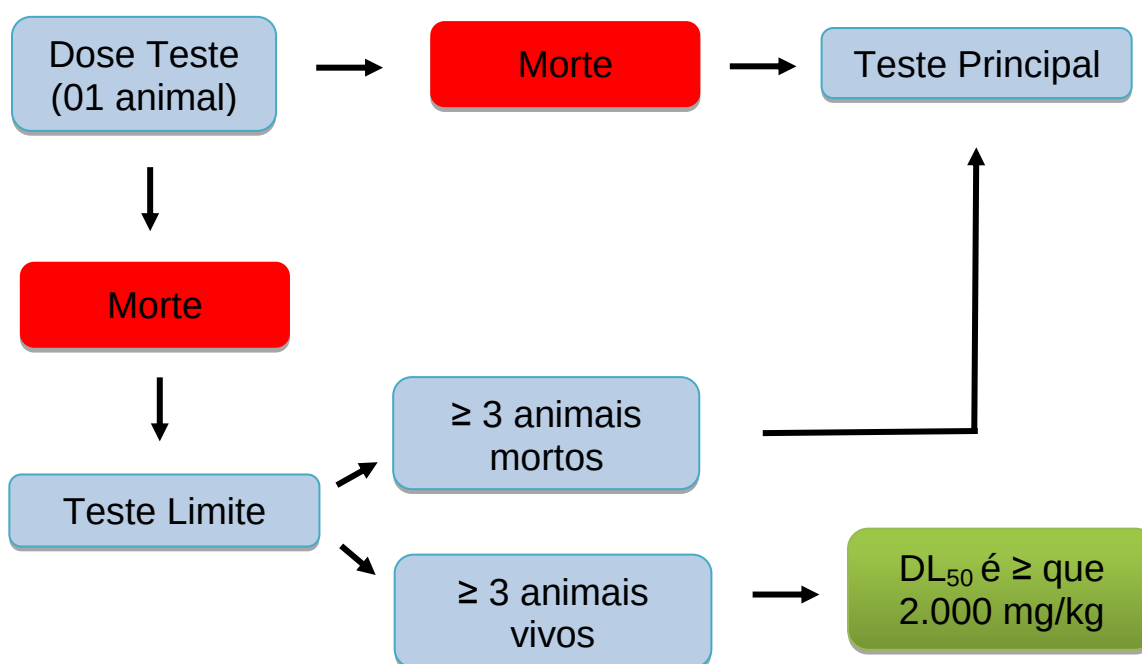
3.6.2 Toxicidade em zebrafish adulto

A avaliação da TA em zebrafish adulto foi realizada a partir de uma adaptação com base nas diretrizes descritas pela OECD 425, onde além de observar a morte, observou-se o comportamento dos animais durante 48 horas.

Foram preparadas duas soluções: SP1% e EHEFLf 1g/ml. Na primeira solução pesou-se 0,050g de propilenoglicol, posteriormente vertendo-se 5.000g de água destilada estéril, após manteve-se em agitação vigorosa, em agitador do tipo vórtex por dois minutos, enquanto a segunda solução, pesou-se 1.000g de extrato de *L. ferrea* pulverizado, posteriormente vertendo-se em 1.000g de SP1%, por gotejamento controlado com seringa em agitação vigorosa por dois minutos. O teste de TA pode ser realizado em duas etapas: teste limite e teste principal, porém neste estudo utilizou-se apenas do teste limite. Inicialmente utiliza-se uma dose teste, onde é administrado por via oral (gavagem) a dose de 2g/kg, após observação de 48 horas, caso não houvesse morte do animal, seguiria para o teste principal, caso contrário, teste limite.

O teste inicial consiste na administração por via oral de 2g/kg para quatro animais, caso houvessem ≥ 3 mortes, seria necessário seguir para o teste principal, caso não houvessem mortes ou estas sejam ≤ 2 mortes, o teste é encerrado, não sendo possível calcular dose letal 50 (DL_{50}), apenas recomenda-se que as doses utilizadas sejam abaixo de 2g/kg. Por fim, o experimento finaliza com cinco animais (dose teste + teste limite).

Figura 12. Fluxograma da Toxicidade em *D. rerio* adulto, segundo OECD 425



Fonte: Próprio autor

3.6.2.1 Avaliação do Comportamental

A avaliação do comportamento, seguiu a metodologia descrita por Souza e colaboradores (2016). Após a administração (toxicidade aguda em *D. rerio* adulto) foram observados por 48 horas. Nas primeiras 4 horas observou-se os animais com intervalos de 30 minutos e posterior a esse período em intervalos de 12/12 horas (segundo recomendação da OECD 425. Os parâmetros comportamentais avaliados foram classificados em estágios 1, 2 e 3, estes estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Classificação de Alterações comportamentais de acordo com estágios.

Estágios	Alterações comportamentais
I	• Aumento da atividade do nado; • Espasmos; • Tremores no eixo da cauda
II	• Nado circular; • Perda da postura.
III	• Perda da motilidade; • Deposição no fundo do aquário; • Morte

Fonte: Souza *et al.*, 2016

3.6.2.2 Avaliação histopatológica

O estudo histopatológico foi baseado nas técnicas descritas por Souza *et al.* (2015). Foram avaliadas as brânquias, rins, fígado e, intestino. A eutanásia dos animais foi realizada por imersão em água com gelo por dez minutos em temperatura controlada variando entre 0 e 4°C até perda total de movimento opercular, seguindo a metodologia descrita por Favoretto *et al.* (2019). O material foi corado de acordo com protocolo de Souza *et al.* (2016) e foi corado em Hematoxilina de Harris (Laborclin, Brasil) e eosina amarelada (Inlab, Brasil). As lâminas histológicas foram analisadas por Microscópio óptico Olympus (BX41-micronal, Brasil) e fotografada com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital).

O Índice de alterações histopatológicas (IAH), foi estabelecido a partir das alterações encontradas nas brânquias, fígado, rins e intestino. Após o cálculo foi classificado em estágio I, II e III de acordo com as alterações apresentadas, sendo que foram classificadas em: normais (0 a 10), moderadamente alteradas (11 a 20), moderadas a graves (21 a 50) ou severas irreversíveis (>100) (POLEKSIC; MITROVIC TUTUNDZIC, 1994; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; RIGOLIN-SÁ, 1999; CARVALHO *et al.*, 2017). Os índices foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^{na} a_i + 10 \sum_{i=1}^{nb} b_i + 10^2 \sum_{i=1}^{nc} c_i}{N}$$

Onde:

- a: primeiro estágio
- b: segundo estágio
- c: terceiro estágio
- na: número total de alterações consideradas sendo como de primeiro estágio
- nb: número total de alterações consideradas sendo como de segundo estágio
- nc: número total de alterações consideradas sendo como de terceiro estágio
- N: número de peixes analisados por tratamento

3.7 INDUÇÃO DE HIPERGLICEMIA

Para o teste de indução de hiperglicemia, foram utilizados 100 animais adultos, ambos os sexos, com idade entre 8 meses e 2 anos. Foram mantidos em jejum por 12 horas e receberam três aplicações de injeção intraperitoneal de aloxano na dose: 350 mg/kg, na primeira semana, no primeiro e quinto dia e na segunda semana, no décimo segundo dia (tabela 3). Para confirmação hiperglicêmica, foram eutanasiados três animais de cada grupo, após verificação em glicosímetro On Call® Plus (São Paulo, Brasil), o limite de detecção de glicose do aparelho é: 20 mg/dl a 600 mg/dl, foram considerados hiperglicêmicos animais que obtiveram glicemia ≥ 200 mg/dl.

Tabela 3. Aplicações de aloxano de acordo com a semana e os dias de aplicação.

Semana	Dia
1ª semana	1º dia
	5º dia
2ª semana	12º dia

Fonte: Próprio autor

3.8 TRATAMENTO

O tratamento foi iniciado 24 horas após a última injeção intraperitoneal de aloxano, sendo realizado por via oral, utilizando uma pipeta volumétrica para gavagem, uma vez ao dia (pela manhã), em jejum de 10 a 12 horas, para que não houvesse expulsão do volume, o tempo de tratamento foi de sete dias. Os grupos para tratamento, foram os descritos abaixo:

- Grupo 1: não diabético, sem tratamento (normoglicêmicos)
- Grupo 2: diabético, tratado com SP1%
- Grupo 3: diabético, tratado com água
- Grupo 4: diabético, tratado com medicamento referência - Metformina (2,4 mg/kg);
- Grupo 6: diabético, tratado com EHEFLf 50 mg/kg;
- Grupo 7: diabético, tratado com EHEFLf 75 mg/kg;

- Grupo 8: diabético, tratado com EHEFLf 150 mg/kg;
- Grupo 9: diabético, tratado com EHEFLf 300 mg/kg

3.9 COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue e dosagem da glicose foi realizada no animal com jejum de 10 a 12 horas. A eutanásia foi realizada por imersão em água com gelo por dez minutos em temperatura controlada variando entre 0 e 4°C até perda total de movimento opercular (FAVORETTO *et al.*, 2019). Não foi usado anestesia com medicamentos para evitar alterações nos níveis de glicose sanguíneos (DORSEMANS, *et al.*, 2017). Após eutanásia, o peixe foi secado com papel toalha para remoção total de água, foi colocado sobre uma placa de petri para corte transversal, e coleta de um 1 µl de sangue em tiras teste, monitorada em aparelho On Call® Plus (São Paulo, Brasil).

3.10 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Ao término do tratamento, os peixes foram submetidos a eutanásia por imersão em água com gelo por dez minutos em temperatura controlada variando entre 0 e 4°C até perda total de movimento opercular (FAVORETTO *et al.*, 2019). A coleta de sangue foi realizada para a medição de glicose em fita em sangue total. O soro também foi separado por adição de heparina para avaliação de parâmetros bioquímicos: uréia, creatinina, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico- pirúvica (TGP). A uréia foi analisada em sistema automatizado por fotometria em ultravioleta usando cinética de dois pontos. A creatinina foi analisada em sistema automatizado por reação cinética de dois pontos – método colorimétrico. O TGO e TGP foram analisados em modo cinético por metodologia cinética UV-IFCC.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

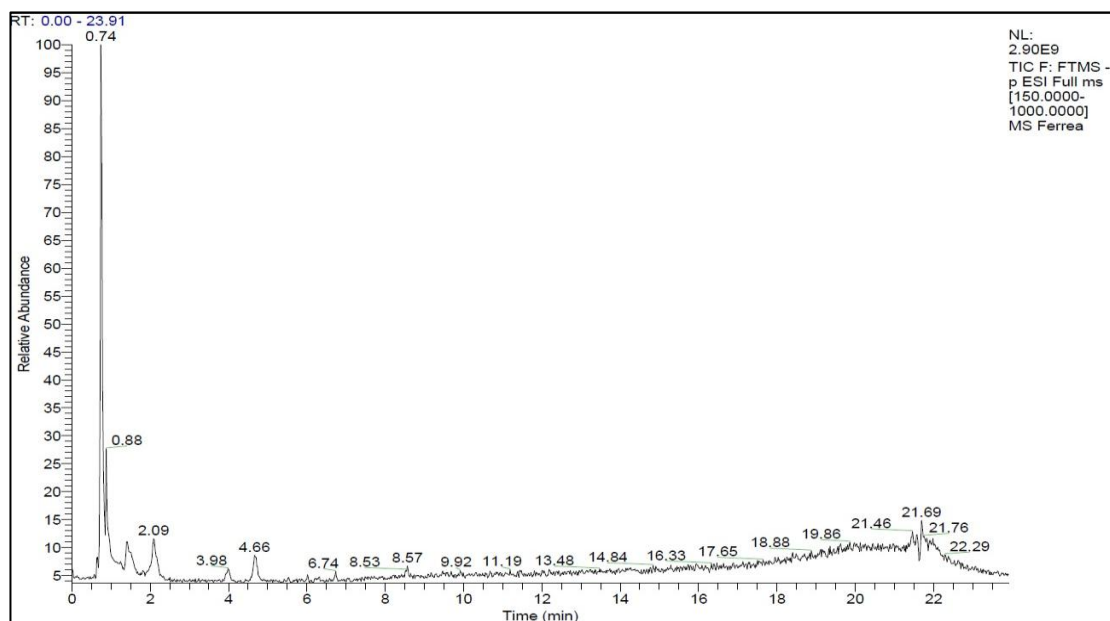
Os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ Desvio Padrão (SD) da média de cada grupo experimental. Aplicando o teste ANOVA, seguido do teste de Tukey. O nível de significância considerado será de 5% ($p < 0.05$). O software empregado será o Graph Pad Prisma® (versão 5.03).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Costa e colaboradores (2015), evidenciaram em revisão de literatura que os frutos de *L. ferrea* constituem a porção mais utilizada da planta na medicina tradicional, além de apresentar diversas atividades biológicas, destacando-se as atividades: antioxidante e hipoglicemiante. Os frutos de *L. ferrea* possuem altas concentrações de compostos fenólicos, além de flavonóides, terpenóides e saponinas, principalmente quando extraídos com metanol (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017). Já o extrato hidroetanólico, apresentou saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis, taninos, sesquiterpenos, lactonas e antraquinonas (KOBAYASHI, *et al.*, 2015). Os frutos de *L. ferrea* são conhecidos por um alto teor de polifenóis (FERREIRA *et al.*, 2016). Lipídeos, substâncias fenólicas e açúcares são as principais classes de produtos naturais encontrados em *L. ferrea* (FERREIRA; SOARES, 2015).

O resultado UHPLC-MS/MS (modo negativo) do extrato de etanólico é mostrado na Figura 13. Os dados de m/z em alta resolução indicaram uma alta concentração de substâncias com fórmulas moleculares condizentes com substâncias polihidroxiladas na região entre 0,5 e 1,5 minuto de análise. Todavia, não foram encontrados sinais referentes a ácidos graxos, terpenoides e outros lipídeos.

Figura 13. Cromatograma TIC da análise LC-MS/MS do extrato de *L. ferrea*.



Fonte: Próprio autor

Em resumo, três ácidos fenólicos e um açúcar foram tentativamente identificados com base em seus espectros de MS2. O pico com tempo de retenção de 0,73 minuto mostrou um íon molecular desprotonado [M-H]⁻ em m/z 179.05540 e fragmentos na análise de MS2 condizentes com perdas sucessivas de moléculas de água ou fragmentos de CH₂O, desta forma, sendo identificado como uma hexose.

Os resultados obtidos estão de acordo com o estudo de Sampaio e colaboradores (2009), onde foi realizada a caracterização e quantificação de polifenóis de frutos de *L. ferrea*, utilizando como padrão o ácido gálico, foi possível uma detecção de 7,3% de polifenóis. Vasconcelos e colaboradores (2011) em estudo realizado com cascas de *L. ferrea*, descreveu a presença do ácido gálico dentre os principais compostos químicos encontrados por HPLC, além de ácido elágico e catequinas e epicatequina. Hassan e colaboradores (2015), associam a atividade hipoglicemiante de seu estudo realizado com folhas de *L. ferrea* aos metabólitos secundários presentes em sua composição química: fenóis e flavonoides, além de diminuir a progressão de lesões de células betapancreáticas por possuir um forte efeito antioxidante.

Tabela 4. Identificação dos constituintes do EHEFLf por LC-MS/MS.

TR (min)	MS	Fórmula experimental	Erro (ppm)*	MS ²	Substância
0,92	169.01340	C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	5,0 ppm	125.02324	Ác. gálico
0,81	331.06729	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀ ⁻	0,7 ppm	271, 241, 211, 169[M-H-162]-, 125	Galloyl- glucose ester ^a
0,86	345.08279	C ₁₄ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	0,2 ppm	313.05731 169.01337 125.02334	Gallic acid methoxy glycoside ^b
0,73	179.05540	C ₆ H ₁₁ O ₆ ⁻	0,9 ppm	161.04422 131.03365 113.02316 95.01269	Hexose

Fonte: Próprio autor

4.2 TOXICIDADE EM EMBRIÕES

Os resultados obtidos no teste de toxicidade em embriões de *D. rerio*, foram descritos quanto as alterações morfológicas/teratogênicas, bem como morte letal (coagulação, ausência de batimentos cardíofetais e não descolamento de cauda) (tabela 5). O grupo controle exposto em água do aquário, não obteve alterações e/ou mortes, enquanto o controle utilizando SP1% obteve 26,6% de mortes letais, seguindo a mesma frequência nas concentrações: 25mg/dL e 50 mg/L contendo EHEFLf, 30,0% e 33,3% respectivamente. No entanto ao aumentar as concentrações do extrato, houve uma diminuição significativa no percentual de mortes letais, o que sugere um efeito protetor do EHEFLf sobre o propilenoglicol, sendo assim o percentual de mortalidade foi de 10,0% para o grupo tratado com 125mg/L de EHEFLf, 13,3% para o grupo tratado com 250 mg/L e 10,0%, para o de 500 mg/L de EHEFLf. Em contrapartida, as concentrações mais altas: 250 e 500 mg/L apresentaram as alterações morfológicas/teratogênicas: edema cardíaco, escoliose e edema

de saco vitelino. A concentração de 125 mg/L foi a que obteve menor taxa de morte letal, além de não apresentar nenhuma alteração.

Tabela 5. Visão geral das alterações/efeitos teratogênicos causados pelas concentrações do EHEFLf em embriões de *D. rerio* em 96 hpf.

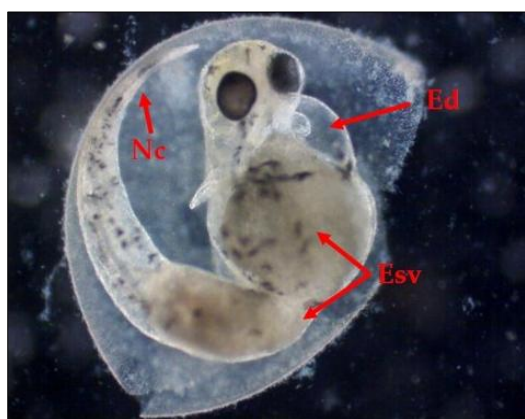
Alterações teratogênicas	Mg/L							Σ_t	%
	H ₂ O	SP1%	25	50	125	250	500		
Edema cardíaco	0	0	0	0	0	0	20	20	11,1
Escoliose	0	0	0	0	0	10	0	10	5,5
Edema de saco vitelino	0	0	0	0	0	5	21	26	14,4
Retardo de crescimento	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lethal embryos	0	8	9	10	3	4	3	n/a	n/a
Σ Teratogenic embryos	0	0	0	0	0	15	21	36	n/a
% Teratogenic embryos	0	0	0	0	0	50	70	n/a	n/a
% Lethal embryos	0	26,6	30,0	33,3	10,0	13,3	10,0	n/a	n/a

n/a= não se aplica

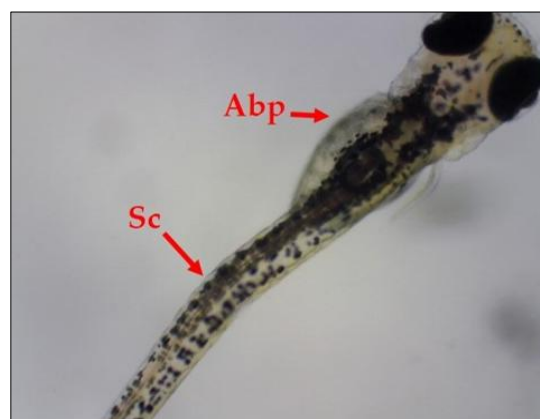
Souza *et al.* (2019), também utilizou como parâmetro para contabilizar morte letal dos embriões, a ausência de batimentos e a coagulação do ovo e, evidenciou como alterações teratogênicas em seu estudo: edema cardíaco, edema de saco vitelino, deformação na cauda e escoliose. Bittencourt e colaboradores (2018) relaciona futuros problemas cardiovasculares com as alterações teratogênicas apresentadas no coração dos embriões e em seu estudo utilizando vanádio, mostrou que o edema cardíaco era dose dependente, o que foi semelhante em nosso estudo, ao elevar a dose da concentração de EHEFLf. Sun *et al.* (2017) ao estudar os efeitos tóxicos do butilbenzil ftalato frente aos embriões também evidenciou as mesmas alterações teratogênicas, porém enfatizou principalmente as cardíacas,

mostrando que os efeitos tóxicos podem influenciar geneticamente estas alterações neste modelo.

Figura 14. Efeitos teratogênicos em embrião de *D. rerio*, tratado com EHEFLf 500 mg/L. Onde são observados: Não descolamento da cauda – Nc, Edema cardíaco – Ec, Edema de saco vitelino – Esv.



Fonte: Próprio Autor



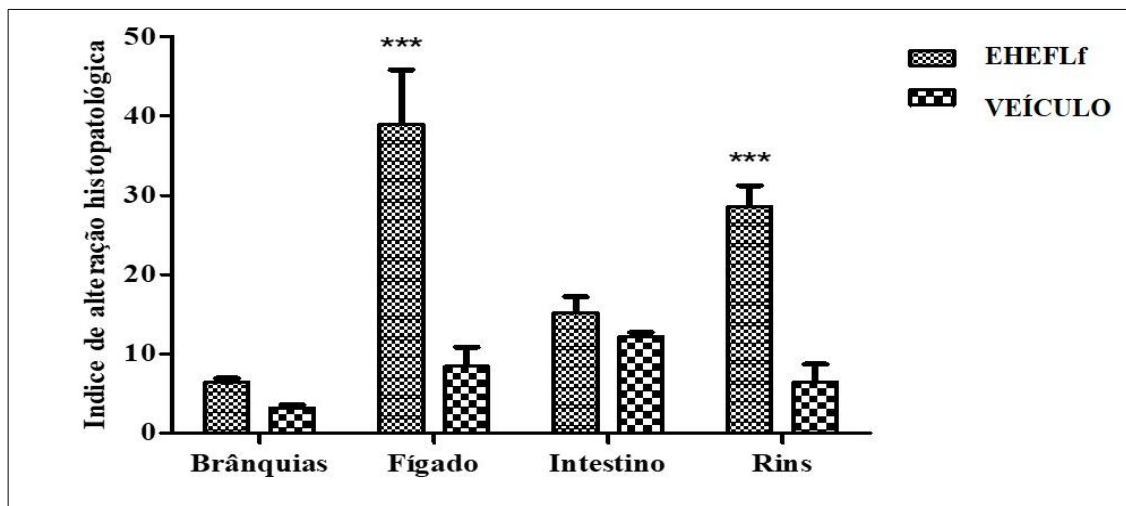
Fonte: Próprio autor

4.3 TOXICIDADE EM ZEBRAFISH ADULTO

A toxicidade aguda realizada no zebrafish adulto não apresentou alterações relacionadas ao comportamento dos peixes dentro das 48 horas, tanto nos que receberam EHEFLf na dose de 2000mg/kg quanto os que receberam SP1% em nenhum dos estágios observados (estágio I - aumento da atividade do nado, espasmos e tremores no eixo da cauda; estágio II - nado circular, perda da postura e estágio III - perda da motilidade; deposição no fundo do aquário e morte)

Quanto a análise histopatológica realizada em diferentes tecidos, é possível descrever de forma geral, que nas brânquias e intestino houveram alterações leves. No entanto nos rins e fígado houveram alterações significativas comparadas com o veículo utilizado – SP1%, o que nos mostra que o EHEFLf foi altamente metabolizado, com os altos índices mostrados neste órgãos (figura 17).

Figura 16. Distribuição de alterações histopatológicas em brânquias, fígado, intestino e rins, a partir da administração de 2g/kg de EHEFLf. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. *** P valor: $< 0,05$.



Fonte: Próprio autor

Referente aos achados histológicos nas brânquias de *D. rerio* que receberam tratamento com EHEFLf 2000mg/kg, podemos observar que todos os achados se enquadram nas alterações de nível I, ou seja, alterações leves, obtendo uma média de $6,4 \pm 0,5099$ (Tabela 6). As lâminas mostram alterações histológicas do tipo: LS: Lamelas secundárias, LP: Lamela primária, SVC: Seio venoso central, todas classificadas como alterações leves (Figura 18). As brânquias dos peixes que receberam SP1%, seguiram o mesmo padrão apresentando alterações hitológicas que se classificam em nível I, apresentando uma média de $3,2 \pm 0,3742$, menor que a média de IAH dos peixes que recebam EHELF (Tabela 7). As lâminas mostram alterações histológicas do tipo: DELS: Deslocamento ou elevação das Lamelas secundárias; DC: Desarranjo dos capilares; DiC: Dilatação dos capilares; HCBLS: Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias (Figura 19).

Segundo Castro e colaboradores (2018), alterações nas brânquias pode dificultar o processo de troca gasosa, consequentemente, comprometer a respiração e de acordo com o grau de complicação pode levar a morte, porém este nível de alterações é possível ser reversível. Estas alterações podem

ocorrer devido fatores que gerem atividades de inflamação, hiperplasia, fusão lamelar, produção exarcebada de muco, elevação de epitélio, achatamento da lamela secundária, aneurisma, dentre outras (FLORES-LOPEZ; THOMAZ, 2011). A avaliação histopatológica das brânquias apresenta importante fator no que diz respeito a ecotoxicidade, poluentes aquáticos, e substâncias com possível efeito tóxico, uma vez que possui uma grande superfície de contato e vascularização, permitindo assim a troca gasosa (COSTA, 2018). Desta forma, o organismo do *D. rerio*, na tentativa de expulsar a substância tóxica/estressora, pode hiperventilar, aumentando o movimento opercular e consequentemente sobrecarregando o tecido branquial.

Na tentativa de adaptação do peixe ao ambiente e/ou a alguma substância tóxica, ocorre o deslocamento das células epiteliais, este mecanismo é um dos primeiros a acontecer nestes casos (BORGES, 2019). Flores-lopez e Thomaz (2011) destacam a diminuição da troca gasosa causada pelo deslocamento destas células, ocasionada pelo distanciamento entre sangue e água.

Os resultados apresentados mostram que não houveram alterações histopatológicas significativas nas brânquias na dose de 2.000 mg/kg, mostrando que o EHELF não apresentou riscos tóxicos para as brânquias. As principais estruturas morfológicas das brânquias de *D. rerio* são as lamelas primárias e secundárias, estas fazem parte de quatro arcos branquiais, neste sentido, em estudo de toxicidade realizado com o leite de janaguba foi possível descrever que o composto bioativo em questão em doses elevadas apresenta diversas alterações de nível I, II e III causando danos graves para as estruturas citadas e consequentemente prejudicando a troca gasosa (SANTOS, 2016).

O grupo tratado com SP1%, apresentou algumas alterações classificadas como normais, porém consideradas de início progressivo, como por exemplo: DELS e HCBLS. Segundo Souza (2015), alterações como HCBLS são consideradas primárias e a partir da porção onde está se localizada, é possível supor futura fusão de lamelas secundárias, podendo esta ser parcial quando hiperplasia encontra-se na base da lamela, ou total quando presente ao longo da lamela. A hiperplasia celular gera um acúmulo exarcebado de água entre as lamelas, causando obstrução, gerando assim um déficit na troca gasosa realizada por esta estrutura (ZENI, 2016). O acúmulo de

líquido ocorre porque existe um bloqueio da passagem tanto de água, quanto de sangue para o interior da lamela, gerando progressivamente a morte destes animais (BORGES, 2019). Quando por algum motivo toxico ocorrem alterações nas lamelas secundárias, é sinal de um mecanismo de adaptação à algum tipo de estressor (REZENDE et al., 2014).

Tabela 6. Distribuição de alterações histopatológicas de Brânquias de *D. rerio* por IAH de acordo com o nível de alterações. Administrado 2g/kg (dose única) por gavagem (via oral) – EHEFLf.

Órgão	Substância teste	Peixe	Alterações histológicas		
Brânquias	EHELF		Nível I	Nível II	Nível III
		01	7	0	0
		02	5	0	0
		03	6	0	0
		04	8	0	0
		05	6	0	0
Classificação: Normal		Média: 6,4±0.5099			

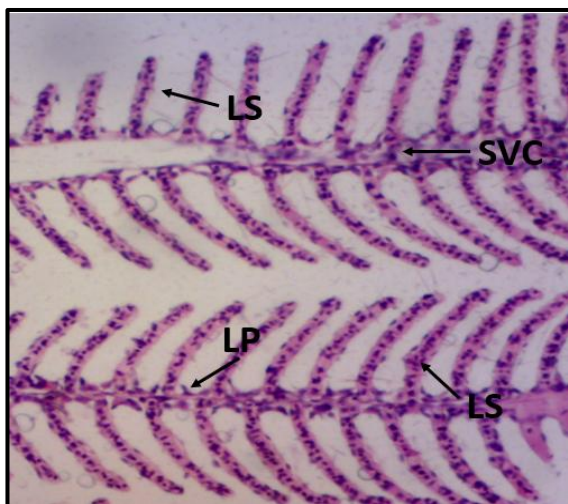
Fonte: Próprio autor

Tabela 7. Distribuição de alterações histopatológicas de Brânquias de *D. rerio* por IAH de acordo com o nível de alterações. Administrada por gavagem (via oral) SP1% (dose única).

Órgão	Substância teste	Peixe	Alterações histológicas		
Brânquias	SP1% (Veículo)		Nível I	Nível II	Nível III
		01	3	0	0
		02	3	0	0
		03	2	1	0
		04	3	0	0
		05	0	0	0
Classificação: Normal		Média: 3,2± 0.3742			

Fonte: Próprio autor

Figura 17. Alterações histopatológicas de brânquias de *D. rerio* – EHEFLf



Fonte: próprio autor

Figura 18. Alterações histopatológicas de brânquias de *D. rerio* - SP1%



Fonte: próprio autor

Referente aos achados histológicos no fígado de *D. rerio* que receberam tratamento com EHELF, podemos observar que todos os achados apresentaram alterações moderadas a graves, que classificaram o IAH em nível I e II, com média de $39,0 \pm 6.8340$ (Tabela 8). As lâminas mostram as seguintes alterações histológicas: VC: vacuolização citoplasmática e EsB: Estagnação biliar (Figura 20). O fígado dos peixes que receberam SP1%, não apresentou alterações histológicas graves, classificando o IAH em nível I, com média de $8,4 \pm 2.4210$, menor que a média de IAH dos peixes que recebem EHELF (Tabela 9). As lâminas mostram alterações histológicas do tipo: VN: vacuolização nuclear; VC: Vacuolização citoplasmática; NA: atrofia nuclear (Figura 21).

Novaes e colaboradores (2018), ao exporem *D. rerio* aos metais níquel e cobre apresentaram em sua avaliação histológica uma grande área de vacuolização entre os hepatócitos, marcada por áreas esbranquiçadas extensas entre essas células. Em estudo reprodutivo com exposição de 21 dias aos metais cádmio e zinco foi possível observar alterações histológicas iniciais de vacuolização, posteriormente degeneração dos tecidos e desarranjo dos cordões hepáticos, é importante ressaltar que estas alterações foram progressivas de acordo com o período de exposição (ALKIMIN, 2016). A

vacuolização citoplasmática, como neste estudo, também foi evidenciada no estudo de Gayão e colaboradores (2013), onde atribuíram este fenômeno ao possível acúmulo de lipídeos, prejudicando assim o metabolismo hepático.

Santos e colaboradores (2018) ao realizarem a toxicidade aguda do leite de janaguba em peixes adultos, descreveram alterações hepáticas de nível I em todas as concentrações utilizadas, além de alterações de níveis I e II, dentre estas houve a vacuolização intensa e o aumento celular dos hepatócitos, sendo este último atribuído a hiperatividade metabólica realizada pelo fígado que progressivamente pode levar a necrose celular. Borges (2018), como no presente estudo, encontrou alterações histológicas classificadas como moderadas a graves ao tratar peixes adultos com nanoemulsões produzidas a partir de *Rosmarinus officinalis*, dentre as alterações de nível II, descreveu: atrofia e vacuolização nuclear.

Tabela 8. Distribuição de alterações histopatológicas de fígado de *D. rerio* por IAH de acordo com o nível de alterações. Administrado 2g/kg (dose única) por gavagem (via oral) – EHEFLf.

Órgão	Substância teste	Peixe	Alterações histológicas		
			Nível I	Nível II	Nível III
Fígado	EHEFLf	01	5	3	0
		02	7	4	0
		03	7	5	0
		04	6	1	0
		05	10	3	0
Classificação: Moderada a grave			Média: 39,0 ± 6,8340		

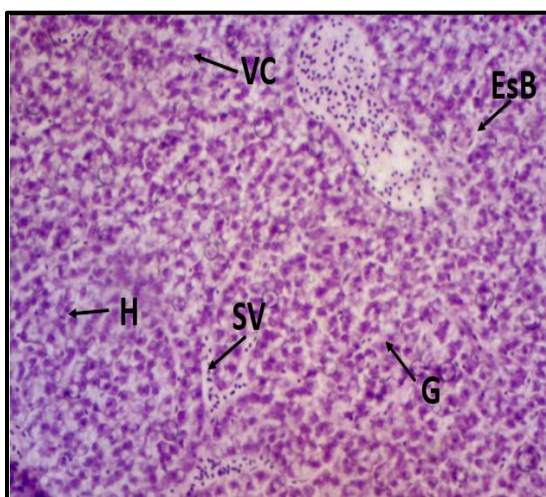
Fonte: Próprio autor

Tabela 9. Distribuição de alterações histopatológicas de fígado de *D. rerio* por IAH de acordo com o nível de alterações. Administrada por gavagem (via oral) SP1% (dose única).

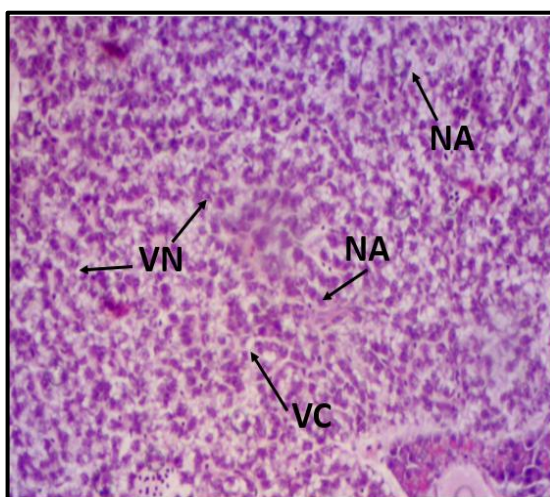
Órgão	Substância teste	Peixe	Alterações histológicas		
			Nível I	Nível II	Nível III
Fígado	SP1% (veículo)	01	3	0	0
		02	8	1	0
		03	2	1	0
		04	2	0	0
		05	3	1	0
Classificação:		Normal	Média: 8,4 ± 2,4210		

Fonte: Próprio autor

Figura 19. Alterações histopatológicas de fígado de *D. rerio* – EHEFLf



Fonte: Próprio autor



Fonte: Próprio autor

Os achados histológicos no intestino de *D. rerio* que receberam tratamento com EHELF, podemos observar que todos os achados se enquadram nas alterações de nível I e II, classificando-se como alterações leves a moderadas, obtendo uma média de $15,2 \pm 1,9850$ (Tabela 10). As lâminas mostram alterações histológicas do tipo: SLI: Infiltração linfocítica estromal; DEL: Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal; ILI: Infiltração de leucócitos; HGC: Hiperplasia de células caliciformes (Figura 22). O intestino dos peixes que receberam SP1%, apresentou alterações histológicas classificadas em leves a moderadas descritas em nível I e II, apresentando IAH baixo com média de $12,2 \pm 0,4899$, discretamente menor que a média de IAH dos peixes que recebem EHELF (Tabela 11). As lâminas mostram alterações histológicas do tipo: ILS: Infiltração linfocítica estromal; DLP: destacamento da lamina própria; ILI: infiltração de leucócitos (Figura 23).

No zebrafish, o intestino pode ser dividido em três segmentos: a) anterior, também conhecida como bulbo intestinal, os estudiosos acreditam que esta porção substitui as funções do estômago dos mamíferos, é o maior segmento intestinal e pela maior superfície de contato, responde pela absorção de nutrientes, proteínas e lipídeos e, é considerado análogo ao intestino delgado dos mamíferos b) média, considerado análogo ao intestino grosso dos mamíferos e c) posterior, também considerado análogo ao intestino grosso (DAMMSKI *et al.*, 2011; ARIAS-JAYO *et al.*, 2018; BORGES *et al.*, 2019).

Xia e colaboradores (2018) em estudo realizado utilizando o chumbo, não observaram alterações significativas nas lâminas histopatológicas de intestino, apesar de ter elevado a secreção de muco e composição da microbiota intestinal, exercendo assim um papel importante frente a substâncias tóxicas. Técnicas invasivas podem gerar alterações nas lâminas histológicas dos diversos órgãos do Zebrafish. Borges *et al.* (2019) em estudo anti-inflamatório observou altas taxas de alterações histopatológicas intestinais, porém associou a procedimento invasivo utilizado em seu estudo (injeção intraperitoneal).

Tabela 10. Distribuição de alterações histológicas de intestino de *D. rerio* por IAH de acordo com o nível de alterações. Administrado 2g/kg (dose única) por gavagem (via oral) – EHEFLf.

Órgão	Substância teste	Peixe	Alterações histológicas		
			Nível I	Nível II	Nível III
Intestino	EHEFLf	01	8	0	0
		02	8	1	0
		03	9	1	0
		04	4	1	0
		05	7	1	0
Classificação:	Leves a moderadas		Média: 15,2±1,9850		

Fonte: Próprio autor

Tabela 11. Distribuição de alterações histológicas de intestino de *D. rerio* por IAH de acordo com o nível de alterações. Administrada por gavagem (via oral) SP1% (dose única).

Órgão	Substância teste	Peixe	Alterações histológicas		
			Nível I	Nível II	Nível III
Intestino	SP1% (veículo)	01	1	1	0
		02	3	1	0
		03	3	1	0
		04	1	1	0
		05	3	1	0
Classificação:	Normal	Média: 12,2±0,4899			

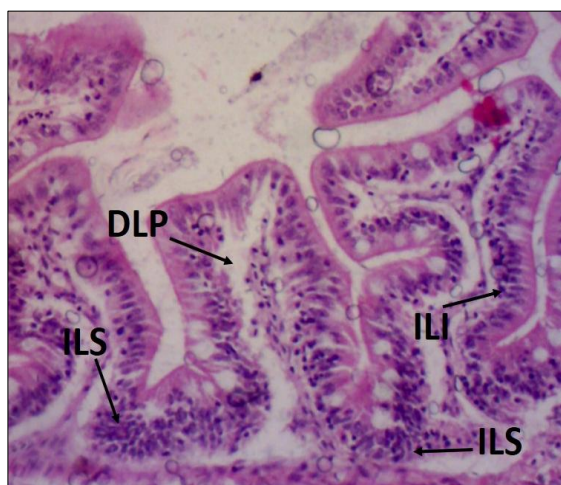
Fonte: Próprio autor

Figura 21. Alterações histopatológicas de intestino de *D. rerio* – EHEFLf



Fonte: Próprio autor

Figura 22. Alterações histopatológicas de intestino de *D. rerio* – SP1%



Fonte: Próprio autor

Referente aos achados histológicos nos rins de *D. rerio* que receberam tratamento com EHEFLf, observa-se que todas as alterações histológicas se enquadram nas alterações de nível I e II, classificando-se como alterações moderadas a graves, obtendo AIH alto e uma média de $28,6 \pm 2,6190$ (Tabela 12). As lâminas mostram alterações histológicas do tipo: RT: túbulos renais; HT: tecido hematopoético; G: Glomérulo; CB: Capsula de Bowman; ALT: Aumento do lúmen tubular (Figura 24). Os rins dos peixes que receberam SP1%, apresentaram alterações histológicas que se enquadram nas alterações de nível I e II, classificando-se como normal, obtendo IAH baixo com média de $6,4 \pm 2,2930$, menor que a média de IAH dos peixes que recebem EHEFLf (Tabela 13). As lâminas mostram alterações histológicas do tipo: LCC: perda do contorno celular; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares; DHTL: degeneração hialina tubular leve; OT: Obstrução tubular (Figura 25).

Os rins têm grande importância para o metabolismo de substâncias bioativas no organismo humano, uma vez que desempenham papel fundamental na sua eliminação, bem como de seus metabólitos, podendo influenciar diretamente na meia-vida dessas substâncias no organismo. Nos peixes, ele desempenha potencial papel na homeostase. A urina é o principal fluido biológico responsável pela excreção da grande maioria dos fármacos, este processo de eliminação pode se dar por três vias: filtração glomerular,

secreção tubular ativa e reabsorção tubular passiva (CLARK *et al.*, 2013; GOLAN *et al.*, 2014).

A alteração estrutural luminal nos rins, a exemplo do aumento do lúmen tubular, pode estar relacionada com hiperplasia, eosinofilia, e apoptose celular, o que pode levar a perda da função renal e consequentemente a proliferação desordenada das células tubulares como mecanismo compensatório para reparar a perda ocasionada possivelmente por um fator tóxico (CARVALHO *et al.*, 2017; BARROS, 2018). Neste contexto, lesões relacionadas a estrutura luminal renal podem estar diretamente relacionada a progressão para necrose destas células (SOUZA *et al.*, 2016).

Tabela 12. Distribuição de alterações histopatológicas de rins de *D. rerio* por IAH de acordo com o nível de alterações. Administrado 2g/kg (dose única) por gavagem (via oral) – EHEFLf.

Órgão	Substância teste	Peixe	Alterações histopatológicas		
			Nível I	Nível II	Nível III
Rins	EHEFLf	01	8	0	0
		02	8	1	0
		03	9	1	0
		04	4	1	0
		05	7	1	0
Classificação:		Moderadas a graves	Média: 28,6 ± 2,6190		

Fonte: Próprio autor

Tabela 13. Distribuição de alterações histopatológicas de rins de *D. rerio* por IAH de acordo com o nível de alterações. Administrada por gavagem (via oral) SP1% (dose única).

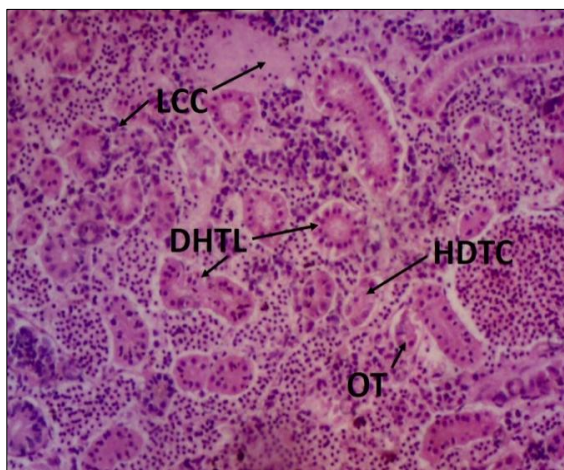
Órgão	Substância teste	Peixe	Alterações histopatológicas		
			Nível I	Nível II	Nível III
Rins	SP1%	01	2	0	0
		02	2	1	0
		03	3	0	0
		04	2	0	0
		05	2	1	0
Classificação:		Moderadas a graves	Média: 6,4 ± 2,2930		

Fonte: Próprio autor

Figura 23. Alterações histopatológicas dos rins de *D. rerio* – EHEFLf



Fonte: Próprio autor



Fonte: Próprio autor

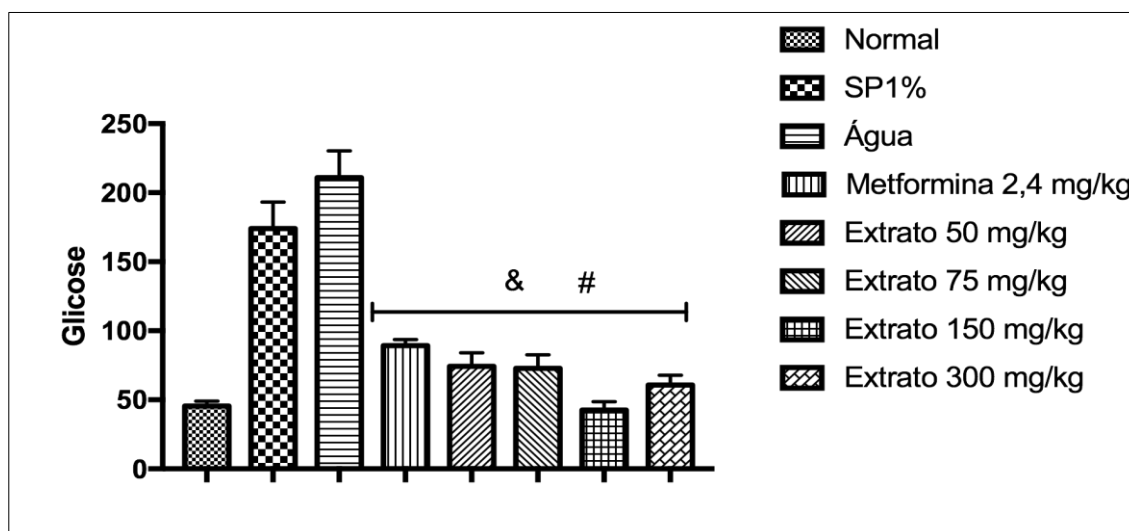
4.4 ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DO EHEFLf

Para a indução do diabetes nos animais foi escolhido o método de ablação de células-beta pancreáticas por estímulo químico. Nesse processo ocorre o desenvolvimento de DM1 por aplicações de injeção intraperitoneal de aloxano. O aloxano age causando a destruição das células produtoras de

insulina no pâncreas, as chamadas células β pancreáticas, levando a distúrbios metabólicos decorrentes do aumento da glicemia e glicose em jejum e níveis reduzidos de insulina (CASTAÑEDA *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos após a indução e tratamento nos animais com o EHEFLf, mostram que os grupos que receberam o extrato, após a finalização do tratamento, mostraram valores de glicemia próximos aos valores dos animais do grupo sem diabetes. Os animais do grupo sem diabetes (grupo normal) obtiveram o valor glicêmico de $45,5 \pm 9,4$ mg/dl. Os grupos de controle negativo que receberam por via oral SP1% e água de aquário, respectivamente obtiveram valores de glicemia próximos a $174,0 \pm 50,6$ e $210,8 \pm 51,6$ mg/dl respectivamente. A metformina (controle positivo), obteve baixa glicêmica para 89,2 mg/dl, enquanto os EHEFLf nas doses de 50, 75, 150 e 300 mg/kg, obtiveram baixa glicêmica respectivamente de 74,2, 72,7, 42,5 e 60,7 mg/dl. Dentre as doses utilizadas a que obteve maior atividade antidiabética foi a de 150 mg/kg atingindo valor normoglicêmico abaixo do valor do grupo sem diabetes, no entanto as doses de EHEFLf não apresentaram diferença estatística significativa entre si, porém em relação aos grupos que receberam SP1% e água do aquário o nível de significância foi alto apresentando p valor < 0,05.

Figura 25. Atividade antidiabética do EHEFLf em zebrafish adulto após sete dias de tratamento por via oral. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. ^{& e #}P valor: < 0,0001.



Fonte: Próprio autor

Substâncias que quando ingeridas possuem a capacidade de diminuir o nível de glicose sanguínea, podem ser chamados de antidiabéticos orais (OLIVEIRA, 2006). Benchoula e colaboradores (2019) ao utilizar o extrato da folha de *Psychotria Malayana*, frente a um modelo de indução em zebrafish utilizando aloxano, obtiveram um resultado significativamente semelhante ao da insulina (controle positivo), obtendo assim uma atividade antidiabética efetiva. Capiotti e colaboradores (2014) realizaram indução por imersão e após, tratamento com metformina na dose de 10 μ M, afim de descrever a responsividade do organismo do zebrafish frente ao tratamento convencional utilizado, mostrando ser capaz de reduzir os níveis de glicose em 51%. Neste estudo, optamos por utilizar a metformina como controle positivo e, ao comparar com o resultado nas diversas doses utilizadas de EHEFLf, obtivemos um resultado mais efetivo que o da metformina 2,4 mg/kg, com destaque para a dose de 150mg/kg que foi a que apresentou maior atividade antidiabética.

Apesar de existirem diversos estudos que já demonstraram que a ação de antidiabéticos orais, bem como a insulina são efetivos no organismo do zebrafish, faz-se necessários os que investiguem de forma aprofundada a farmacocinética e farmacodinâmica neste modelo animal. Contudo, poucos estudos aplicam alguma proposta terapêutica alternativa, como é o caso de plantas medicinais. Dentro deste contexto, apenas Benchoula e colaboradores (2019) intervieram com algum tratamento referente a produtos naturais. As pesquisas com zebrafish mostram-se ascendentes no que diz respeito aos avanços para o tratamento de diabetes, bem como na análise e resolutividade das complicações microvasculares e macrovasculares, sendo assim, este modelo animal, tornou-se uma alternativa de grande importância para o meio científico e tende a cada vez mais se difundir (JORGENS et al., 2012).

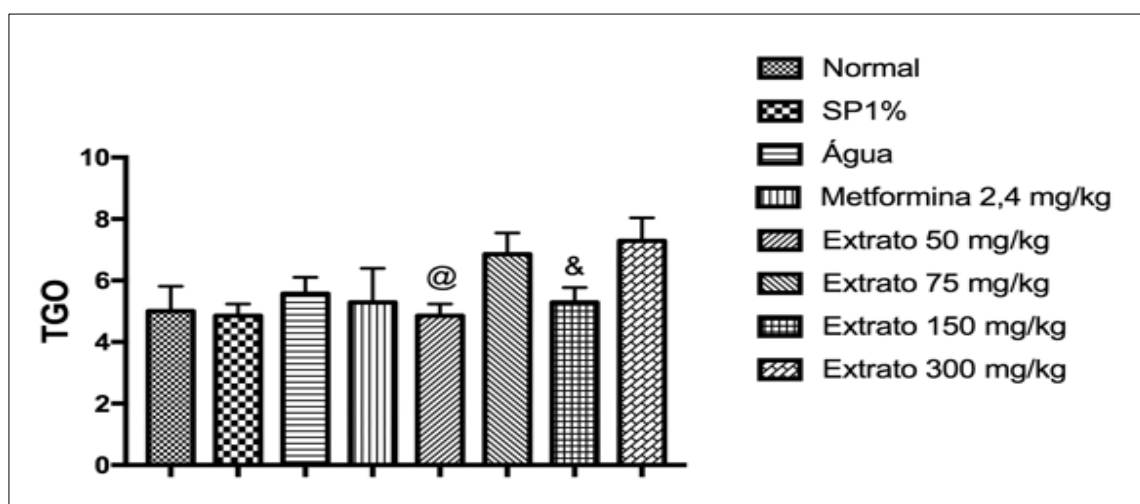
4.4.1 Análise dos parâmetros bioquímicos

Referente aos exames bioquímicos realizados, os resultados de TGO (figura 26) mostram que estatisticamente os grupos de SP1%, 50 e 150 mg/kg de EHEFLf não apresentaram diferença, respectivamente apresentando valores: $4,9 \pm 0,3$, $4,8 \pm 0,3$ e $4,8 \pm 0,4$ U/L, os valores mais altos foram as de EHEFLf nas doses de 75 e 300 mg/kg, respectivamente $6,8 \pm 0,6$ e $7,2 \pm 0,7$

U/L. Referente aos exames bioquímicos realizados, os resultados de TGP (figura 27) mostram que os grupo que recebeu metformina por via oral na dose de 2,4 mg/kg, foi que apresentou menor valor e, o grupo que apresentou maior valor foi do EHEFLf na dose de 75 mg/kg, respectivamente $5,3 \pm 1,8$ e $6,9 \pm 0,4$ U/L. Os demais grupos não apresentaram alterações que ultrapassasse este limiar.

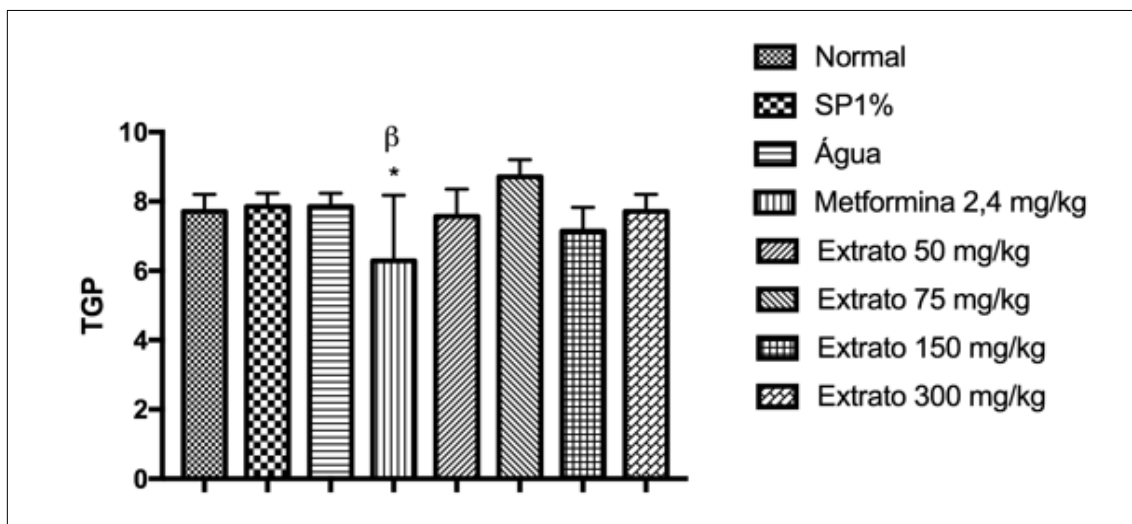
Neto e colaboradores (2011) associam as alterações nos níveis de TGO e TGP com distúrbios metabólicos, dentre ele o diabetes, podendo elevar até quatro vezes o valor de normalidade, isto é possível pelo fato de que em casos de diabetes não controlada, ou seja, hiperglicemia constante, devido ao gradiente de concentração, a glicose tem livre acesso nas células hepáticas, que armazenam esta em forma de glicogênio, este ocupa o citoplasma dos hepatócitos, gerando então o aumento das transaminases (PORTUGAL et al., 2011).

Figura 26. Resultados de testes bioquímicos realizados em modo cinético UV-IFCC – TGO. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. @p valor: $< 0,001$. &P valor: $< 0,0001$.



Fonte: Próprio autor

Figura 27. Resultados de testes bioquímicos realizados em modo cinético UV-IFCC – TGP. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. ^{*}p valor: < 0,5. ^βP valor: < 0,5.



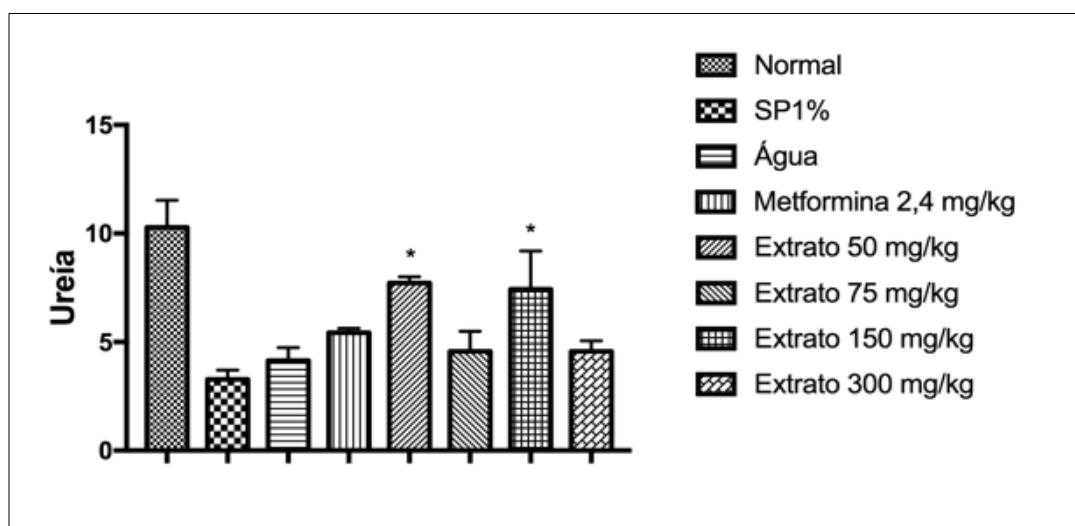
Fonte: Próprio autor

Referente aos exames bioquímicos realizados, os resultados de Uréia (figura 28) mostram que o grupo normal apresentou o maior valor quanto a este parâmetro $10,2 \pm 3,3$ mg/dl, os grupos que receberam EHEFLf nas doses de 50 e 150 mg/kg, respectivamente $7,7 \pm 0,7$ e $4,5 \pm 1,2$ mg/dl. Já a creatinina (figura 29), apresentou menores valores nos grupos de 75 e 150 mg/kg de EHEFLf, respectivamente com $0,1 \pm 0,4$ e $0,1 \pm 0,5$ mg/dl, enquanto o grupo controle que foi tratado com SP1% foi o que apresentou valores de creatinina maiores com $0,3 \pm 0,0$ mg/dl.

Uma das complicações que mais atingem pessoas com DM, é a doença renal, causando sérios impactos para saúde destas pessoas, uma das principais formas para detectar precocemente o início desta complicação é avaliando a função renal, que tem como exames mais básicos e iniciais, a uréia e creatinina (NETO et al., 2014). Em geral, através da uréia e creatinina é avaliada a função renal, para estimar a taxa de filtração glomerular (SODRÉ et al., 2007). Para Pedroso (2011) estudos relacionados a análises no snague do zebrafish são pouco descritos na literatura. Fator esse que gera uma lacuna a

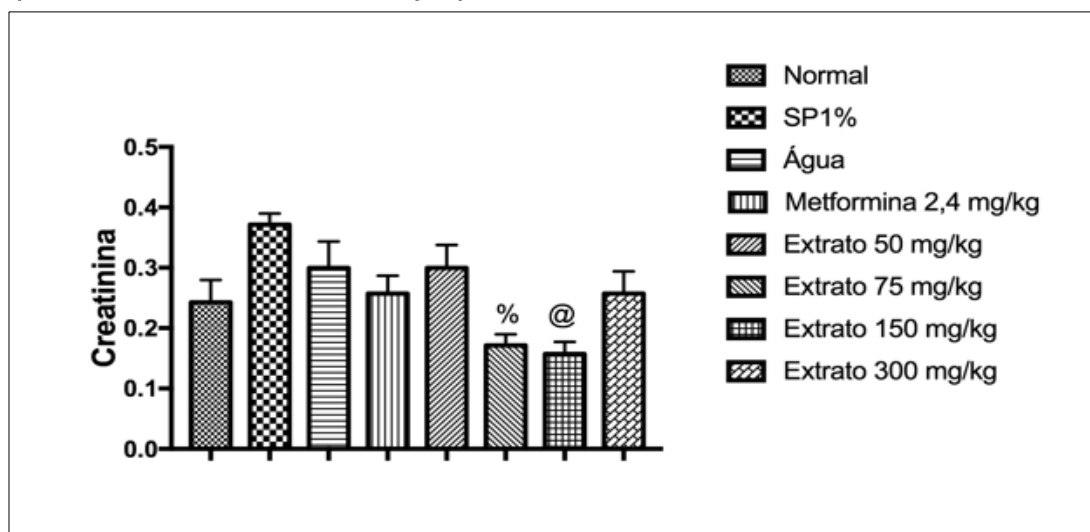
cerca dos valores de referência, bem como a confiabilidade dos resultados obtidos em relação ao quantitativo de animais.

Figura 28. Resultados de testes bioquímicos realizados em método colorimétrico - Uréia. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. * p valor: $< 0,5$.



Fonte: Próprio autor

Figura 29. Resultados de testes bioquímicos (Creatinina) realizados em método colorimétrico. Os dados foram representados em média $\pm$ DP. Anova, posteriormente test de Tukey. * p valor: $< 0,5$.



Fonte: Próprio autor

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A utilização de plantas medicinais pela população da Amazônia resiste ao tempo e perpassa de geração para geração, a partir deste conhecimento tradicional, surgem os estudos a cerca de plantas medicinais, afim de investigar e comprovar a atividade biológica destas. Frente a isto, a riqueza da biodiversidade brasileira abriga diversas plantas potencialmente favoráveis a ser candidatas a futuros fármacos, sendo esta uma ação que se faz urgente, frente ao aparecimento de novas doenças, resistência antimicrobiana, dentre outras.

Quanto a toxicidade aguda em zebrafish adulto, os resultados obtidos neste estudo, podem sugerir que o EHEFLf possui um grau de segurança aceitável para uso como medicamento oral, uma vez que uma dose superestimada foi usada e as alterações a nível tecidual puderam ser consideradas dose-dependentes, mesmo com base em termos comparativos com outros estudos.

Os resultados de toxicidade em embriões mostraram que as principais alterações apresentadas foram edema cardíaco e de saco vitelino, e que também foi concentração-dependente. Não há evidências de correlação dos efeitos observados com a composição fitoquímica, portanto, sugerimos que estudos mais aprofundados a cerca desta questão sejam realizados futuramente.

A atividade antidiabética apresentou resultados altamente significativos, mostrando que os frutos de *L. ferrea*, possuem a capacidade de redução nos níveis glicêmicos, sendo assim, mediante ao comparativo com diversos estudos, esta atividade esta relacionada a compostos fenólicos presentes nesta planta, como é o caso do ácido gálico, composto majoritário apresentado na cromatografia líquida de alta eficiência. Quanto aos parâmetros bioquímicos: TGO, TGP, uréia e creatinina, faz-se necessário estudar mais a fundo de forma a determinar os parâmetros de referência (normais).

As principais etapas que serão realizadas futuramente serão, a histopatologia dos animais que participaram do estudo da atividade

antidiabética, analisando: brânquias, fígado, intestino, rins e pâncreas. Investigação do mecanismo de ação do EHEFLf através de biologia molecular.

- ALKIMIN, G. D. **Toxicidade de Cádmio e Zinco em Danio rerio: Comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e a potencial atuação como interferentes endócrinos**, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – UNESP, Sorocaba.
- ALVES, E. U., BRUNO, R. L. A., OLIVEIRA, A. P., ALVES, A. U., ALVES, A. U. Escarificação ácida na superação da dormência de sementes de Pau ferro (*Caesalpinia ferrea* Mart.ex Tu. Var. *Leiostachya* Benth.) **Revista caatinga**, v. 22, n. 1, 2009.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 81-90, 2014.
- ARAÚJO, T. A. S., ALENCAR, N.L., DE AMORIM, E. L. C., ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72–80, 2008.
- ARAÚJO, A. V., DA SILVA, M. A. D., FERRAZ, A. P. F. Superação de dormência de sementes de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz var. *ferrea*. **Revista Magistra**, v.29, n. 3/5, p. 298-304, 2017.
- ARAÚJO, T. A. S; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. A New approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72–80, 2008.
- ARIAS-JAYO, N.; ABECIA, L.; ALONSO-SÁEZ, L.; RAMIREZ-GARCIA, A. RODRIGUEZ, A.; PREDRO, M. A. High-fat diet consumption induces microbiota Dysbiosis and Intestinal Inflammation in Zebrafish. **Microbial ecology**, v. 76, n. 4, p. 1089-1101, 2018
- BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Antiulcer Action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in Rats. **Planta Médica** , v. 60, n. 2, p.118-120, 1994.

BACCHI, E.M.; SERTIÉ, J.A.A., VILLA, N., KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 204–207, 1995.

BAYNES, H. W. Classificação, Fisiopatologia, Diagnóstico e Manejo de Diabetes Mellitus. **J Diabetes Metab**, v. 6, n. 5, p. 1-9, 2015.

BARIANI, A.; GONÇALVES, J.F.C.; CHEVREUIL, L.R.; CAVALLAZZI, J.R.P.; SOUZA, L.A.G.; BENTES, J.L.S.; PANDO, S.C. Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 2, p.131-138, 2012.

BARREIROS 2015

BARROS, A. O., R. S. DE SOUZA, E. S. P. ARANHA, L. M. DA COSTA, T. P. DE SOUZA, M. C. DE VASCONCELLOS, AND E. S. LIMA. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruit extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, p. 71-76, 2014.

BEEKHUIJZENA, M.; KONING B, C.; FLORES-GUILÉNC, M. E.; VRIES-BUITENWEGA, S.; TOBOR-KAPLONA, M.; WAART, B. V.; EMMENA, H. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, n. 2015, p. 64-76, 2015.

BORGES, P.; EHRHARDT, A. Avaliação de marcadores de lesão renal em pacientes diabéticos submetidos à hemodiálise em um hospital do norte do estado do Rio Grande do Sul. **REBAC**, v. 50, n. 3, p. 215-220, 2018.

BORGES, R. S. Estudo da atividade anti-inflamatória de nanoemulsões a base de óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. 2019, 215 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) – Programa de pós graduação em inovação farmacêutica, Fundação Universidade Federal do Amapá, Macapá.

BRASIL, Resolução-RDC nº 14 de 14 de 31 de Março de 2010. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 mar 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Plantas Medicinais de interesse ao SUS - DAF/SCTIE/MS – RENISUS - fev/2009. Brasília, DF, Ministério da Saúde, 2009. 2p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretária de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o Cuidado da Pessoa com Doença Crônica: Diabetes Mellitus**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 162p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretária de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos política e programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas - Diabetes Mellitus tipo 1**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 88p.

BRIDI, D. Efeito da exposição ao glifosato sobre parâmetros comportamentais em peixe-zebra (Danio rerio). 2017. 71f. Dissertação (Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Farmacêutica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BRAGANÇA, L.A.R. **Plantas Medicinais Antidiabéticas**. Rio de Janeiro: EDUFF press, Niterói, RJ, 1996. 172p.

CARVALHO, A. A.; MENEZES, I. A. C.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V. Effect of the Chronic Treatment with Aqueous Extract of *Caesalpinia ferrea* and *Chrysobalanus icaco* on the Vascular Reactivity of Diabetic Rats. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 29, n. 5, p. 845-848. 2010.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, S. M. C.; TORRES, S. B.; BENEDITO, C. P.; NOGUEIRA, N. W.; SOUZA, A. A. T.; SOUZA NETA, M. L. D. E. Viability of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*) seeds by tetrazolium test. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 1, p. 7–12, 2017.

CASTAÑEDA R., RODRIGUEZ I., NAM Y. H., HONG B. N., KANG T. H. Trigonelline promotes auditory function through nerve growth factor signaling on diabetic animal models. *Phytomedicine*, v.36, p.128–136, 2017.

CASTRO, J. S.; FRANÇA, C. L.; FERNANDES, J. F. F.; SILVA, J. S.; CARVALHO-NETA, R. N. F.; TEIXEIRA, E. G. Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec**, v 70, n 2, p. 410-418, 2018.

CAVALHEIRO, M. G.; FARIAS, D. F.; FERNANDES, G. S.; NUNES, E. P.; CAVALCANTI, F. S.; VASCONCELOS, I.; MELO, V. M. M.; CARVALHO, A. F. U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista brasileira farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 586-591, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL PREVENTION. Diabetes 2014 Report Card. Cdc, v. TTY, p. 232-4636, 2014. Disponível em: www.cdc.333/diabetes/library/reports/congress.html. Acessado em 30 de Outubro de 2017.

CLARCK, M. A.; FINKEL, R.; REY, J. A.; WHALEN, K. **Farmacologia**

ilustrada. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 612p.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; JENSEN, B. B.; GRAFOVA, I.; SANTOS, P. A.; BARROS, A. M. C.; SOARES, F. V.; BARCELLOS, J. F. M.; SILVA, A. F.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Atividade antileishmanial de extratos de *Libidibia ferrea*: desenvolvimento de testes in vitro e in vivo. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 4, p. 331-340, 2017.

CONCEIÇÃO, R. A.; SILVA, P. N.; BARBOSA, M. L. C. Fármacos para o tratamento de diabetes tipo II: Uma visita ao passado e um olhar para o futuro. **Ver. Virtual Quim.** , v. 9, n. 3, p. 514-534, 2017.

COSTA, L. M.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; SOUZA, T. P. *Libidibia ferrea* (mart. ex tul) L. P. QUEIROZ var. *ferrea*: pharmacological, phytochemical and botanical aspects. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 48-53, 2015.

COSTA, K. J. A., LAMEIRA, O. A., DE ASSIS, R. M. A., MOURA, R. C., ALMEIDA, L. S. S., FERNANDES, V. S. **ASPECTOS FENOLÓGICOS DO JUCÁ – *Libidibia ferrea* MARTIUS ex TUL. (FABACEAE)** . Anais do 20º Seminário de Iniciação Científica e 4º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. Belém, 2016.

COSTA, M. F. P. Efeitos de concentrações ambientalmente relevantes de omeprazol em *Sparus aurata*: abordagem baseada em biomarcadores. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade ciências da saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

CORRÊA, C. E. S. Aspectos histológicos de gônadas e fígado de *Danio rerio* como potenciais biomarcadores indicativos de atuação de interferentes endócrinos do pesticida Chlorantraniliprole. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Programa de pós graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Sorocaba.

COUTINHO, C. I. N. Manutenção e reprodução em peixezebra (*Danio rerio*) - Relatório final de estágio no Biotério de Organismos Aquáticos do CIIMAR.

2018. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Mar) – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal.

DAMMSKI, A. P.; MULLER, B. G.; GAYA, C.; REGONATO, D. **Zebrafish Manual de criação em biotério**. 1ª ed. Curitiba:Universidade Federal do Paraná, 2011. 107p.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L. ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T.. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v: 32, n. 1. p. 9- 18, 2011.

SOUZA, A. B.; SOUZA, L. M. S.; CARVALHO, J. C. T.; MAISTRO, E. L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 380–383, 2006.

DHAS, T. S.; KUMAR, V. G.; KARTHICK, V.; SINGARAVELU, V. Effect of biosynthesized gold nanoparticles by *Sargassum swartzii* in alloxan induced diabetic rats. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 94, [s.n], p. 100-106, 2016.

DIAS, A. M. A.; REY-RICO, A.; OLIVEIRA, R. A.; MARCENEIRO, S.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; SOUSA, H. C. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory *Libidibia ferrea* extract using supercritical carbon dioxide technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, n. [s/n], p. 34–45, 2013.

DRONZINO, R. N.; ZULIN, M. J. P.; CASAGRANDE, L.; PEREIRA, A. V. Breve revisão: bioativos de *libidibia ferrea* e suas ações em odontologia. **Arquivos do Mudi**, v. 21, n. 1, p.39-47, 2017.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; BENSENOR, I. M.; MILL, J. G.; SCHMIDT, M. I.; LOTUFO, P. A.; VIGO, Á.; BARRETO, S. M. Doenças Crônicas Não transmissíveis no Brasil: Prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 1, p. 126-134, 2012.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res.** , v. 112, n. [s/n], p. 4–29, 2016.

EMFINGER, C. H.; LORINCZ, R.; WANG, Y.; YORK, N. W.; SINGAREDDY, S. S.; IKLE, J. M.; TRYON, R. C.; MCCLENAGHAN, C.; SHYR, Z. A.; HUANG, Y.; REISSAUS, C. A.; MEYER, D.; PISTON, D. W.; HYRC, L.; REMEDI, M. S. NUCHOLS, C. G. Beta-cell excitability and excitability-driven diabetes in adult Zebrafish islets. *Physiological reports*, v. 7, n. 11, p. 1-12, 2019.

Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB109828>>. Acesso em: 08 Jan. 2018.

FALCÃO, T. R.; RODRIGUES, C. A. O.; ARAÚJO, A. A.; MEDEIROS, C. A. C. X.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; GUERRA, G. C. B. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2019a.

FALCÃO, T. R.; ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; FARIAS, I. B.; SILVA, W. A. V.; FERREIRA, M. R. A.; GUERRA, G. C. B. *Libidibia ferrea* Fruit Crude Extract and Fractions Show Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antinociceptive Effect In Vivo and Increase Cell Viability In Vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, n. [s/n], p. 1-14, 2019b.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz: a review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 2, p. 140-150, 2015.

FERREIRA JÚNIOR W. S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **J Ethnopharmacol**, v. 138, n. 1, p. 238-252, 2011.

FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; LANGASSNER, S. M. Z.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SOARES, L. A. L. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 40, p. 3008–3013, 2013.

FIGUEIRAS, A. R. R.; COIMBRA, A. B.; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14-26, 2014.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A. T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Braz. J. Biol.** São Carlos, v. 71, n. 1, p. 179-188, fev. 2011.

FREITAS, A. C. C.; XIMENES, N. C. A; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C.; LINS, T. U. L.; MAGALHÃES, L. R.; COELHO, L. C. B. B.; CUNHA, M. G. C.; DILVA, T. Gferreira.; CORREIA, M. T. S. Atividades biológicas de *Libidibia* (Caesalpinia) ferrea var. *Parvifolia* (Mart. Ex Tul.) LP Queiroz Pod Preparações. **Evid Based Complement Alternt Med**. v. 2012, n. 514134, p. 2-7, 2012.

GADELHA, C. S.; JUNIOR, V. M. P.; BEZERRA, K. K. S.; PEREIRA, B. B. M.; MARACAJÁ, P. B. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208-212, 2013.

GALDINO, G.; MESQUITA, M.R.; KOSSMANN, I. D. F. Descrição morfológica da plântula e diásporo de *Caesalpineia ferrea* Mart. **Rev Bras Biociencia**, v.5, n. 2, p.747-749, 2007.

GALLÃO, M. M.; NORMANDO, L. O.; VIEIRA, I. G.; MENDES, F. N.; RICARDO, N. M.; BRITO, E. S. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea*. **Ind Crops Prod**, v. 47, n. 2013, p. 58-62, 2013.

GANESAN, P.; ARULSELVAN, P.; CHOI, D. K.; Phytobioactive compoud-based nanodelivery systems for the tratment of type 2 diabetes mellitus – current status. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p. 1097-1111, 2017.

GAYAO, A. L. B. A.; BUZOLLO, H.; FÁVERO, G. C.; JUNIOR, A. A. S.; PORTELLA, M. C.; CRUZ, C. CARNEIRO, D. J. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilápia-do-nilo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 48, n. 8, p. 991-997, 2013.

GERRA, A. C. V. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; ARAÚJO, A. A.; ROCHA, H. A. O. R.; MEDEIROS, J. S.; CAVALCANTE, R. S. C.; JÚNIOR, R. F. A. Libidibia ferrea presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, [s.n], p. 696-706, 2017.

GLEESON, M.; CONNAUGHTON, V.; ARNESON, L. S. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (Danio rerio) leads to morphological changes in the retina. **Acta Diabetol**, v. 44, n. 3, p. 157-163, 2007.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR, A. H.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 1889p.

GRINN - USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Online Database]. 2015. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=465144>. Acessado em 01 de Janeiro de 2018.

GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v. 37, n. 1717, p. 1-5, 2010.

HASSAN, S. K.; EL-SAMMAD, N. M.; MOUSA, A. M.; MOHAMMED, M. H.; FARRAG, A. R. H.; HASHIM, A. N. E.; WERNER, V.; LINDEQUIST, U.; EL-MOEN NAWWAR, M. A. Hypoglycemic and antioxidant activities of Caesalpinia ferrea Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic ratic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 6, p. 462-471, 2015.

HILL, A. J.; HIROKI, T.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

- HONORATO, C. A.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D. J.; MACHADO, M. R. F.; NASCIMENTO, C. A.; SATURNINO, K. S. Histologia do fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 64-68, 2014.
- HUNG, H. Y.; QIAN, K.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; HSU, C. S.; LEE, K. H. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 5, p. 580–606, 2012.
- INADA, A.; NAKANISHI, T.; MURATA, H.; INATOMI, Y.; UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M.; NISHINO, H.; KUCHIDE, M.; TAKAYASU, J.; MUKAINAKA, T.; NOBUKUNI, Y.; OKUDA, M.; TOKUDA, H. Cancer Chemopreventive Activity of 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl)ellagic Acid from the fruits of *Caesalpinia ferrea*. **Nat. Med.**, v. 57, n. 5, p. 92-195, 2003.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas**. Rio de Janeiro, 2014. 181p.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Idf diabetes atlas**. 6ª ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2015.
- INTINE, R. V.; OLSEN, A. S.; SARRAS, M. P. A Zebrafish Model of Diabetes Mellitus and Metabolic Memory. **Journal of Visualized Experiments**, [s/v], n. 72, p. 1-7, 2013.
- IRACHE, J. M.; ESPARZA, I.; GAMAZO, C.; AGUEROS, M.; ESPUELAS, S.. Nanomedicine: Novel approaches in humanan veterinary therapeutics. **Veterinary Parasitology**, v. 180, [s.n], p. 47-71. 2011.
- ISER, B. M.; STOPA, S. R.; CHUEIRI, P. S.; SZWARCOWALD, C. L.; MALTA, D. C.; MONTEIRO, H. O. C.; DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I. Prevalência de diabetes autorreferido no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.24, n.2, p.305-314, 2015.
- KHEDKAR, P. M.; JAGDALE, D. M.; DHANDE, S. R. Acute Toxicity testing of synthesized pyrazoline derivatives in adult zebrafish. **International Journal of**

Pharmaceutical Sciences and Research, v. 9, n. 1, p. 277-281, 2018.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. [s/n], p. 253-310, 1995.

KINKEL, M. D.; PRINCE, V. E. On the diabetic menu: Zebrafish as a model for pancreas development and function. **Bioessays**, v. 31, n. 2, p. 139-152, 2009.

KOBAYASHI, Y. T. S.; ALMEIDA, V. T.; BANDEIRA, T.; ALCÂNTARA, B. N.; SILVA, W. L. R.; SILVA, P. B.; MONTEIRO, M. V. B.; ALMEIDA, M. B. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Braz. J. Vet Res. Anim. Sci.**, v. 52, n. 1, p. 34-40, 2015.

KOVRIŽNYCH, J. A.; SOTNÍKOVÁ, R.; ZELJENKOVÁ, D.; ROLLEROVÁ, E.; SZABOVÁ, E.; WIMMEROVÁ, S. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages - comparative study. **Interdiscip Toxicol.** v. 6, n. 2, p. 67–73, 2013.

KUMAR, M. P.; SANKESHI, V.; NAIK, R. R.; THIRUPATHI, P. DAS, B. RAJU, T. N. The inhibitory effect of Isoflavones isolated from *Caesalpinia pulcherrima* on aldose reductase in STZ induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 237, p. 18–24, 2015.

LIMA, S. M. A; ARAÚJO, L. C. C; SITÔNIO, M. M; FREITAS, A. C. C; MOURA, S. L; CORREIA, M. T. S; MALTA, D. J. N; SILVA, T. G. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012 .

LEONG, W. F.; LAI, O. M.; LONG, K.; MAN, Y. B. C.; MISRAN, M.; TAN, C. P. Preparation and characteristion of week-soluble phytosterol nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 77-83, 2011.

LEWIS, G.P. 2015. *Libidibia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB109828>>.

Acessado em 25 de março de 2019.

LIU, G. D.; SHENG, Z.; WANG, Y. F.; HAN, Y. L.; ZHOU, Y.; ZHU, J. Q. Glutathione peroxidase 1 expression, malondialdehyde levels and histological alterations in liver of *Acrossocheilus fasciatus* exposed to cadmium chlorid. **Gene**, v. 578, n. 2, p. 210-218, 2016

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. v. 1, 6ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2014. 384p.

MAIDANA, M.; GONZÁLEZ, Y.; ARRÚIA, R. D. Plantas medicinais no Paraguai. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 27, n. 4, p. 214-220, 2015.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter Study of the Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in the Urban Brazilian Population Aged 30-69 Yr. **Diabetes Care**, v. 15, n. 1, p. 1509-1516, 1992.

MEDINA, J. L.; SOUTO, S.; FERREIRA, J. Diabetes e o futuro do tratamento. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 7, n. 4, p. 221-229, 2015.

MIRANDA, J. C. M. M. INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDIABÉTICA DA NANODISPERSÃO DE UMA FRAÇÃO FLAVONOÍDICA DE *Baccharis reticularia*. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá, Macapá.

MUNHOZ, A. C. M.; FRODE, T. S. Isolated Compounds from Natural Products with Potential Antidiabetic Activity - A Systematic Review. **Curr Diabetes Rev.** v. 14, n. 1, p. 36-106, 2017.

NAGALIEVSKA, M.; SABADASHKA, H.; HACHKOVA, H.; SYBIRNA, N. Galega officinalis extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018.

NAKAMURA, E. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Câncer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p.119-124, 2002.

NETO, A. S.; ROSSI, F. M. B.; AMARANTE, R. D. M.; ROSSI, M. Marcadores hepáticos, prevalência de alterações da síndrome metabólica e efeito do bypass gástrico com reconstrução em Y-de-roux em pacientes obesos mórbidos. **Einstein**, v. 9, n. 4, p. 429-435, 2011.

NETO, M. P. L.; ROSA, F. C. F.; BARBOSA, T. J. A. Monitoramento dos níveis séricos de ureia e creatinina de pacientes com diabetes mellitus em um laboratório público de Teresina-pi, **Revista Interdisciplinar**, v. 7, n. 3, p. 37-49, 2014.

NOVAES, G. H. C. F.; AURELIANO, B. C.; FRAGOSO-MOURA, E. N.; CAVALCANTE, W.; FRACÁCIO, R. Toxicidade dos metais níquel e cobre e sua possível atuação como interferentes endócrinos em ambientes aquáticos. **RBCIAMB**, v [s/v], n. 41, p. 128-141, 2018

NOZAKI, H.; HAYASHI, K. I.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; LINUMA, M.; AKAO, YUKIHIRO. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290–8292, 2007.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONOMICO. **Test Guideline 425**. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Up and Down Procedure (UDP), 2008.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONOMICO. **Test Guideline 236**. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity Test, 2013.

OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH A. **Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar**. 2ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

OLIVEIRA, J. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Composição Química das Cascas das Raízas e Flores de *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae). **Quim. Nova**, v. 39, n. 2. P. 189-193, 2016.

PEDROSO, G. L. Influencia do acesso aos próprios ovos no índice de massa corporal, no perfil lipídico, sérico e na presença de gorduranas hepatócitos de *Danio rerio*. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia) – Programa de pós graduação em Ciências em Gastroenterologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PEREIRA, L. D. P.; SILVA, R. O.; BRINGEL, P. H. D. S. F.; SILVA, K. E. S.; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 642-648, 2012.

PORTUGAL, V.; AGUIAR, A.; VASCONCELOS, F.; AROSO, S.; FONSECA, M. Alterações hepáticas em contexto de diabetes mellitus tipo I descompensada. **Revista do hospital de crianças Maria Pia**, v. 20, n. 3, p. 132-134, 2011.

PRADA, A.; BITENCOURT, A.; AMADO, J.; CRUZ, R.; CARVALHO J.; FERNANDES, C. Development na characterization of *Cassia grandis* and *Bixa orellana* nanoformulations. **Current Topics in Medical Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 1-1, 2016.

RAFACHO, A.; ROMA, L. P.; TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R.; Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can. Journal Physiol. Pharmacol.**, v. 85, p. 536-545, 2007.

RAHIMI, H. R.; MOHAMMADPOUR, A. H.; DASTANI, M.; JAAFAR, M. R.; MOBARHAN, M. G.; OSKUEE, R. K. The effect of nano-curcumin on HbA1c, fasting blood glucose, and lipid profile in diabetic subjects: a randomized clinical trial. **Journal of Phytomedicine**, v. 6, n.5, 2016.

REZENDE, K. F. O.; SANTOS, R. M.; BORGES, J. C. S.; SALVO, L. M.; SILVA, J. R. M. C. Histopathological and genotoxic effects of pollution on Nile Tilapia

(*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) in the Billings Reservoir (Brazil).

Toxicol Mech Methods, v. 24, n. 6, p. 404-411, 2014.

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, v. 1, n. [s/n], p. 49-61, 2015.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. A. R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289-294, 2009.

SANTOS, I. V. F. Estudo da toxicidade da fitopreparação popular a base de leite de janaguba (*himatanthus drasticus*, plumel 1990) em modelo de zebrafish (*danio rerio*, hamilton 1822). 2016. 117 f Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de pós graduação em ciências farmacêuticas, Fundação Universidade Federal do Amapá, Macapá.

SANTOS, A. R. F.; SOUZA, E. M.; SILVA-MANN, R. Perfis Enzimáticos de Genótipos de *Caesalpinia ferrea* var. *leyostachia* e *Cassia grandis*. **Floresta e Ambiente**, v.17, n.1, p. 37-43, 2010.

SANTOS, I. V. F.; SOUZA, G. C.; SANTANA, G. R.; DUARTE, J. L.; FERNANDES, C. P.; KEITA, H.; VELÁZQUEZ-MOYADO, J. A.; NAVARRETE, A.; FERREIRA, I. M.; CARVALHO, H. O.; CARVALHO, J. C. T. Histopathology in Zebrafish (*Danio rerio*) to Evaluate the Toxicity of Medicine: An Anti-inflammatory Phytomedicine with Janaguba Milk (*Himatanthus drasticus* Plumel), Cap 3. 2018.

SHARON, M.; NICKOLS-RICHARDSON. Nanotechnology: implications for food and nutrition professionals. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 107, n. 9, p. 1494-1497. 2007.

SILVA, C. S.; NUNES, P. O.; MESCOUTO, C. S. T.; MÜLLER, R.C. S.; PALHETA, D. C.; FERNANDES, K. G. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.3, p. 751-754, 2010.

SILVA, F. S.; ALBUQUERQUE, U. P.; COSTA JÚNIOR, L. M.; LIMA, A. S.; NASCIMENTO, A. L. B.; MONTEIRO, J. M. An ethnopharmacological assessment of the use of plants against parasitic diseases in humans and animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1332–1341, 2014.

SILVA, K. L.; MIRANDA, T. R.; CARDOSO, R. S.; BANDEIRA, M. A. M. Caracterização Farmacognóstica de Compostos Fenólicos como Marcadores Químicos nas Vagens de Jucá (*Caesalpinia Ferrea* Mart.). In: IX Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação. Fortalexa. Anais Eletrônicos... Fortaleza: Encontros Universitários da UFC 2016, 2016. 2030 p. Disponível em: <http://www.periodicos.ufc.br/eu/article/view/14614/12890>. Acessado em 15 de Outubro de 2017.

SILVA, L. C. N.; JÚNIOR, C. A. S. J.; SOUZA, R. M.; MACEDO, A. J.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2222-2228, 2011.

SCHNEIDER, A. C. R. **Alterações hepáticas causadas pelo etanol e efeito do tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG em zebrafish (*Danio rerio*)**. 2015. 141 f. Tese (Doutorado em gastroenterologia e hepatologia) – Faculdade de Medicina, Programa de pós graduação em ciencias em gastroenterologia e hepatologia, Porto Alegre.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2017-2018. São Paulo: A. C Farmacêutica, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Posicionamento Oficial SBD nº 01/2019 – CONDUTA TERAPÊUTICA NO DIABETES TIPO 2: ALGORITMO SBD 2019**. São Paulo: A. C Farmacêutica, 2019.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão

renal: um desafio laboratorial. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

SOUZA, G.C. Estudo da toxicidade da nanoemulsão de álcool perílico (NPOH) sobre zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822). 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Priograma de pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá, Macapá.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3ª ed. Instituto Plantarum, São Paulo: Nova Odessa, 2012. 768p.

TEHRANI Z., LIN S. Endocrine pancreas development in zebrafish. **Cell Cycle**, v.10, p. 3466–3472, 2011.

THIAGARAJAN, S. K.; RAMA KRISHNAN, K.; EI, T.; HUSNA SHAFIE, N.; ARAPOC, D. J.; BAHARI, H. Evaluation of the Effect of Aqueous Momordica charantia Linn. Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, n. 2, p. 1–9, 2019.

THIPKAEW, C.; WATTANATHORN, J; MUCHIMAPURA, S. Eletrospun Nanofibers Loades with Quercetin Promote the Recovery of Focal Entrapment Neuropathy in a Rat Modelo f Streptozotocin-induced Diabetes. **Biomed Research International**, v. 1, n 1, p. 1-12, 2017.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 377–381, 2001.

VASCONCELOS, C. F. B.; MARANHÃO. H. M.; BATISTA, T. M.; CARNEIRO, E. M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L. A.; SÁ, M. D.; SOUZA, T. P.; WANDERLEY, A. G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. , p.1533-1541, 2011.

VIRGENS, A. C.; CASTRO, R. L.; CRUZ, Z. M. A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida. **Natureza on line**, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

VRANIC, S.; SHIMADA, Y.; ICHIHARA, S.; KIMATA, M.; WU, W.; TANAKA, T.; BOLAND, S.; TRAN, L.; ICHIHARA, G. Toxicological Evalution of SiO₂ Nanoparticles by Zebrafish Embryo Toxicity Test. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, v. 4, p. 1-12, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Cmplications. Geneva, 1999. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66040/1/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf. Acessado em 22 de Setembro de 2017.

ZANG, L.; SHIMADA, Y.; NISHIMURA, N. Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1. p. 1-11, 2017.

ZANG, L.; MADDISON, L. A.; CHEN, W. Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. **Front Cell Dev Biol**, v. 6, p. 91, 2018.

ZENI, T. O. O uso da histopatologia por microscopia de luz em estudos com peixes dulcícolas em condições ambientais controladas. 2016. 182 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Programa de pós graduação em ciências biológicas ,Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Anexo 1

Certificado do Cômite de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 24 de abril de 2018, o parecer referente ao protocolo no. **005/2018** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DE NANODISPERSÕES DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Libidibia ferrea* EM UM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COM DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**" coordenado por **ANNA ELIZA MACIEL F. M. OLIVEIRA**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 24 April 2018, the final decision about the Protocol **005/2018** and certify that the research project entitled "**ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DE NANODISPERSÕES DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DOS FRUTOS DE *Libidibia ferrea* EM UM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COM DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**" coordinated by **ANNA ELIZA MACIEL F. M. OLIVEIRA**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 24 de abril de 2018

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
Rod. Juscelino Juscelino Kubitschek, km 02 – Campus Marco Zero,

Apêndice 1

Artigo: *Libidibia ferrea* (jucá), a
Traditional Anti-Inflammatory: A Study
of Acute Toxicity in Adult and Embryos
Zebrafish (*Danio rerio*)



Article

Libidibia ferrea (jucá), a Traditional Anti-Inflammatory: A Study of Acute Toxicity in Adult and Embryos Zebrafish (*Danio rerio*)

Diego Q. Ferreira ^{1,2}, Thamara O. Ferraz ^{1,2}, Raquel S. Araújo ^{1,2}, Rodrigo Alves Souza Cruz ^{1,2}, Caio Pinho Fernandes ^{1,2}, Gisele C. Souza ³, Brenda L. S. Ortiz ³, Rosangela S. F. R. Sarquis ³, Jemima C. M. M. Miranda ⁴, Rafael Garrett ⁵, José C. Tavares Carvalho ^{1,3} and Anna Eliza M. de Faria Mota Oliveira ^{1,2,*}

¹ Department of Biological and Health Sciences, Federal University of Amapá, Rodovia Juscelino Kubitisheck, km 02, CEP 68902 280, Macapá, Amapá, Brazil; diegomendesmauer@hotmail.com (D.Q.F.); thamara_96@hotmail.com (T.O.F.); raquel.araujo@unifap.br (R.S.A.); rodrigo@unifap.br (R.A.S.C.); caiofernandes@unifap.br (C.P.F.); farmacos@unifap.br (J.C.T.C.); anna.oliveira@unifap.br (A.E.M.F.M.O.)

² Laboratory of Phytopharmaceutical Nanobiotechnology, Department of Biological and Health Sciences, Federal University of Amapá, Rodovia Juscelino Kubitisheck, km 02, CEP 68902 280, Macapá, Amapá, Brazil.

³ Pharmaceutical Research Laboratory, Department of Biological and Health Sciences, Federal University of Amapá, Rodovia Juscelino Kubitisheck, km 02, CEP 68902 280, Macapá, Amapá, Brazil; custodio_gisele@yahoo.com.br (G.C.S.); charmed1797@gmail.com (B.L.S.O.); rosangela.sarquis.bot@gmail.com (R.S.F.R.S.);

⁴ Molecular Biology Laboratory, Department of Biological and Health Sciences, Federal University of Amapá, Rodovia Juscelino Kubitisheck, km 02, CEP 68902 280, Macapá, Amapá, Brazil; jemima@unifap.br;

⁵ Metabolomics Laboratory, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil; rafael_garrett@iq.ufrj.br;

* Correspondence: farmacos@unifap.br or anna.oliveira@unifap.br

Received: 1 October 2019; Accepted: 20 November 2019; Published: 30 November 2019

Abstract: The plant species *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea* basionym of *Caesalpinia ferrea* (Mart. ex Tul.) is used in various regions of Brazil in folk medicine in the treatment of several health problems, especially in acute and chronic inflammatory processes. Most of the preparations employed are alcoholic. Therefore, this study aimed to evaluate the acute toxicity of the hydroethanolic extract of fruits of *Libidibia ferrea* (EHEFLf) in zebrafish, emphasizing the possible changes in the organic-cellular level of the gills, liver, kidneys, and intestine and on embryos. The result obtained by LC-M/MS from EHEFLf indicated a high concentration of possible polyhydroxylated substances. EHEFLf, at a dose of 2 g/kg orally, produced non-significant alterations of the analyzed organs. However, for embryos, the treatment with different concentrations demonstrated heart toxicity that was concentration-dependent. There is no evidence of a correlation of the observed effects with the phytochemical composition, and considering the species of animal used, it can be suggested that the oral use of *L. ferrea* hydroethanolic extract has an acceptable degree of safety for use as an oral medicinal product. and embryo results have shown significant affinity to the heart; however, it is perceived to be related to the concentrations used.

Keywords: *Libidibia ferrea*; toxicity; zebrafish; histopathology; embryos

1. Introduction

Popular knowledge of traditional medicinal plants (TMPs) in the Amazon has resisted technological advancements within the pharmaceutical field mainly due to the presence of the

indigenous population. However, the lack of scientific knowledge and/or the misuse of some TMP can lead to short- and long-term toxic effects on the human organism [1].

In the Brazilian Amazon, *Libidibia ferrea* is commonly used as TMPs to treat inflammations, infections, and hyperglycemia. *L. ferrea* is a native and endemic tree species from Brazil, belonging to the Fabaceae family. It is present in several phytogeographic domains such as Caatinga, Cerrado, and the Atlantic Forest. Its distribution is registered throughout the Brazilian territory, mainly in the Brazilian Amazon and Northeast [2–4]. Popularly known as jucá or pau-ferro, *L. ferrea* is widely used in traditional medicine due to the diversity of bioactive compounds such as terpenoids and phenolic compounds present in different parts of the vegetable such as bark, fruits, seeds, leaves, and roots [5].

Several biological activities from the fruits and bark of *L. ferrea* have been reported in the literature as anti-inflammatory [6], gastric anti-ulcer [7], antidiabetic [8], healing [9], antitumor [10], anti-proliferative [11], hepatoprotective [12], antimicrobial [13], and in vitro leishmanicidal [14]. However, despite the widespread use of popular alcoholic preparations and pharmaceutical dispensing of products with derivatives of this plant species, few studies have reported the safety of these products [15–17], especially in an alternative model such as zebrafish. Therefore, this study evaluated the action of oral EHEFLf on adults and embryos *Danio rerio* (zebrafish), emphasizing histopathological aspects and morphofunctional changes.

2. Results

The negative-ESI Liquid Chromatography-High Resolution Tandem Mass Spectrometry (LC-HRMS/MS) analysis of EHEFLf revealed the presence of phenolic and sugar compounds (Table 1). Their identification was performed by comparing their high accurate m/z ions with a mass error below 5 ppm and MS/MS fragmentation pattern to those available in the literature (Mass Bank of North America-MoNA; <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>). Compounds of retention time (Rt) 2.1 and 4.0 were not identified, but it would be possible to assign a molecular formula of $C_{21}H_{10}O_{13}$ and $C_9H_{10}O_5$, respectively (Figure 1).

Table 1. Identification of the constituents of the hydroethanolic extract of the fruits of *Libidibia ferrea* (EHEFLf) by LC-HRMS/MS.

RT (min)	[M-H] [−]	Molecular Formula	Error (ppm)	MS/MS	Substance
0.89	169.01340	C ₇ H ₆ O ₅	5.0	125.02324	Gallic acid
				271.04614	
				241.03496	
0.81	331.06729	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	0.7	211.02391	Galloyl-glucose Ester
				169.01331	
				125.02332	
				313.05731	
0.86	345.08279	C ₁₄ H ₁₈ O ₁₀	0.2	169.01337	Gallic acid methoxy glycoside
				125.02334	
				161.04422	
0.73	179.05540	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.9	131.03365	Hexose
				113.02316	
				95.01269	
				331.0679	
				313.0551	
1.15	483.07861	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	1.2	271.0466	di-O-galloyl-d-hexose
				211.0238	
				169.0135	
				463.0479	
1.94	633.07385	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	0.8	300.997	Corilagin
				425.01523	
2.1	469.00504	C ₂₁ H ₁₀ O ₁₃	0.4	299.99118	Unknown
				169.01332	
3.98	197.04486	C ₉ H ₁₀ O ₅	3.5		Unknown

				152.89384	
4.68	300.99905	C ₁₄ H ₆ O ₈	0.2	-	Ellagic Acid
6.25	449.10938	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	1.1	287.055 151.002	Eriodictyol-O-hexoside
6.32	433.11426	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	0.6	271.0593	Naringenin-O-hexoside

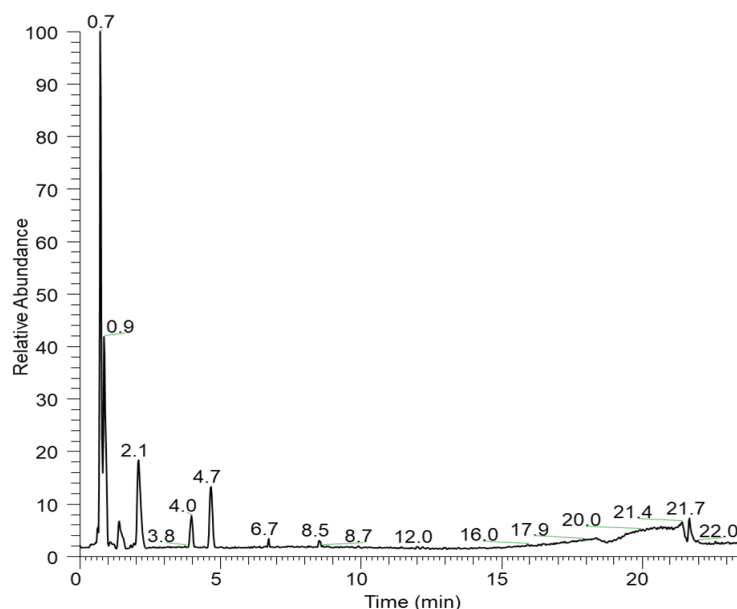


Figure 1. Base peak chromatogram of the hydroethanolic extract of fruits of *Libidibia ferrea* (EHEFLf) by Liquid Chromatography-High Resolution Tandem Mass Spectrometry (LC-HRMS/MS).

The compound of Rt 4.7 presented high abundance in the chromatogram and was tentatively identified as ellagic acid. Previous work in the literature has described the presence of lipids, phenolic substances, and sugars in *L. ferrea* [18]. The compound of Rt 4.7 presented high abundance in the chromatogram and was tentatively identified as ellagic acid.

In the assessment of acute toxicity in adult zebrafish, no behavior-related changes were observed at 48 h of observation in either the EHEFLf-treated or the 1% propylene glycol-treated control group. Regarding the histopathological analysis performed in different tissues, it is possible to describe, in general, that in the gills and intestine, the treatment produced slight alterations. However, in the kidneys and liver, significant alterations were found when compared to the propylene glycol 1% (control group), which indicates that the phytochemical markers present in EHEFLf were highly metabolized, influencing the cellular structure of these organs (Figure 2).

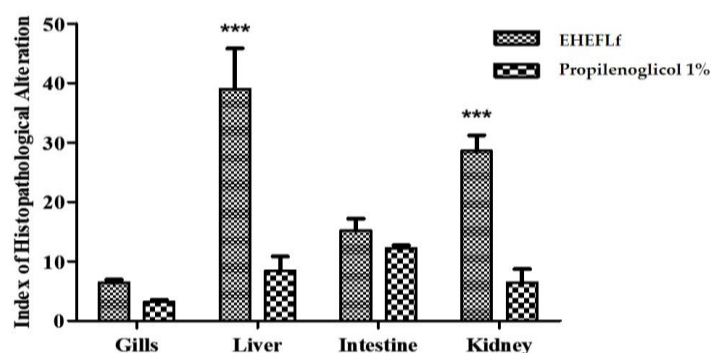


Figure 2. Histopathological alteration index (HAI) of *D. rerio* gills, liver, intestine, and kidneys, after 48 h of EHEFLf or propylene glycol oral administration at a dose of 2 g/kg.

At the gill level, it was observed that all findings fit the level I alteration, obtaining an average HAI of 6.4 ± 0.5 and 3.2 ± 0.3 for EHEFLf and the control group, respectively, indicating mild alteration (Table 2 and Figure 3).

Table 2. Distribution of the histopathological changes in *D. rerio* gills through the histopathological alteration index (HAI) described in levels.

Organ	Test Substance	Animal	Histological Changes		
Gill	EHEFLf		Level I	Level II	Level III
		01	7	0	0
		02	5	0	0
		03	6	0	0
		04	8	0	0
		05	6	0	0
Classification:	Normal	Mean: 6.4 ± 0.5			
Gill	(Control - vehicle)		Level I	Level II	Level III
		01	3	0	0
		02	3	0	0
		03	2	1	0
		04	3	0	0
		05	0	0	0
Classification:	Normal	Mean: 3.2 ± 0.3			

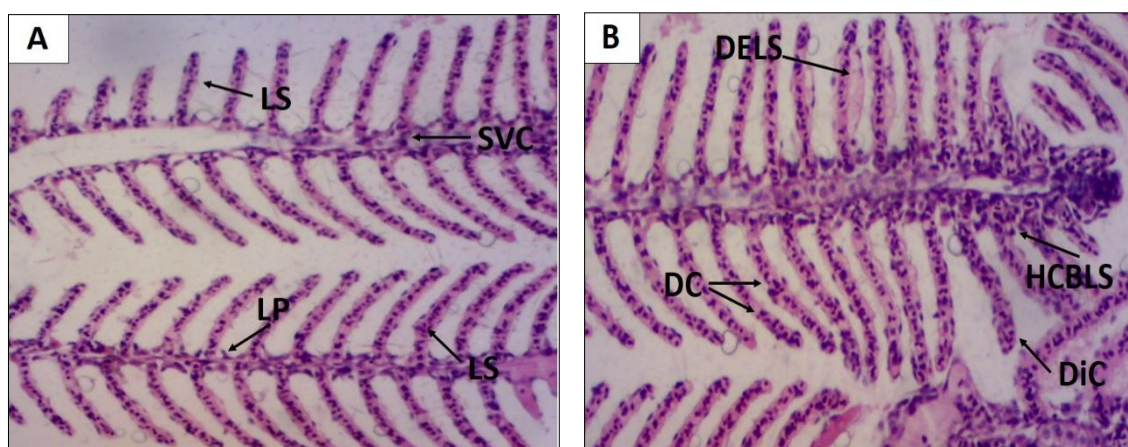


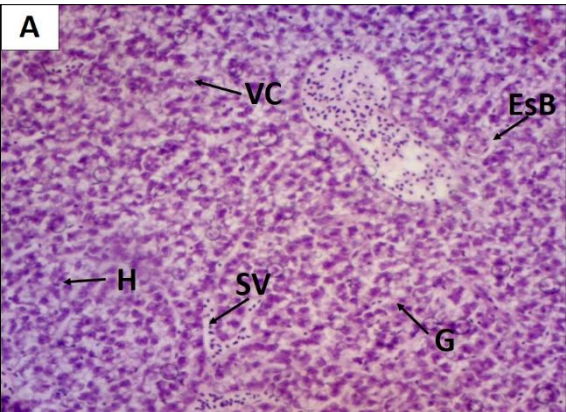
Figure 3. Histological alterations of *D. rerio* gills after oral treatment with 2 g/kg EHEFLf (A) and propylene glycol 1% (B). Gill filament of an animal treated with EHEFLf, where secondary lamellae (LS), primary lamellae (LP), and central venous sinus (SVC) were observed (A); gill filament of a vehicle-treated animal, where dislocation or elevation of secondary lamellae (DELS), capillary derangement (DC), capillary dilation (DiC), and epithelial cell hyperplasia at the base of secondary lamellae (HCBLS) were observed (B).

Concerning the liver, the treatment with EHEFLf produced levels I and II HAI, showing no significant difference when compared to the control group that presented level I HAI (Table 3 and Figure 4).

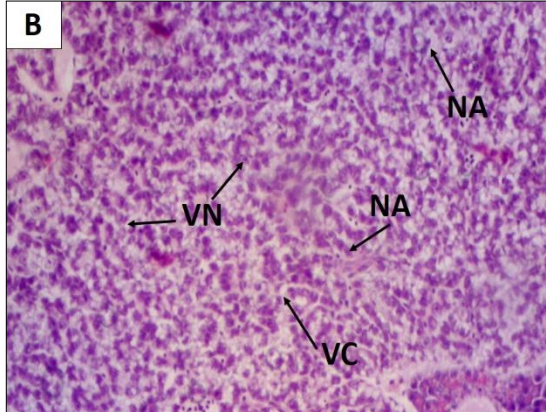
Table 3. Distribution of the histopathological changes in *D. rerio* liver through the histopathological alteration index (HAI) described in levels.

Organ	Test Substance	Animal	Histological Changes		
			Level I	Level II	Level III
Liver	EHEFLF	01	5	3	0
		02	7	4	0
		03	7	5	0
		04	6	1	0

		05	10	3	0
Classification:		Moderate to severe			Mean: 39.0 ± 6.8
			Level I	Level II	Level III
Liver	(Vehicle-control)	01	3	0	0
		02	8	1	0
		03	2	1	0
		04	2	0	0
		05	3	1	0
Classification:		Normal			Mean: 8.4 ± 2.4



A



B

Figure 4. Histological changes of the *D. rerio* liver after oral treatment with 2 g/kg of EHEFLf (A) and propylene glycol 1% (B). Liver of an animal treated with EHEFLf, where hepatocytes (H), venous sinusoids (SV), glycogen (G), cytoplasmic vacuolization (VC), and biliary stagnation (EsB) were observed (A); liver of animal treated with vehicle where nuclear vacuolization (VN), cytoplasmic vacuolization (VC), and nuclear atrophy (NA) were observed (B).

Regarding the EHEFLf group, the histopathological findings of the intestine observed an HAI that fit levels I and II, classified as mild to moderate alterations, with a mean of 15.2 ± 2.0 ; a similar fact was observed for the control group with levels I and II HAI, and a mean of 12.2 ± 0.5 (Table 4 and Figure 5).

Table 4. Distribution of the histopathological changes in *D. rerio* intestine through the histopathological alteration index (HAI) described in levels.

Organ	Test Substance	Animal	Histological Changes		
			Level I	Level II	Level III
Intestine	EHOLF	01	8	0	0
		02	8	1	0
		03	9	1	0
		04	4	1	0
		05	7	1	0
Classification:	Mild to moderate		Mean: 15.2 ± 2.0		
			Level I	Level II	Level III
Intestine	(Vehicle-control)	01	1	1	0
		02	3	1	0
		03	3	1	0
		04	1	1	0
		05	3	1	0
Classification:	Normal		Mean: 12.2 ± 0.5		

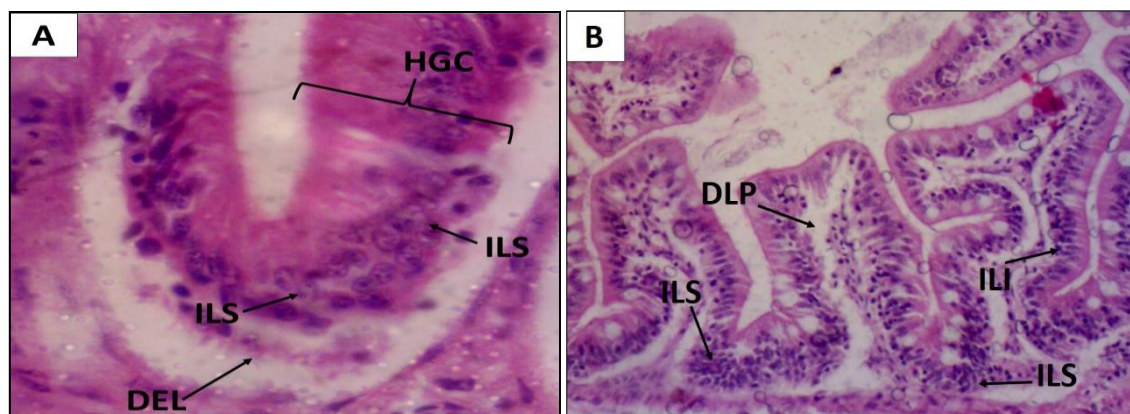


Figure 5. Histological changes of the *D. rerio* intestine after oral treatment with 2 g/kg of EHEFLf (A) and propylene glycol 1% (B). Intestine of an EHEFLf-treated animal where stromal lymphocytic infiltration (SLI), distal of the epithelial lining of the intestinal apex (DEL), leukocyte infiltration (ILI), and goblet cell hyperplasia (HGC) were observed (A); intestine of animal treated with vehicle-control, where stromal lymphocytic infiltration (ILS), lamina propria detachment (DLP), and leukocyte infiltration (ILI) were observed (B).

Oral EHEFLf treatment produced histopathological alterations with HAI with an average of 28.6 ± 2.6 that fit the level I and II alterations, classified as moderate to severe alterations, with an emphasis on changes in the glomerulus and tubular level. Already, the control group treated with propylene glycol 1%, presented histopathological alterations that fit the alterations of levels I and II, classified as normal, with a HAI of 6.4 ± 2.3 (Table 5 and Figure 6), without alterations to the glomerular level and Bowman capsule.

Table 5. Distribution of the histological changes in *D. rerio* kidneys by HAI according to the level of changes.

Organ	Test Substance	Animal	Histological Changes		
			Level I	Level II	Level III
Kidneys	EHFLF	01	8	0	0
		02	8	1	0
		03	9	1	0
		04	4	1	0
		05	7	1	0
Classification:	Moderate to severe	Mean: 28.6 ± 2.6			
			Level I	Level II	Level III
Kidneys	(Vehicle-control)	01	2	0	0
		02	2	1	0
		03	3	0	0
		04	2	0	0
		05	2	1	0
Classification:	Normal	Mean: 6.4 ± 2.3			

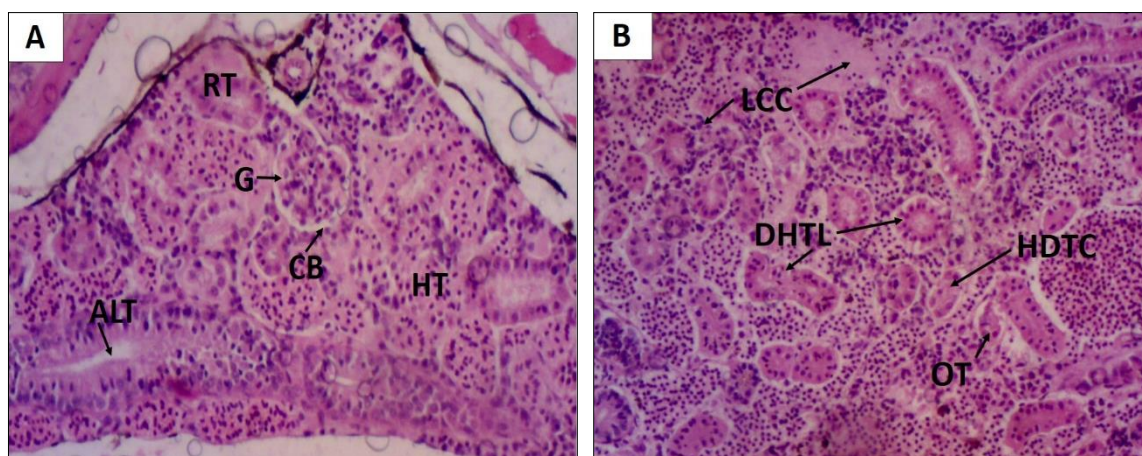


Figure 6. Histological changes of the *D. rerio* kidney after oral treatment with 2 g/kg of EHEFLf (A) and propylene glycol 1% (B). (A) Kidney of an EHEFLf-treated animal where renal tubules (RT), hematopoietic tissue (HT), glomerulus (G), Bowman capsule (CB), and tubular lumen enlargement (ALT) were observed; (B) kidney of animal treated with the vehicle-control where loss of the cellular contour (LCC), cytoplasmic tubular cell degeneration (CDTC), mild tubular hyaline degeneration (DHTL), and tubular obstruction (OT) were observed.

Regarding the effects of EHEFLf on embryos, there have been no previous reports, so the teratogenic alterations and lethal effect (coagulation and absence of cardiofetal beats) presented by the embryos upon contact with solutions containing EHEFLf were evaluated. It was observed that 1% propylene glycol solution and EHEFLf concentrations of 25, 50, and 125 mg/L had a lethal effect on embryos of 26.6%, 30%, 33.3%, and 10%, respectively (Table 6). All solutions showed no morphological/teratogenic changes on survival embryos, except for EHEFLf at 250 and 500 mg/L, which demonstrated cardiac edema, yolk sac edema, and scoliosis (Table 6 and Figure 7).

Table 6. Overview of teratogenic and morphological effects caused by EHEFLf concentrations (25, 50, 125, 250, and 500 mg/L) in the *D. rerio* embryos at 96 hpf.

Teratogenic Changes	Propyleneglycol 1%	mg/L					Σ_t	%
		25	50	125	250	500		
Cardiac edema	0	0	0	0	0	20	20	11.1
Scoliosis	0	0	0	0	10	0	10	5.5
Yolk sac edema	0	0	0	0	5	21	26	14.4
Growth retardation	0	0	0	0	0	0	0	0
Lethal embryos	8	9	10	3	4	3	n/a	n/a
Σ Teratogenic embryos	0	0	0	0	15	21	36	n/a
% Teratogenic embryos	0	0	0	0	50	70	n/a	n/a
% Lethal embryos	26.6	30	33.3	10	13.3	10	n/a	n/a

n/a = not applicable.

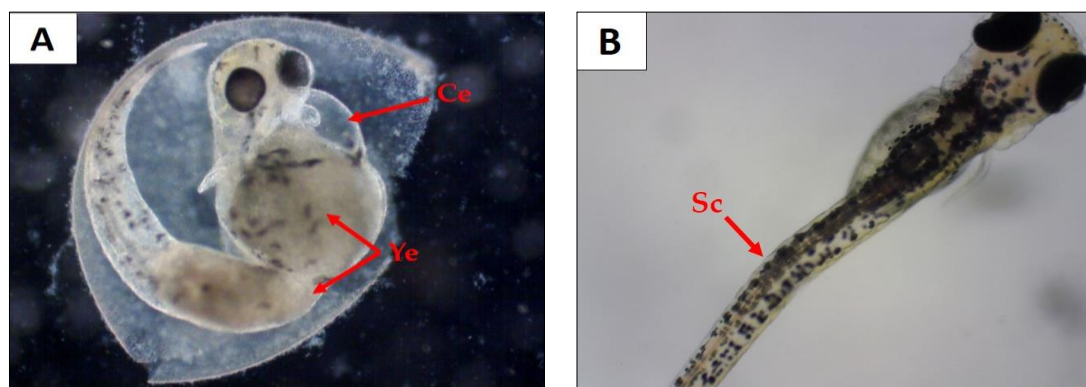


Figure 7. Teratogenic effects on *D. rerio* 96 hpf embryo. (A) Embryo treated at a concentration of 500 mg/L, where cardiac edema (Ce) and yolk edema (Ye) were observed; (B) embryo treated at a concentration of 250 mg/L, where scoliosis (Sc) was observed.

The use in folk medicine of the species *Libidibia ferrea* in Brazil is of great significance, being that the bark, fruits, and leaves of this species are used in alcoholic and non-alcoholic preparations. In this study, we explored the fruit extract, which is widely used in folk medicine for asthma and various inflammatory states [6,19]. This activity can be due to the presence of bioactive compounds in the plant. The phytochemical composition of *L. ferrea* is poorly explored when compared to the biological effects of this plant [6,20]. Carvalho et al. [6] demonstrated the anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *L. ferrea* fruits administered orally at a dose of 300 mg/kg in Wistar rats, by inhibiting the induced hind paw edema. Lima et al. [20] were able to demonstrate the inflammatory inhibition reactions and pain in Swiss albino mice by using the ethanolic extract of the fruits of *L. ferrea*, probably due to a reduction in vascular permeability. Pereira et al. [21] isolated three major polysaccharide fractions (FI, FII, FIII) of *L. ferrea* by chromatography of TPL (with a 2.8% yield), to which they attributed the anti-inflammatory effect.

The chemical composition results of *L. ferrea* obtained in this work are in agreement with previous studies, since Sampaio et al. [13] detected polyphenols in fruit extracts at 7.3% and H1 NMR analysis revealed hydroxy phenols and methoxylated compounds. Nakamura et al. [10] identified gallic acid and methyl gallate as active constituents from *L. ferrea* fruits. Ueda et al. [8] identified ellagic acid as a major compound from the fruit extract, which was elucidated as 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid. Gallic and ellagic acid are polyphenols and are considered to be the main phytochemical components of *L. ferrea* fruits acting in the signaling pathway of pain, inflammation, and oxidative stress [22]. Araújo et al. [23] revealed in HPLC analysis the considerable presence of phenolic compounds: condensed tannins (catechins) and hydrolysable tannins (gallic acid), as well as demonstrating strong anti-inflammatory activity. Ferreira et al. [24] investigated the phenolic variability in the fruit of *L. ferrea* by ultraviolet/visible and chromatographic methods. They demonstrated that the polyphenolic content ranged from 13.99 to 37.86 g%, expressed as ellagic acid, or from 10.75 to 29.09 g%, expressed as ellagic acid by UV/VIS. The contents of ellagic and gallic acid determined by the liquid chromatography-reversed phase method ranged from 0.57 to 2.68 g% and from 0.54 to 3.23 g%, respectively.

Regarding toxicity, the toxicity of *L. ferrea* fruits [15–17,24] in mice or rat experimental models following OECD recommendations using a single dose, has been reported in the literature. However, some studies did not show the animal mortality, their behavior, or the histopathology as we have performed here for the first time with the alternative model, *D. rerio* (zebrafish). Therefore, this study is of great importance to study the safety of this species, as studies in zebrafish are currently considered by government agencies for the registration of new drugs.

It is important to consider the histopathological changes produced by drugs at the level of the fish gills in an attempt to expel the toxic/stressful substance, as they may hyperventilate, increasing the opercular movement, and consequently overloading the gill tissue, causing damage. Therefore, these alterations may indicate an injury to other organs directly related to drug metabolism such as

the liver and kidneys [25,26]. The oral dose of 2 g/kg of EHEFLf produced no significant histopathological changes in the gills.

The liver is the organ responsible for some essential functions in the organism, and alterations in this organ may indicate damage related to metabolism, biotransformation, and excretion of certain substances [27,28]. Once liver damage is established, the homeostasis of the organism as a whole can be affected by interfering with some of the organ's basic functions such as the synthesis and biotransformation of molecules [29]. Therefore, liver histology is an important biomarker for evaluating the effects of xenobiotics [30]. One of the histopathological findings when analyzing the group treated with EHEFLf was cytoplasmic vacuolization, a fact that was also shown in the study by Gayão et al. [31], who attributed this phenomenon to the possible accumulation of lipids, thus impairing liver metabolism.

The kidneys are of great importance for the metabolism of drugs in the human body, since they play a fundamental role in their elimination as well as their metabolites, and can directly influence the half-life of these substances in the body. In animal species, the kidneys play a major role in the control of homeostasis, and urine is the main biological fluid responsible for the excretion of the vast majority of drugs. This process of elimination can take place in three ways: glomerular filtration, active tubular secretion, and passive tubular reabsorption [32,33]. Luminal structural alteration in the kidneys such as tubular lumen enlargement, may be related to hyperchromasia, eosinophilia, and cellular apoptosis, which may lead to loss of renal function and consequently disordered proliferation of tubular cells as a compensatory mechanism to repair loss, possibly caused by a toxic factor [34,35]. In this context, lesions related to the renal lumen structure may be directly related to the progression to necrosis of these cells [36]. Changes related to the increase and decrease of Bowman's capsule may impair glomerular filtration levels [36,37]. In addition to filtration, this type of alteration can also impair excretion rates, thus leading to excessive glomerulus production, which is not normal in this species [36]. Studies conducted by Souza [17] using a dose of 2 g/kg orally with an aqueous extract of *L. ferrea* fruits revealed liver and kidney changes similar to those found in this study.

Pickler et al. [38] studied a hydroalcoholic extract of bark and seed of *L. ferrea* that had a phytochemical marker of ellagic acid, and at a dose of 1 g/kg orally, concluded that extracts of *L. ferrea* do not exhibit safety levels compatible with being used in the gestational period.

A study by Falcão et al. [39], with a hydroethanolic extract from *L. ferrea* fruits, detected the presence of gallic acid and ellagic acid and confirmed the anti-inflammatory, antioxidant, and antinociceptive activities in vivo and enhanced cell viability in vitro.

It is important to highlight the possible relationship between the tissue-cellular alterations found in this study and the phytochemical composition of the EHEFLf. Despite the fact that phenolic compounds have great prominence producing antioxidant and anti-inflammatory effect, these compounds depend on complex metabolism requiring extensive hepatic and renal activity, which may result in visible, reversible tissue damage depending on the time of use [34]. However, it should be considered that in this study, the maximum dose of 2 g/kg, which did not produce mortality in zebrafish, and was previously used by Souza [17] in a study of dyslipidemia and subchronic toxicity.

Souza et al. [40] also used the absence of beating and egg coagulation as a parameter to account for the lethal effect on embryos, and evidenced cardiac edema, yolk sac edema, yolk edema, tail deformation, and scoliosis as teratogenic alterations in their study. Bittencourt et al. [41] related future cardiovascular problems with teratogenic changes in the heart of embryos, which was similar in this study when increasing the dose of EHEFLf. Sun et al. [42], when studying the toxic effects of butyl benzyl phthalate on embryos, also showed the same teratogenic alterations, but mainly emphasized the cardiac ones, showing that the toxic effects can genetically influence cardiac alterations in this model.

3. Materials and Methods

3.1. Botanical Material

The botanical material, consisting of the aerial part with fruits of *Libidibia ferrea*, was collected in the municipality of Macapá, Amapá, Brazil, in the Medicinal Plants garden of the Institute of Scientific and Technological Research of Amapá-IEPA, under the geographic coordinates N00°02'49.4" and W51.03'40.5".

The identification of plant material was performed by a comparison with exsiccates deposited in a regional herbarium by botanist Dra. Rosângela do Socorro F. R. Sarquis. Samples of the species were deposited in the IAN Herbarium of Embrapa Eastern Amazon under the registration number 195949.

3.2. Obtaining EHEFLf

The collected *L. ferrea* fruits were placed in trays and submitted to oven drying, with the controlled temperature at $40 \pm 2^\circ\text{C}$, for four days. After drying, the resulting material was manually cracked and ground in a knife mill and subjected to extraction by the 96% (v/v) ethanol percolation technique, with solvent renewal after 24, 12, and 6 h. In the first cycle, 1.25 L of solvent (96% ethanol) was added and 0.5 L in the second. After this period, the extract was concentrated in a rotary evaporator (Fisatom, Brazil) at 45°C and then placed under ventilation (48 h) to remove excess solvent. At the end of the process, the extract was lyophilized (Marconi Freeze Dryer, Brazil) and stored tightly closed under refrigeration.

3.3. EHEFLf Analysis by Liquid Chromatography-High Resolution Tandem Mass Spectrometry (LC-HRMS/MS)

EHEFLf was analyzed by LC-HRMS/MS using a Dionex UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific, Bremen, Germany) coupled to a high-resolution QExactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source operating in negative ion mode. Source ionization parameters were a spray voltage of 3.6 kV; capillary temperature of 300°C ; S-Lens RF level 50, sheath and auxiliary gases 45 and 15 (arbitrary units), respectively. Samples were analyzed in the scan range of m/z 150 to 1000 at a resolution of 35,000 followed by data-dependent MS2 (ddMS2 experiments) using a resolution of 17,500 and normalized collision energy (NCE) stepped 15–35%. The column used was an ACE 3 C18 (150 mm $\times$ 2.1 mm $\times$ 3.0 μm) maintained at 40°C . The mobile phase consisted of (A) 0.1 % formic acid and (B) acetonitrile in gradient elution mode (0–1 min, 10% B; 1–16 min, 95% B; 16–19 min, 95% B; 19.1–24 min, 10% B) at a flow rate of $350 \mu\text{L min}^{-1}$. Compound identification was performed comparing the m/z ions with a mass error below 5 ppm and their MS/MS spectra to those available at the MassBank of North America (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>) and in the literature.

3.4. Acute Toxicity Study in Zebrafish

3.4.1. Animals

The animals used (*Danio rerio*) were from Aqua New Aquarius e Pisces Ltda. (PE, Brazil), male and female, of wild AB strain. They were stored in aquariums at the Zebrafish Platform of the Pharmaceuticals Research Laboratory of the Federal University of Amapá–UNIFAP, underwent an adaptation period (40 days), and were kept in temperature-controlled shelves ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) following a 12 h light/dark cycle (light period from 7:00 am to 7:00 pm), and received flake commercial feed (Alcon Colors, Santa Catarina, Brazil) twice a day.

This study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Amapá (Brazil) under registration number 005/2018.

3.4.2. Adult Zebrafish Study

The assessment of acute toxicity in adult zebrafish was established from an adaptation based on the guidelines described by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)

425 OECD [43]. The toxicity test consisted of two steps: 2 g/kg oral limit test following the technique described by Borges et al. [26].

The initial test consisted of the administration of 2 g/kg of EHEFLf orally to a single animal. If the death occurred within 48 h, the main test was started. If it remained alive, the limit test was started. In the limit test, four animals were treated with 2 g/kg EHEFLf, so that the total number of animals tested was five (counting the test dose animal). Within 48 h, deaths were observed. In the presence of three or more deaths, the main test was started, otherwise, with three or more live animals, the tested EHEFLf is considered highly safe and the LD50 cannot be calculated.

3.4.3. Behavioral Assessment

Behavior assessment followed the methodology described by Souza et al. [36], and the most intense human observation occurred in the first four hours, with observations every 30 min in the first four hours and thereafter every 12 h. The following parameters were recorded (Table 7).

Table 7. Behavioral alterations of *Danio rerio*.

Stages	Behavioral Changes
I	• Increased swimming activity; • Spasms; • Tail axis tremors
II	• Circular swimming; • Loss of posture.
III	• Loss of motility; • Deposition at the bottom of the aquarium; • Death

3.4.4. Study on Zebrafish Embryos

Embryotoxicity testing followed the recommendations of OECD 236 [44]. Two male and one female animals were kept in a breeding aquarium, separated by a partition, which was removed when the ambient lights were turned on so that eggs could be fertilized.

To avoid variants of the genetic type, it was decided to collect eggs from at least three groups, after washing with water from the aquarium where the parent fish were acclimatized, and the eggs were randomized and randomly selected, following the methodology described by Yang et al. [45]. Then, 30 eggs were transferred to each petri dish with dilutions of the EHEFLf-containing solutions and then one egg at a time was removed and placed in a pre-prepared 96-well plate containing 250 µl in each well of the following EHEFLf concentrations: 25, 50, 75, 125, 250, and 500 mg/L, in addition, to controls in water and 1% propylene glycol solution (vehicle) and subsequently incubated in the greenhouse (SOLAB SL-102/630, Brazil) at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ up to 96 h after fertilization (hpf).

3.4.5. Histopathological Study

The histopathological study was based on the techniques described by Souza et al. [46]. Gills, kidneys, liver, and intestines were evaluated. Euthanasia of the animals was performed following the methodology described by Favoretto et al. [47]. The material was stained according to the protocol of Souza et al. [36], and was stained with Harris Hematoxylin (Laborclin, Sinop, Mato Grosso, Brazil) and yellowish eosin (Inlab, Brazil). The histological slides were analyzed by an Olympus optical microscope (BX41-micronal, Brazil) and photographed with an MDCE-5C USB 2.0 (digital) camera.

The histopathological alterations index (HAI) was established from the alterations found in the gills, liver, kidneys, and intestine. After the calculation, it was classified as stage I, II, and III according to the alterations presented, being classified as: normal (0 to 10), moderately altered (11 to 20), moderate to severe (21 to 50), or severe irreversible (>100) [34,48–50]. The indices were calculated according to the following formula:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^{na} a_i + 10 \sum_{i=1}^{nb} b_i + 10^2 \sum_{i=1}^{nc} c_i}{N} \quad (1)$$

where

a = first stage;

b = second stage;

c = third stage;

na = total number of changes considered to be first stage;

nb = total number of changes considered to be second stage;

nc = total number of changes considered to be third stage; and

N = number of fish analyzed per treatment.

3.4.6. Statistical Analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation of the mean and for the statistical analysis, we used analysis of variance, ANOVA, followed by the Tukey test. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

4. Conclusions

From the results obtained in this study, it can be suggested that EHEFLf has an acceptable degree of safety for use as an oral medicinal product since an overestimated dose was used and changes in tissue-cellular level were considered, which was dose-dependent, even based on comparative terms with other studies. The results on embryos showed a significant heart toxicity, however, it was noticed that this was dependent on the EHEFLf concentration employed. Therefore, considering the species of animals already used in the experiment, it can be suggested that the oral use of the *L. ferrea* fruit product is safe.

Author Contributions: R.S.F.R.S. and D.Q.F. carried out an identification of plant material; C.P.F. and D.Q.F. collaborated in obtaining the plant extract; R.G. and R.A.S.C. were responsible for the analysis by high resolution liquid chromatography in tandem mass spectrometry; B.L.S.O., J.C.M.M.M., T.O.F. and D.Q.F. collaborated on the Zebrafish Acute Toxicity Study; G.C.S and D.Q.F. performed the Histopathological Study; D.Q.F. and R.S.A. carried out the research regarding the preparation of the extract, biological and histopathological evaluation in zebrafish. B.L.S.O. and D.Q.F. participated in the analysis and interpretation of the data. J.C.T.C wrote the manuscript and A.E.M.F.M.O. coordinated the research. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: CAPES (no. 88887.200554/2018-00 PROCAD-AMAZONIA) and CNPq (Proc. 402332/2013-0).

Acknowledgments: The authors are grateful to the financial support provided Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vásquez, S.P.F.; Mendonça, M.S.; Noda, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas. *Acta Amaz.* **2014**, *44*, 457–472.
2. Lorenzi, H. *Ávores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, 6ª ed.; Iphis Gráfica e Editora: São Paulo, Brasil, 2014; pp. 135–136.
3. Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em Construção. Available online: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB109828> (accessed on 26 September 2019).
4. USDA. Serviço de Pesquisa Agrícola, Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal. 2019. Rede de Informações sobre Recursos de Germoplasma (GRIN-Taxonomia). Available online: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=465144> (accessed on 26 September 2019).
5. Cavalheiro, M.G.; Farias, D.F.; Fernandes, G.S.; Nunes, E.P.; Cavalcanti, F.S.; Vasconcelos, I.M.; Melo, V.M.M.; Carvalho, A.F.U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosa. *Rev. Bras. Farmagn.* **2009**, *19*, 586–591.

6. Carvalho, J.C.T.; Teixeira, J.R.M.; Souza, P.J.C.; Bastos, J.K.; Filho, D.S.; Santos, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *53*, 175–178.
7. Bachi, E.M.; Sertie, J.A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. *Planta Med.* **1994**, *60*, 118–120.
8. Ueda, H.; Tachibana, Y.; Moriyasu, M.; Kawanishi, K.; Alves, S.M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. *Phytomedicine* **2001**, *5*, 377–381.
9. Oliveira, A.F.; Batista, J.S.; Paiva, E.S.; Silva, A.E.; Farias, Y.J.M.D.; Damasceno, C.A.R.; Brito, P.D.; Queiroz, S.A.C.; Rodrigues, C.M.F.; Freitas, C.I.A. Avaliacao da atividade cicatrizante do juca (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Rev. Bras. Plantas Med.* **2010**, *12*, 302–310.
10. Nakamura, E.S.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Mukainaka, T.; Okuda, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Junior, F.P. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Lett.* **2002**, *177*, 119–124.
11. Guerra, A.C.V.A.; Soares, L.A.L.; Ferreira, M.R.A.; Araújo, A.A.; Rocha, H.A.O.R.; Medeiros, J.S.; Cavalcante, R.S.C.; Júnior, R.F.A. *Libidibia ferrea* presents antiproliferative, apoptotic and antioxidant effects in a colorectal cancer cell line. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *92*, 696–706.
12. Barros, A.L.; Souza, R.S.; Aranha, E.S.P.; Costa, L.M.; De Souza, T.P.; Vasconcellos, M.C. Antioxidant and hepatoprotective activities of *Libidibia ferrea* bark and fruits extracts. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 71–76.
13. Sampaio, F.C.; Pereira, M.S.V.; Dias, C.S.; Costa, V.C.O.; Conde, N.C.O.; Buzalaf, M.A.R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *124*, 289–294.
14. Comandolli-Wyrepkowski, C.D.; Jensen, B.B.; Grafova, I.; Santos, P.A.; Barros, A.M.C.; Soares, F.V.; Barcellos, J.F.M.; Silva, A.F.; Grafov, A.; Franco, A.M.R. Atividade antileishmanial de extratos de *Libidibia ferrea*: Desenvolvimento de testes in vitro e in vivo. *Acta Amaz.* **2017**, *47*, 331–340.
15. Kobayashi, Y.T.S.; Almeida, V.T.; Bandeira, T.; Alcântara, B.N.; Silva, W.L.R.; Silva, P.B.; Monteiro, M.V.B.; Almeida, M.B. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. *Braz. J. Vet. Res.* **2015**, *52*, 34–40.
16. Reboredo, M.M.; Lucinda, L.M.F.; Rocha, C.M.; Queiroz, G.T.; Faria, V.C.; Vieira, V.A.; Sá, R.C.S.; Carvalho, J.C.T. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. *Bol. Cent. Biol. Reprod.* **2007**, *26*, 11–17.
17. Souza, C.S.V. Avaliação da Atividade Antiobesidade do Extrato Aquoso dos Frutos de *Libidibia Ferrea* (Mart.) L.P. Queiroz em Ratos Wistar. 89f. Master's Thesis, Programa de Pós Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2017.
18. Ferreira, M.R.A.; Soares, L.A.L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. *J. Med. Plants Res.* **2015**, *9*, 140–150.
19. Costa, L.M.; Simplicio, F.G.; Souza, T.P. *Libidibia ferrea* (março. extul) lp queiroz var. *ferrea*: Farmacológico, aspecto fitoquímico e botânicos. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *7*, 48–53.
20. Lima, S.M.A.; Araújo, L.C.C.; Sitônio, M.M.; Freitas, A.C.C.; Moura, S.L.; Correia, M.T.S.; Malta, D.J.N.; Silva, T.G. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, *22*, 169–175.
21. Pereira, L.P.; Silva, R.O.; Bringel, P.H.; Silva, K.E.; Assreuv, A.M.; Pereira, M.G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139*, 642–648.
22. Falcão, T.R.; Araújo, A.A.; Soares, L.A.L.; Farias, I.B.; Silva, W.A.V.; Ferreira, M.R.A.; Araújo, R.F., Jr.; Medeiros, J.S.; Lopes, M.L.D.S.; Guerra, G.C.B. *Libidibia ferrea* Crude Extract and Fractions Show Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antinociceptive Effect in Vivo and Increase Cell Viability in Vitro. *Evid. - Based Complement. Altern. Med.* **2019**, *2019*, 1–14.
23. Araújo, A.A.; Soares, L.A.L.; Ferreira, M.R.A.; Souza Neto, M.A.; Silva, G.R.; Araújo, R.F., Jr.; Guerra, G.C.B.; Melo, M.C.N. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *156*, 88–96.
24. Ferreira, M.R.A.; Fernandes, M.T.M.; Silva, W.A.V.; Bezerra, I.C.F.; Souza, T.P.; Pimentel, M.F.; Soares, L.A.L. Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of *Libidibia ferrea* Martius. *Pharmacogn. Mag.* **2016**, *12*, 285–291.

25. Castro, J.S.; França, C.L.; Fernandes, J.F.F.; Silva, J.S.; Carvalho-Neta, R.N.F.; Teixeira, E.G. Biomarcadores histológicos em brânquias de *Sciades herzbergii* (Siluriformes, Ariidae) capturados no complexo Estuarino de São Marcos, Maranhão. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2018**, *70*, 410–418.
26. Borges, R.S. Estudo da Atividade Anti-inflamatória de Nanoemulsões a Base do óleo Essencial de *Rosmarinus Officinalis* L. 215f. PhD Thesis, Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amapá, Macapá, Brasil, 2019.
27. Honorato, C.A.; Cruz, C.; Carneiro, D.J.; Machado, M.R.F.; Nascimento, C.A.; Saturnino, K.S. Histologia do Liver de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado. *Pesqui. Vet. Bras.* **2014**, *34*, 64–68.
28. Novaes, G.H.C.F.; Aureliano, B.C.; Fragoso-Moura, E.N.; Cavalcante, W.; Fracácio, R. Toxicidade dos metais níquel e cobre e sua possível atuação como interferentes endócrinos em ambientes aquáticos. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais* **2018**, *48*, 128–141.
29. Alkmin, G.D. Toxicidade de Cádmio e Zinco em *Danio rerio*: Comparação entre valores permitidos em legislação para proteção da vida aquática e a potencial atuação como interferentes endócrinos, 100f. Master's Thesis, Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, Brasil, 2016.
30. Liu, G.D.; Sheng, Z.; Wang, Y.F.; Han, Y.L.; Zhou, Y.; Zhu, J.Q. Glutathione peroxidase 1 expression, malondialdehyde levels and histological alterations in liver of *Acrossocheilus fasciatus* exposed to cadmium chlorid. *Gene* **2016**, *578*, 210–218.
31. Gayao, A.L.B.A.; Buzollo, H.; Fávero, G.C.; Junior, A.A.S.; Portella, M.C.; Cruz, C.; CARNEIRO, D.J. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilápia-do-nilo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. *Pesq. Agropec. Bras.* **2013**, *48*, 991–997.
32. Clark, M.A.; Finkel, R.; Rey, J.A.; Whalen, K. *Farmacologia Ilustrada*; Artmed: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2013; pp. 1–24.
33. Golan, D.E.; Junior, T.; Armen, H.; Armstgrong, E.J.; Armstronge, A.W. *Princípios de Farmacologia: A base Fisiopatológica da Farmacologia*; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brazil, 2014; pp. 95–156.
34. Carvalho, J.C.T.; Keita, H.; Santana, G.R.; Souza, G.C.; Santos, I.V.F.; Amado, J.R.R.; Kourouma, A.; Prada, A.L.; Carvalho, H.O.; Silva, M.L. Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: A histopathological study. *Inflammopharmacol* **2017**, *25*, 1–12.
35. Barros, G.J.B. Efeitos do acetate na inflamação e proteção contra lesão renal aguda induzida por cisplatina em Zebrafish. 62f. Master's Thesis, Programa de Pós-graduação em imunologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2018.
36. Souza, G.C.; Duarte, J.L.; Fernandes, C.P.; Moyado, J.A.V.; Navarrete, A.; Carvalho, J.C.T. Obtainment and Study of the Toxicity of Perillyl Alcohol Nanoemulsion on Zebrafish (*Danio rerio*). *Nanomed. Res. J.* **2016**, *5*, 14–19.
37. Takashima, F.; Hibiya, T. (Eds.) *An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features*, 2nd eds.; Kodansha Ltd.: Tokyo, Japan, 1995.
38. Pickler, T.B.; Lopes, K.P.; Magalhães, S.A.; Krueger, C.M.A.; Martins, M.M.; Filho, V.C.; Jozala, A.F.; Grotto, D.; Gerenutti, M. Effect of *Libidibia ferrea* bark and seed in maternal reproductive and biochemical outcomes and fetal anomaly in rats. *Birth Defects Res.* **2019**, *111*, 863–871.
39. Falcão, T.R.; Rodrigues, C.A.O.; Araújo, A.A.; Medeiros, C.A.C.X.; Soares, L.A.L.; Ferreira, M.R.A.; Vasconcelos, R.C.; Júnior, R.F.A.; Lopes, M.L.D.S.; Guerra, G.C.B. Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 1–10.
40. Souza, G.C.; Muller, V.; Góes, L.D.; Sanchez-Ortiz, B.L.; da Silva, G.; de Souza, W.P.; Santos, C.B.R.; Carvalho, J.C.T. Reproductive toxicity of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* and spillanthol in zebrafish: In vivo and in silico evaluation. *Hum. Exp. Toxicol.* **2019**, *2019*, 1–35.
41. Bittencourt, T.Q.M.; Santos, A.R.; Silva, M.C.G.; Silva, J.F.; Silva, N.P.C.; Silva, W.E.; Cadena, P.G.; Amorim, M.J.A.A.L. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2018**, *70*, 1877–1886.
42. Sun, G.; Liu, K. Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* **2017**, *192*, 165–170.
43. OECD: *Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity—Up and Down Procedure (UDP). Test Guideline 425* OECD: Paris, French, 2008.
44. OECD: *Guideline for Testing of Chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity Test—Fish Embryo Acute Toxicity Test. Test Guideline 236*; OECD: Paris, French, 2013.

45. Yang, L.; Ho, N.Y.; Alshut, R. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod. Toxicol.* **2009**, *28*, 245–253.
46. Souza, G.C. Estudo da toxicidade da nanoemulsão de Álcool Perílico (NPOH) sobre Zebrafish (*Danio rerio* Hamiltoln 1822). 87f. Master's Thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, Macapá, Brasil, 2015.
47. Favoretto, S.M.; Seabra, D.I.; Olivato, M.C.M. *Guia de Eutanásia Para Animais de Ensino e Pesquisa*; UNIFESP: São Paulo, Brazil, 2013; pp. 29–30.
48. Poleksic, V.; Mitrovic-Tutundzic, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*, Müller, R., Lloyd, R., Eds.; Fishing News Books: Oxford, MS, USA, 1994; pp. 339–352.
49. Takashima, F.; Hibiya, T. *An Atlas of Fish Histology-Normal and Pathological Features*. Kodansha Ltd.: Tóquio, Japan, 1984; Volume 69, p. 406.
50. Rigolin-Sá, O. Toxicidade do herbicida Roundup (glifosato) e do acaricida omite (propargito) nas fases iniciais da otogenia do bagre *Rhamidia hylarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes). PhD Thesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, 1999.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

