



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

TAFNIS INGRET DOS SANTOS SAMPAIO

VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA EM *Danio rerio*
(ZEBRAFISH) DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE
***Spondias mombin* (LINNAEUS 1753):**
ATIVIDADES ANSIOLÍTICA, ANTIDEPRESSIVA E TOXICIDADE AGUDA

MACAPÁ
2018

TAFNIS INGRET DOS SANTOS SAMPAIO

**VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA EM *Danio rerio*
(ZEBRAFISH) DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Spondias Mombin (LINNAEUS 1753):
ATIVIDADES ANSIOLÍTICA, ANTIDEPRESSIVA E TOXICIDADE AGUDA**

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

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

**MACAPÁ
2018**

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

615.321

S192v Sampaio, Tafnis Ingret dos Santos

Validação farmacológica e toxicológica em *Danio rerio* (zebrafish) do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (Linnaeus 1753) : atividades ansiolítica, antidepressiva e toxicidade aguda / Tafnis Ingret dos Santos Sampaio ; orientador, José Carlos Tavares Carvalho. – Macapá, 2018.
185 f.

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

1. Farmacologia. 2. *Spondias mombin* L. 3. Toxicidade. 4. Ansiolítico. 5. Antidepressivo. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

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

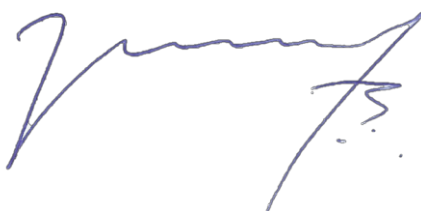
BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Tafnis Inqret dos Santos Sampaio

Orientador(a): Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

**Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente**

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá,
UNIFAP.



**Prof. Dra. Brenda Lorena Sánchez-Ortiz
Membro Titular**

Professora do Curso de Química da Universidad Nacional Autónoma de México,
UNAM.



**Profa. Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira
Membro Titular**

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



Data: 02/03/2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me ensinar que nada é impossível, que perante qualquer dificuldade quem acredita no seu amor encontrará o caminho da superação. Preciso agradecer pela Tua graça e infinita generosidade, pois em todo instante eu sei que Tu estavas me amparando e me guiando.

À Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), pela sua estrutura e, especialmente, pelos seus professores, cujos ensinamentos muitas vezes transcenderam as paredes da sala de aula e pelo seu programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao meu orientador, Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho, por ter me iniciado na carreira acadêmica, por ter despertado em mim a paixão pela pesquisa, por ter contribuído para que hoje eu estivesse na pós-graduação e laboratório que sempre desejei, pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos compartilhados.

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, pela colaboração para que a realização deste trabalho fosse possível.

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pela minha vida e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a cada um de vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

1	INTRODUÇÃO.....	28
1.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	28
1.2	ESTUDOS SOBRE <i>Spondias mombin</i> L.....	29
1.2.1	Botânico.....	29
1.2.2	Fitoquímico.....	31
1.2.3	Etnofarmacológico.....	32
1.2.4	Farmacológico.....	33
1.2.5	Toxicológico.....	34
1.3	TOXICIDADE EM MODELO DE <i>Danio rerio</i> (ZEBRAFISH).....	35
1.4	A UTILIZAÇÃO DA HISTOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA AVALIAR EFEITOS TÓXICOS EM <i>Danio rerio</i> (ZEBRAFISH).....	38
1.4.1	Brânquias.....	38
1.4.2	Fígado.....	40
1.4.3	Rins.....	42
1.4.4	Intestino.....	44
1.4.5	Cérebro.....	45
1.5	USO DE <i>Danio rerio</i> (ZEBRAFISH) EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS COM PRODUTOS NATURAIS.....	46
1.5.1	Produtos naturais e suas perspectivas.....	47
1.6	VANTAGEM DO <i>Danio rerio</i> (ZEBRAFISH) COMO ORGANISMO MODELO.....	48
1.7	AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZANDO <i>Danio rerio</i> (ZEBRAFISH) COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	51
1.8	AVALIAÇÃO DE EXTRATOS E COMPONENTES ISOLADOS DE PLANTAS UTILIZANDO <i>Danio rerio</i> (ZEBRAFISH) COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	52
1.9	DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS.....	53
1.9.1	Depressão.....	53
1.9.2	Ansiedade.....	54

2	OBJETIVOS.....	56
2.1	OBJETIVO GERAL.....	56
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
3	ARTIGO 1.....	57
1	INTRODUCTION.....	59
2	MATERIAL AND METHODS.....	60
2.1	OBTAINING PLANT MATERIAL.....	60
2.2	ANALYSIS OF HELSM BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.....	61
2.3	ANIMAL.....	61
2.4	DETERMINATION OF THE LC ₅₀	62
2.5	DRUGS AND ROUTE OF ADMINISTRATION.....	62
2.6	SCOTOTAXIS TEST IN ZEBRAFISH.....	62
2.7	STATISTICAL ANALYSIS.....	63
3	RESULTS.....	63
3.1	ANALYSIS OF HELSM BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.....	63
3.2	DETERMINATION OF THE LC ₅₀	64
3.3	SCOTOTAXIS TEST IN ZEBRAFISH.....	64
4	DISCUSSION.....	64
5	CONCLUSION.....	68
	REFERENCES.....	68
4	ARTIGO 2.....	80
1	INTRODUÇÃO.....	82
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	84
2.2	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS GASOSAS E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm)...	84
2.3	ANIMAIS.....	85
2.4	DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MÉDIA DL ₅₀	85
2.5	DROGAS, REAGENTES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO.....	85
2.6	ISOLAMENTO SOCIAL NA FASE DE DESENVOLVIMENTO.....	86

2.7	ESTRESSE LEVE CRÔNICO IMPREVISÍVEL (UCMS).....	86
2.8	TESTE DE MERGULHO EM TANQUE NOVO (MTN).....	87
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
3	RESULTADOS	88
3.1	CROMATOGRAFIA GASOSA E IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Spondias mombin</i> (EHEFSM).....	88
3.2	DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀	88
3.3	TESTE DE MERGULHO EM TANQUE NOVO (TMTN).....	89
3	DISCUSSÃO	90
4	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
5	ARTIGO 3	109
1	INTRODUÇÃO	111
2	MATERIAL E MÉTODOS	112
2.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	112
2.2	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	113
2.2.1	Animais.....	113
2.2.2	Avaliação dos parâmetros comportamentais de <i>Danio rerio</i> (zebrafish).....	113
2.2.3	Determinação da concentração letal média CL ₅₀	114
2.2.4	Determinação da dose letal média DL ₅₀	114
2.2.5	Avaliação da mortalidade.....	115
2.2.6	Avaliação dos parâmetros histopatológicos.....	115
2.3	MÉTODO DE ANÁLISE DO MATERIAL PREPARADO.....	115
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	117
3	RESULTADOS	117
3.1	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE <i>Danio</i> <i>rerio</i> (ZEBRAFISH).....	117
3.2.	DETERMINAÇÃO DA CL ₅₀	118
3.3	DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀	118
3.4	AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE.....	119
3.5	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS.....	119

3.5.1	Via de imersão.....	119
3.5.2	Via oral.....	121
4	DISCUSSÃO.....	125
5	CONCLUSÃO.....	130
	REFERÊNCIAS.....	131
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	154
	REFERÊNCIAS.....	155
	ANEXOS.....	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	O horário da UCMS incluiu o total de seis estressores leves que foram aplicados aos peixes dos grupos de estresse (sociais ou isolados).....	101
Tabela 2.	Efeito do tratamento com extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm) por exposição à gavagem em <i>Danio rerio</i> (zebrafish) por 48 horas.....	102
Tabela 1.	Número e porcentagem de animais mortos pelas diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm) sobre o <i>Danio rerio</i> (zebrafish).....	136
Tabela 2.	Número e porcentagem de animais mortos pelas diferentes doses do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm) sobre o <i>Danio rerio</i> (zebrafish).....	136
Tabela 3.	Alterações histopatológicas consideradas na análise das branquiais de <i>D. rerio</i> expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm).....	137
Tabela 4.	Alterações histopatológicas consideradas na análise dos fígados de <i>D. rerio</i> expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm).....	138
Tabela 5.	Alterações histopatológicas consideradas na análise dos rins de <i>D. rerio</i> expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm).....	139
Tabela 6.	Alterações histopatológicas consideradas na análise do intestino de <i>D. rerio</i> expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm).....	140

Tabela 7. Alterações histopatológicas consideradas na análise do cérebro de <i>D. rerio</i> expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i> (EHEFSm).....	141
--	-----

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** HPLC-UV chromatogram of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves. 1) Ellagic acid (rt = 36,861min) and 2) Isoquercitrin (rt = 39,547 min). Detection wavelength at 340 nm, whereas the UV spectra were monitored at wavelength of 220-540 nm..... 73
- Figure 2.** Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (time spent white compartment). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p< 0.01 vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one –way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey..... 74
- Figure 3.** Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (latency). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p< 0.01 vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one –way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey..... 75
- Figure 4.** Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (toggle). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p < 0.01 vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one –way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey..... 76
- Figure 5.** Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (erratic swimming). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=

	12/groups), ** $p < 0.01$ vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one –way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.....	77
Figure 6.	Effects of hydroethanolic extract from <i>S. mombin</i> leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (freezing duration). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** $p < 0.01$ vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one –way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.....	78
Figure 7.	Effects of hydroethanolic extract from <i>S. mombin</i> leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (thigmotaxis). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** $p < 0.01$ vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one –way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.....	79
Figure 1.	Chromatogram of hexane fraction of the crude extract from <i>Spondias mombin</i> leaves (HELSm).....	102
Figure 2.	Effects of hydroethanolic extract from <i>S. mombin</i> leaves (HELSm), fluoxetine (positive control in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (Time spent in top), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (righ pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** $p < 0.01$ vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukey test.....	103
Figure 3.	Effects of hydroethanolic extract from <i>S. mombin</i> leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in	

the novel tank diving test (quadrants crossed), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (righ pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p< 0.01 vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukey test..... 104

Figure 4. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (erratic swimming), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (righ pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p< 0.01 vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukey test..... 105

Figure 5. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (freezing duration), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (righ pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p< 0.01 vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukey test..... 106

Figure 6. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (distance travelled), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (righ pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n =

	12/groups), ** $p < 0.01$ vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukey test.....	107
Figure 7.	Effects of hydroethanolic extract from <i>S. mombin</i> leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (latency), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (righ pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** $p < 0.01$ vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukey test.....	108
Figura 1.	Efeito da administração das diferentes concentrações do EHEFSm (25, 50 e 75 mg/L) sobre <i>Danio rerio</i> (zebrafish), n= 12/grupo, CL ₅₀ = 49,86 mg/L.....	142
Figura 2.	Efeito da administração das diferentes doses do EHEFSm (1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 g/kg) sobre <i>Danio rerio</i> (zebrafish), n= 12/grupo, DL ₅₀ = 4,515g/kg.....	142
Figura 3.	A: 25 mg/l, apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; VC: Congestão dos vasos I; PFSL: fusão parcial das lamelas I. B: 50 mg/l apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; DPL: distanciamento da lamela primária II; PFSL: fusão parcial das lamelas I. C: 75 mg/l ER: ruptura epitelial II; DPL: distanciamento da lamela primária II; CFSL: fusão completa das lamelas II; VC: congestão nos vasos I; ILI: infiltração de leucócitos I; CD: degeneração celular II; N: Necrose: III.....	143
Figura 4.	A: 25mg/l apresentando CED: degeneração celular II; NV: vacuolização nuclear II; NA: atrofia nuclear II; IVV: aumento do volume dos vasos I; CV: vacuolização citoplasmática I. B: 50mg/l apresentando CED: degeneração celular II; NV: vacuolização nuclear II; NA:	

atrofia nuclear II; LNC: perda do contorno nuclear I; CD: degeneração citoplasmática II; DRNF: diminuição da frequência relativa de núcleos I; GD: diminuição de glicogênio I. **C:** 75mg/l apresentação CED: degeneração celular II; NV: vacuolização nuclear II; NA: atrofia nuclear; LNC: perda do contorno nuclear I; IV: aumento da frequência de vasos I; GD: diminuição de glicogênio I; CD: degeneração citoplasmática II..... 144

Figura 5. **A:** 25mg/l apresentando THD: degeneração hialina tubular I; TDO: desorganização tubular I; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I. **B:** 50mg/l apresentando TD: degeneração hialina tubular II; TDO: desorganização tubular I; H: hiperemia II; RSBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; DCG: dilatação dos capilares glomerulares I. **C:** 75mg/l apresentando TD: degeneração hialina tubular II; TDO: desorganização tubular I; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; N: necrose III..... 145

Figura 6. **A:** 25mg/l apresentando VA: atrofia dos vilos I; EV: vacuolização dos enterócitos I; DL: distanciamento da lâmina própria II; SLP: encurtamento da lâmina própria I. **B** 50mg/l apresentando VA: atrofia dos vilos I; DEL - Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal I; DL: distanciamento da lâmina própria II; ILI: infiltração de leucócitos I; HEC: hipertrofia das células epiteliais I; VD: degeneração do vilo II; N: necrose III; CD: degeneração das células I. **C:** 75mg/l apresentando VA: atrofia dos vilos I; DEL - Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal I; ILI: infiltração de leucócitos I; VD: degeneração do vilo II; N: necrose III; CD: degeneração das células I; SLP: encurtamento da lâmina

própria I; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; V: vacuolização dos enterócitos I..... 146

Figura 7. **A:** 25mg/l apresentando VD: dilatação dos vasos I; Cabeças de setas indicam neurônios normais. **B:** 50mg/l apresentando AN: neurônio atrofiado II; CC: cromatólise central (quando o neurônio sofre lesão de seu axônio e pode apresentar dissolução dos corpúsculos de Nissl e deslocamento do núcleo para a periferia) II; AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; **C:** 75mg/l apresentando CC: cromatólise central (quando o neurônio sofre lesão de seu axônio e pode apresentar dissolução dos corpúsculos de Nissl e deslocamento do núcleo para a periferia) II; AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III..... 147

Figura 8. **A:** 1g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; VC: Congestão dos vasos I; CCH: hiperplasia das células de cloreto I. **B:** 3g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; VC: Congestão dos vasos I; CCL: presença das células de cloreto na lamela I; ILI: infiltração de leucócitos I; HEC: Hiperplasia das células epiteliais I; CD: degeneração celular II. **C:** 5g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; CCL: presença das células de cloreto na lamela I; ILI: infiltração de leucócitos I; CD: degeneração celular II; PFSL fusão parcial das lamelas I; N necrose III; Fibrose III. **D:** 7g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; ILI: infiltração de

leucócitos I; CD: degeneração celular II; CSFL: fusão completa das lamelas I; Necrose III; Aneurisma II; Fibrose III. **E:** 9g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; HM: hemorragia II; A: aneurisma II; CCL: presença das células de cloreto na lamela I; CSFL: fusão completa das lamelas I; CD: degeneração celular II; N: necrose III; Fibrose III..... 148

Figura 9. **A:** 1g/kg apresentando LCC: perda do contorno celular I; ND: degeneração nuclear II; CD: degeneração citoplasmática II; CED: ruptura celular II; H: Hiperemia II; **B:** 3g/kg apresentando LCC: perda do contorno celular I; LNC: perda do contorno nuclear I; CED: ruptura celular II; NV: vacuolização nuclear II; S: esteatose II. **C:** 5g/kg apresentando ND: degeneração nuclear II; CD: degeneração citoplasmática II; CED: ruptura celular II; H: hiperemia II; C: colestase II; S: esteatose II; NA: atrofia nuclear II; LNC: perda do contorno nuclear I; NV: vacuolização nuclear II. **D:** 7g/kg apresentando LCC: perda do contorno celular I; ND: degeneração nuclear II; N: necrose III; CV: vacuolização citoplasmática I; CED: ruptura celular II. **E:** 9g/kg apresentando LCC: perda do contorno celular I; ND: degeneração nuclear II; N: necrose III; NA: atrofia nuclear II; CED: ruptura celular II; NV: vacuolização nuclear II..... 149

Figura 10. **A:** 1g/kg apresentando TD: degeneração hialina tubular II; TDO: desorganização tubular I; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; GD: degeneração glomerular II. **B:** 3g/kg apresentando TD: degeneração hialina tubular II; H: hiperemia II; RSBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; N: necrose III; **C:** 5g/kg apresentando TD: degeneração hialina tubular II; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de

Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; N: necrose III; VR: ruptura de vasos II. **D:** 7g/kg apresentando TD: degeneração tubular II; THD: degeneração hialina tubular I; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; N: necrose III; VR: ruptura de vasos II; **E:** 9g/kg apresentando TD: degeneração tubular II; THD: degeneração hialina tubular I; H: hiperemia II; RSBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; NDT: degeneração nuclear das células tubulares II; N: necrose III; VR: ruptura de vasos II; GD: degeneração glomerular II; LTBC: tecido linfóide na cápsula de Bowman II. 150

Figura 11. A: 1g/kg apresentando ILI: infiltração de leucócitos I; VD: degeneração do vilos II; N: necrose III; CD: degeneração das células I; SLP: encurtamento da lâmina própria I; SIM: destruição da mucosa intestinal II; V: vacuolização dos enterócitos I; GCH: hiperplasia das células caliciformes I. **B:** 3g/kg apresentando VA: atrofia dos vilos I; DEL - Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilos intestinal I; VD: degeneração do vilos II; N: necrose III; CD: degeneração das células I; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; V: vacuolização dos enterócitos I; GCH: hiperplasia das células caliciformes I. **C:** 5g/kg apresentando VA: atrofia dos vilos I; DEL - Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilos intestinal I; VD: degeneração do vilos II; N: necrose III; CD: degeneração das células I; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; V: vacuolização dos enterócitos I; GCH: hiperplasia das células caliciformes I; SLP

encurtamento da lâmina própria I; VF: fusão dos vilos II. **D:** 7g/kg apresentando VA: atrofia dos vilos I; VD: degeneração do vilos II; N: necrose III; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; GHC: hiperplasia das células caliciformes I; SLP encurtamento da lâmina própria I; VF: fusão dos vilos II; HLP: hemorragia na lâmina própria II. **E:** 9g/kg apresentando VA: atrofia dos vilos I; VD: degeneração do vilos II; N: necrose III; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; GHC: hiperplasia das células caliciformes I; SLP encurtamento da lâmina própria I; VF: fusão dos vilos II; HLP: hemorragia na lâmina própria II; DL: distanciamento da lâmina própria II 151

Figura 12. 1g/kg apresentando AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III; VD: dilatação dos vasos I. **B:** 3g/kg apresentando AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III; GA: astrócitos gemistocíticos II. **C:** 5g/kg apresentando AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III; GA: astrócitos gemistocíticos II; VD: dilatação dos vasos I. **D:** 7g/kg apresentando CC: cromatólise central (quando o neurônio sofre lesão de seu axônio e pode apresentar dissolução dos corpúsculos de Nissl e deslocamento do núcleo para a periferia) II; AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago

com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III; GA: astrócitos gemistocíticos II. **E:** 9g/kg apresentando CC: cromatólise central (quando o neurônio sofre lesão de seu axônio e pode apresentar dissolução dos corpúsculos de Nissl e deslocamento do núcleo para a periferia) II; GA astrócitos gemistocíticos II; AGC: células granulo- adiposas II; NN: necrose do neurônio III; NA: atrofia neuronal II..... 152

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Parecer do comitê de ética.....	172
Anexo 2.	Comprovante de submissão.....	173
Anexo 3.	Normas de publicação do periódico.....	174

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Aneurisma
AGC	Células grânulo-adiposas
AN	Neurônio atrofiado
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Colestase
CC	Cromatólise central
CCH	Hiperplasia das células de cloreto
CCL	Presença das células de cloreto na lamela
CD	Degeneração celular
CDTC	Degeneração citoplasmática das células tubulares
CG	Cromatografia gasosa
CE₅₀	Concentração efetiva média
CED	Degeneração celular
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFSL	Fusão completa das lamelas
CL₅₀	Concentração letal média
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
CSFL	Fusão completa das lamelas
CV	Vacuolização citoplasmática
DCG	Dilatação dos capilares glomerulares
DEC	afastamento das células epiteliais
DEL	Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal
DL	Distanciamento da lâmina própria
DL₅₀	Dose letal média
DML	Degeneração da camada muscular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dpf	dias pós fertilização
DPL	Distanciamento da lamela primária
<i>D. rerio</i>	<i>Danio rerio</i>

DRNF	Diminuição da frequência relativa de núcleos
EHEFSm	Extrato hidroetanólico das folhas de <i>Spondias mombin</i>
ER	Ruptura epitelial
EUA	Estados Unidos da América
EV	Dacuolização dos enterócitos
F	Fibrose
GA	Dstrócitos gemistocíticos
GCH	Hiperplasia das células caliciformes
GD	Diminuição de glicogênio
GFP	Grenn Fluorescent Protein
H	Hiperemia
HE	Hematoxilina/Eosina
HEC	Hiperplasia das células epiteliais
HLP	Hemorragia na lâmina própria
HM	Hemorragia
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAH	Índice de alterações histológicas
ILI	Infiltração de leucócitos
ISBCA	Aumento do espaço da cápsula de Bowman
IV	Aumento da frequência de vasos
IVV	Aumento do volume dos vasos
LCC	Perda do contorno celular
LNC	Perda do contorno nuclear
LTBC	Tecido linfoide na cápsula de Bowman
LTDA	Limitada
m	Metros
MDD	Major Depressive Disorder
MeHg	Mercúrio
MTN	Teste de mergulho em tanque novo
N	Necrose
n	Números
NA	Atrofia neuronal

ND	Degeneração nuclear
NDTC	Degeneração nuclear das células tubulares
NN	Necrose do neurônio
NV	Vacuolização nuclear
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pará
PAS	Periodic acid-Schiff
PE	Pernambuco
PFSL	Fusão parcial das lamelas
RE	Ruptura epitelial
RNA	Ácido ribonucleico
RSBCA	Aumento do espaço da cápsula de Bowman
S	Esteatose
s	Segundos
SIM	Destruição da mucosa intestinal
SLP	Encurtamento da lâmina própria
<i>S. mombin</i>	<i>Spondias mombin</i>
SPD	Serial Presence Detect
TD	Degeneração hialina tubular
TDO	Desorganização tubular
THD	Degeneração hialina tubular
UCMS	Estresse leve crônico imprevisível
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
USA	Estados Unidos da América
V	Vacuolização dos enterócitos
UV	Ultravioleta
VA	Atrofia dos vilos
VC	Congestão dos vasos
VD	Degeneração do vilo
VF	Fusão dos vilos
VMA	Valor médio de alteração
VR	Ruptura de vasos

VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA EM *Danio rerio* (ZEBRAFISH) DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Spondias mombin* (LINNAEUS 1753): ATIVIDADES ANSIOLÍTICA, ANTIDEPRESSIVA E TOXICIDADE AGUDA

RESUMO

Introdução: O uso de plantas medicinais é comum como alternativa no tratamento de algumas doenças que acometem a população. Tem-se como exemplo, a espécie *Spondias mombin* que é utilizada popularmente para o tratamento de várias doenças, dentre elas, transtornos neuropsiquiátricos. Apesar do uso dessa planta ser frequente, são escassas as pesquisas que avaliem a segurança de sua utilização como medicamento, assim como a toxicidade da mesma. **Objetivo:** Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos agudos, a atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) em *Danio rerio* (zebrafish). **Metodologia:** A toxicidade foi avaliada determinando-se a concentração letal (CL₅₀) e a dose letal (DL₅₀). A atividade ansiolítica foi avaliada no teste de preferência claro/escuro e, a atividade antidepressiva pelo teste de mergulho em tanque novo. **Resultados e discussões:** Na avaliação da atividade ansiolítica, os resultados dos parâmetros observados mostraram que o extrato apresentou atividade similar a do controle positivo (buspirona) nas duas vias de administração (imersão e oral) na concentração de 25 mg/l e com a dose 25 mg/kg. Na avaliação da atividade antidepressiva, os resultados obtidos pela avaliação dos parâmetros apontaram que o extrato demonstrou atividade semelhante ao grupo controle positivo (fluoxetina) nas duas vias de administração utilizadas no teste. A exposição por imersão com as diferentes concentrações do extrato (25, 50 e 75 mg/l) permitiu a determinação de CL₅₀ que foi de 49.86 mg/l. O tratamento por via oral com as diferentes doses (1, 3, 5, 7 e 9 g/kg) possibilitou a determinação da DL₅₀ que foi de 4,515 g/kg em 48h. Os resultados evidenciaram que as doses utilizadas nos testes de ansiedade e depressão não foram tóxicas, não apresentando alterações histopatológicas. **Conclusão:** A partir desses resultados é possível sugerir que o uso das folhas de *Spondias mombin* na medicina popular para o tratamento de transtornos neuropsiquiátricos foi evidenciado neste estudo.

Palavras-Chave: *Spondias mombin*; toxicidade; ansiolítico; antidepressivo.

Agradecimentos: Universidade Federal do Amapá, CAPES.

PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL VALIDATION IN *Danio rerio* (ZEBRAFISH) OF THE HYDROETHANOLIC EXTRACT FROM *Spondias mombin* LEAVES (LINNAEUS 1753): ANXIOLYTIC AND ANTIDEPRESSANT ACTIVITIES, AND EVALUATION OF THE ACUTE TOXIC

ABSTRACT

Introduction: The use of medicinal plants is common as an alternative therapy in the treatment of several diseases that affect the population. For example, the species *Spondias mombin* are commonly used for the treatment of various diseases, mainly neuropsychiatric disorders. Despite the ethnomedical background of this species, there is scarce research to assess the security for its therapeutic use, as well the toxicity. **Objectives:** This study aimed to estimate acute toxic effects and to evaluate the antidepressant and anxiolytic activity of the hydroethanolic extract from *Spondias mombin* leaves in *Danio rerio* (zebrafish). **Methodology:** Toxicity was assessed by determining the lethal concentration (LC₅₀) and the lethal dose (LD₅₀). The anxiolytic activity was evaluated in the light / dark preference test and the antidepressant activity by the new tank dipping test. **Results and discussion:** In the evaluation of the anxiolytic activity, the results of the observed parameters showed that the extract presented similar activity to the positive control (buspirone) in the two administration routes (immersion and oral) at 25 mg/l and 25 mg/kg. In the evaluation of the antidepressant activity, the results obtained in the assessment of the parameters indicated that the extract showed activity similar to the positive control group (fluoxetine) in the two routes of administration used in the test. Exposure by immersion with the different concentrations of the extract (25, 50 and 75 mg/l) allowed the determination of LC₅₀ which was 49.86 mg/l. Oral treatment with the different doses (1, 3, 5, 7 and 9 g/kg) made it possible to determine the LD₅₀ which was 4.515 g/kg in 48h. The results showed that the doses used in the tests of anxiety and depression were not toxic, presenting no histopathological alterations. **Conclusions:** From these results, it is possible to suggest that the use of *Spondias mombin* leaves in folk medicine for the treatment of neuropsychiatric disorders was evidenced in this study.

Keywords: *Spondias mombin*; toxicity; anxiolytic; antidepressant.

Acknowledgements: Universidade Federal do Amapá, CAPES.

1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

Ao procurar por plantas para se alimentar o homem descobriu espécies com ação tóxica e medicinal, iniciando assim uma sistematização empírica dos seres vivos, de acordo com o uso que podia fazer deles. Vestígios da utilização de plantas tóxicas e medicinais foram encontrados nas mais antigas civilizações. Com isso surgiu o tratamento de doenças com base no uso de plantas medicinais (SIMÕES et al., 1999).

Não se pode deixar de ressaltar o vínculo da cultura popular ao uso de plantas pela disponibilidade das mesmas, principalmente em países com clima tropical onde se encontram os em desenvolvimento que apresentam dificuldades em se tratando de medicina moderna e pela deficiência em relação a prestação de serviços de saúde (SAIME et al., 2005).

O aumento do uso de plantas medicinais como forma terapêutica pela população deve-se a diversos fatores como, por exemplo, o custo elevado e os efeitos colaterais de medicamentos. Uma das técnicas de pesquisa em produtos naturais mais importantes é a realização de estudos baseados no conhecimento tradicional de determinadas populações, conhecido como estudos etnofarmacológicos a cerca do uso comum das espécies de uma comunidade específica, o que acaba por facilitar a pesquisa uma vez que reduz o tempo em pesquisa sobre informações químicas, farmacológicas e agrônômicas sobre as espécies pesquisadas (PAULINO et al., 2012).

Existem aproximadamente 500.000 espécies de plantas no mundo e somente 1% dessas espécies foram estudadas em relação à atividade biológica e ao perfil fitoquímico. É preciso procurar alternativas terapêuticas viáveis ao tratamento das doenças endêmicas e perfis de resistência cada vez mais complexos de serem transpostos. A diversidade molecular somada ao vasto número de espécies que ainda faltam ser investigadas quanto a sua bioatividade caracteriza alternativa interessante na descoberta de novos compostos bioativos (PALOMBO, 2011).

Estudos mostram que cerca da metade dos produtos fitoterápicos disponibilizados no mercado brasileiro apresentam alguma falha em relação as mais diversas possibilidades, desde a presença de matéria orgânica não identificada até adulteração. Levando em consideração não apenas o valor terapêutico, mas também o valor econômico das plantas medicinais para a nação torna-se importante criar linhas de ação voltadas para o desenvolvimento de técnicas de padronização aliando estudos multidisciplinares envolvendo conhecimento químico, atividade biológica e controle tecnológico de qualidade (LOPES et al., 2003).

No Brasil a fitoterapia se configura como uma opção de baixo custo, eficaz e culturalmente apropriada. O cultivo e/ou extrativismo das plantas torna-se uma alternativa cada vez mais importante na agricultura nacional, uma vez que tem aumentado a demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou na prevenção de doenças (FURLANETO; MARINS; ENDO, 2003).

Dois aspectos diferenciam os produtos de origem natural dos sintéticos ao considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos: a diversidade molecular e a função biológica associada a essas moléculas. A diversidade molecular dos produtos naturais é extremamente superior a diversidade derivada dos processos de síntese, por se tratar de compostos provenientes de organismos biológicos, estes exibem algumas vezes similaridades com o organismo dos mamíferos e devido a esta similaridade, estes compostos apresentam maior compatibilidade com os receptores, exibindo atividades mais expressivas que os compostos obtidos via síntese clássica (VIEGAS JR.; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

1.2 ESTUDOS SOBRE *Spondias mombin* L.

1.2.1 Botânico

A família Anacardiaceae é composta por aproximadamente 76 gêneros e 600 espécies de distribuição geográfica predominantemente pantropical (CORREIA, DAVID; DAVID, 2006; PELL et al., 2011; HALL; GIL, 2017). Diversas espécies da família são cultivadas fora de seus ambientes naturais (TIANLU; BARFOD, 2008), pois possuem importância biológica e econômica, sendo empregadas em diversas áreas, como: alimentação, paisagismo, extração de tanino e verniz, produção de substâncias

para uso na indústria e na medicina e aproveitamento de madeira para construção (PICKEL, 2008). Os frutos das Anacardiaceae são fontes de alimento (MONTANARI et al., 2012).

Em contrapartida, cerca de 25% dos gêneros são tóxicos e causadores de dermatites de contato severas devido à produção de substâncias alergênicas (AGUILAR-ORTIGOZA; SOSA, 2004; CORREIA; DAVID; DAVID, 2006). Tais substâncias são fenóis dos tipos alquilcatecóis, alquilresorcinóis e biflavonoides (AGUILAR-ORTIGOZA; SOSA, 2004). Os estudos de isolamento e identificação de metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae ainda são escassos, pois calcula-se que menos de 7% das espécies conhecidas foram investigadas quanto à fitoquímica e atividade biológica. Entre os gêneros mais estudados *Anacardium*, *Mangifera* e *Rhus* apresentam maior número de estudos sobre a composição química e a atividade biológica de seus extratos e substâncias isoladas (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006).

Diversos estudos que descrevem a atividade antimicrobiana, especialmente antibacteriana e antifúngica, de espécies de Anacardiaceae. Também existe descrição de atividades antioxidante, inibidora da ação da acetilcolinesterase, antiulcerogênica, anti-inflamatória, analgésica, citotóxica, antiparasitária e antiviral. Dos 76 gêneros de Anacardiaceae, 14 foram catalogados no Brasil com 57 espécies, dentre as quais 14 são limitadas ao país (SILVA-LUZ; PIRANI, 2010).

O gênero *Spondias* pertence à família Anacardiaceae. É um gênero tropical com aproximadamente 18 espécies, onde aproximadamente 8 delas são encontradas nas Américas. É um gênero economicamente importante por causa do seu valor comercial, com frutos que são comercializados *in natura* ou processados na forma de produtos alimentícios (MITCHELL; DALY, 1998), e apresenta considerável uso popular na medicina tradicional (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; ALMEIDA et al., 2010; LUCENA et al., 2012).

Em relação a classificação taxonômica, a espécie *S. mombin* apresenta a seguinte posição: Domínio *Eukarya*; Reino *Plantae*; Filo *Anthophyta*; Divisão *Spermatophyta*; Subdivisão *Angiospermae*; Classe *Eudicotiledoneae*; Subclasse *Archichlamidae*; Ordem *Sapindales*; Família *Anacardiaceae*; Tribo *Spondiadeae* e Gênero *Spondias* L. Esta classificação botânica foi realizada em 1753 pelo botânico

Carolus Linnaeus (AIRY SHAW; FORMAN, 1967; RAVEN; EVERT; EICHOHORN, 2001; JOLY, 2002).

Spondias mombin L. é encontrada na América tropical, algumas partes da Ásia, oeste da Índia e partes da África (THOMAS, 1974; AYOKA et. al., 2006). No Brasil, é encontrada nas regiões Norte e Nordeste, principalmente nas regiões da Mata Atlântica e da Amazônia, além da Caatinga (BOSCO et al., 2000). No Nordeste é conhecida como cajá, no Sudeste como cajazeira miúda ou cajá pequeno, no Sul conhecida como cajazeira ou cajá mirim e na Amazônia como taperebá.

A cajazeira é uma árvore frutífera frondosa e perene, de porte alto que pode chegar a 30 m de altura, com folhas caducas e um tronco de 60-75 cm de largura, revestido por casca grossa e rugosa (BRAGA, 1960; LORENZI, 1992; ALVES; FILGUIERAS; MOURA, 2000). As folhas possuem de 5 a 11 folíolos possuindo de 9-11 cm e as flores são pequenas, brancas e aparecem em cachos na extremidade dos ramos. Segundo Prance e Silva (1975), as flores são unissexuais e hermafroditas na mesma planta. O fruto é classificado como drupa (BRAGA, 1960; CAVALCANTE, 1976), é amarelado e possui de 2-4 cm de comprimento e de 1,5-2 cm de largura, possui mesocarpo carnoso de sabor agridoce (PIRANI, 1987; PELL et al., 2011). O endocarpo é branco, enrugado e possui de 2 a 5 lóculos (SOUZA et al., 2000).

1.2.2 Fitoquímico

Estudos fitoquímicos realizados com as folhas confirmaram a presença de taninos, saponinas, antraquinonas glicosiladas, alcaloides (AJAO; SHONUKAN; FEMI-ONADEKO, 1984; CORTHOUT et al., 1991; ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999; NJOKU; AKUMEFULA, 2007; SILVA et al., 2011), triterpenos (FRED-JAIYESIMI; KIO; RICHARD, 2009) e flavonoides (NJOKU; AKUMEFULA, 2007; SILVA et al., 2012). No extrato bruto aquoso e metanólico há a presença de glicosídeos (AYOKA et al., 2006).

A quantificação dos componentes fitoquímicos das folhas de *S. mombin* evidenciou um teor de saponinas de 7,60%, alcaloides 6,00%, taninos 3,82%, flavonoides 3,00% e compostos fenólicos de 1,00% (NJOKU; AKUMEFULA, 2007). Os estudos com a casca do caule identificaram a presença de quinonas e terpenos (DIBY; KONÉ; YAPO, 2012).

Corthout et al. (1991) em estudo realizado quanto aos compostos isolados reportou a presença de geranina e galoilgeranina, dois elagitaninos identificados nas folhas e caules de *S. mombin*. E em outro estudo, Corthout et al. (1992) mostraram a presença do éster butírico do ácido clorogênico e do ácido 2-O-cafeoil-(+)-alohidroxicítrico (um éster do ácido cafeico). No extrato etanólico das folhas e caules de *Spondias mombin* foi identificada a presença de ácidos do tipo 6-aquil-salicílico (CORTHOUT et al., 1994). Fred-Jaiyesimi e colaboradores (2009) isolaram do extrato metanólico das folhas de *S. mombin* o triterpeno 3 β -urs-12-en-3-il(9z)-hexadec-9-enoato.

Silva et al. (2012), ao realizar estudo com o extrato hidrometanólico das folhas da cajazeira, identificaram a presença do flavonoide quercetina e do ácido elágico. Outro estudo fitoquímico do extrato hidroetanólico das folhas foram identificados os flavonoides: quercetina, canferol e isoquercetina, além da presença do flavonoide rutina no extrato hidroetanólico dos frutos da planta (CABRAL, 2016).

Os frutos são ricos em carotenoides e vitaminas A (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 1989), contendo como principal carotenóide a β -criptoxantina, seguido da luteína (HAMANO; MERCADANTE, 2001). As folhas de *S. mombin* são ricas em vitaminas C, B1, B2 e B3 e as análises minerais revelaram a presença de potássio, magnésio, sódio, cálcio e fósforo nas folhas (NJOKU; AKUMEFULA, 2007).

1.2.3 Etnofarmacológico

Spondias mombin é utilizada tradicionalmente para o tratamento de diversas doenças, por suas cascas, ramos e folhas apresentarem propriedades medicinais (SACRAMENTO; SOUZA, 2000). A literatura relata que a casca do caule de *S. mombin* é usada popularmente como abortiva, com efeito emético, como antídoto para toxina de serpentes e para o tratamento de feridas, já as raízes são usadas para problemas gastrointestinais (VILLEGAS et al., 1997; TROPICOS, 2013).

As cascas do caule e as folhas são usadas popularmente para o tratamento de desordens infecciosas possuindo propriedades antidisentérica. As folhas são utilizadas para o tratamento de depressão e câncer, além de serem usadas como anti-inflamatórias para problemas orais e, do uso reportado para o tratamento de prostatite, uretrite, cistite, conjutivite (ALBUQUERQUE et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008;

TROPICOS, 2013), estimulante uterino, controle da ansiedade e atividade antifecundação (OFFIAH; ANYANWU, 1989; AYOKA et al., 2005; UCHENDU; ISEK, 2008).

As folhas também são usadas para o tratamento de infecções virais, bacterianas e fúngicas, e anti-helmíntico. A atividade antifúngica de *S. mombin* é comumente utilizada na medicina tradicional, mas alguns estudos não descreveram a atividade desse extrato sobre os fungos (AJAO; SHONUKAN; FEMI-ONADEKO, 1995; ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999).

1.2.4 Farmacológico

Segundo Corthout (1991) os extratos das folhas e cascas do caule de *S. mombin* apresentaram atividade antiviral contra Coxsackie e *Herpes simplex*, tal propriedade foi atribuída à presença dos elagitaninos, geraniina e galiolgeraniina. Esta atividade antiviral também foi atribuída aos compostos ácido 2-o-cafeicol-(+)-alohidroxicítrico e éster butírico de ácido clorogênico, isolados das folhas e cascas de *S. mombin* (CORTHOUT et al., 1992). O ácido elágico e quercetina, compostos isolados das folhas mostraram potencial atividade contra o vírus do dengue tipo 2 (SILVA et al., 2011).

Foi comprovado cientificamente, o efeito antibacteriano de amplo espectro do extrato das folhas de *S. mombin*, apresentando ação semelhante à ampicilina e gentamicina (ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999). Esta atividade foi atribuída aos compostos isolados de cadeia longa derivados do ácido salicílico sendo eficazes contra *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* e *Mycobacterium fortuitum*. A atividade antihelmíntica dos extratos etanólico e aquoso foi confirmada em estudos com ovelhas, relatando uma redução nos ovos fecais de *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Strongyloides spp.* e *Trichuris spp.* (ADEMOLA; FAGBEMI; IDOWU, 2005).

A atividade antimicrobiana também se mostrou eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Serratia liquefaciens* e *Enterobacter cloacae*, em estudos com o extrato hidrometanólico das folhas de *S. mombin* (ABO; OGUNLEYE; ASHIDI 1999; SILVA et al., 2012).

O uso popular das folhas para controle da ansiedade foi confirmado cientificamente em estudos com a administração oral dos extratos aquoso, metanólico e etanólico em ratos e camundongos (AYOKA et al., 2005). Os efeitos antipsicóticos e antiepilépticos também foram relatados em ratos e camundongos, a atividade sedativa prolongou o período de sono e melhorou o comportamento dos animais tratados (AYOKA et al., 2006).

Outros estudos com o extrato hidrometanólico das folhas reportaram a atividade antioxidante da planta por sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e a atividade antiperoxidação lipídica (AKINMOLADUN; OBUOTOR; FAROMBI, 2010; SILVA et al., 2012).

O extrato metanólico das folhas de *S. mombin*, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, mostrou atividade anti-inflamatória. O pré-tratamento dos ratos com o extrato causou uma significativa inibição do edema de pata induzido por carragenina, resposta que pode se dá através de uma supressão da produção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas como TNF- α e iNO (NWORU et al., 2011).

1.2.5 Toxicológico

Os produtos fitoterápicos geralmente apresentam menor incidência de efeitos colaterais do que as drogas sintéticas (DREW; MYERS, 1997). Mas, a ideia geral de que as drogas vegetais são seguras e livres de efeitos colaterais não é verdadeira (PERHARIC; SHAW; MURRAY, 1993; VEIGA JR; MACIEL; PINTO 2005; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007). Alguns constituintes das plantas apresentam alta toxicidade.

Em estudos com os extratos aquoso, metanólico e etanólico das folhas de *Spondias mombin* na dose de 5,0 g/kg por via oral, não foram observados sinais de toxicidade aguda em ratos Wistar (AYOKA et al., 2005). Estudos de toxicidade sub-aguda com extrato aquoso das folhas de *S. mombin* nas doses de 300, 1000 e 1500 mg/kg por via oral durante 14 dias não provocaram sinais de toxicidade em ratos quanto aos aspectos comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histológicos (HAMENOO, 2010).

O extrato aquoso das folhas de *S. mombin* foi descrito como abortivo, capaz de induzir a expulsão da placenta em fêmeas prenhes de ratos e camundongos em tratamento intraperitoneal com as doses de 750 e 1500 mg/kg em todas as fases da

gestação, exceto na fase inicial (OFFIAH; ANYANWU, 1989). O possível mecanismo seria a ação sobre os receptores de estrogênio no músculo uterino, causando contração prolongada neste músculo liso, e alterações nos hormônios esteróides (IGWE et al., 2011; OLOYE et al., 2013).

Estudo com o extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* não descreveu a atividade abortiva em ratas prenhes tratadas intraperitonealmente do 8º ao 11º dia de prenhez com a dose de 800 mg/kg (UCHENDU; ISEK, 2008), este mesmo estudo, porém, relatou o efeito anticoncepcional do extrato nas ratas tratadas do primeiro ao quarto dia de prenhez com a mesma dose.

Apesar das folhas de *S. mombin* serem comumente utilizadas na medicina popular e seu extrato apresentar vários estudos com atividade farmacológica reconhecida, ainda há pouco conhecimento sobre a potencial toxicidade *in vivo* da espécie. Assim, são necessários maiores estudos para garantir a segurança de seu uso.

1.3 TOXICIDADE EM MODELO DE *Danio rerio* (ZEBRAFISH)

O termo toxicidade é uma propriedade relativa de uma substância química que se refere ao seu potencial de causar danos aos organismos vivos e, é uma função da concentração da substância química e da duração da exposição (RAND; PETROCELLI, 1985). A expressão da toxicidade de uma substância química depende das características de sua exposição e do seu comportamento no organismo, relacionado aos mecanismos de transporte e de interação com sítios ou órgãos-alvo, ou seja, os efeitos tóxicos só se manifestam se o agente toxico alcançar locais específicos do organismo em concentrações suficientes para produzir algum tipo de efeito (BARROS; DAVINO, 2008).

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

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

Os testes de toxicidade possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas, além de avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores (BERTOLETTI, 1990).

Em testes de toxicidade podem ser observados os efeitos agudos e os efeitos crônicos, sendo os primeiros aqueles que ocorrem rapidamente com um resultado da exposição ao agente tóxico por um curto período de tempo (para peixes, horas, dias ou semanas). De acordo com Lombardi, (2004) os testes de toxicidade aguda são experimentos de curta duração, que proporcionam rápidas respostas em estudos sobre efeitos tóxicos letais, em que o objetivo é determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) de certa substância, sobre os organismos aquáticos, em um tempo de 24 a 96 horas de exposição. Normalmente o efeito é a letalidade (ou para alguns organismos, como os microcrustáceos, pode ser a imobilidade).

Para a avaliação do efeito agudo são consideradas a CL₅₀ ou a CE₅₀, sendo a primeira a concentração letal média, ou a concentração do agente tóxico que causa mortalidade a 50% dos organismos expostos num intervalo de 24 a 96 horas, e a última, a concentração efetiva média, ou a concentração do agente tóxico que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos no mesmo intervalo de tempo. De acordo com Weinstein e Birk (1989), o estresse agudo é caracterizado por danos morfológicos severos, alterações significativas no metabolismo, colapso celular e perda de tecido. Se essa perda for muito grande ou se algum processo fisiológico vital for permanentemente comprometido, o organismo irá morrer. Isso caracteriza a toxicidade letal aguda que resulta de um rápido bloqueio do metabolismo.

A crescente pressão dos grupos de proteção dos animais tem restringido cada vez mais, o acesso da maioria dos grupos de pesquisa em toxicologia a mamíferos. Além disso, leis, discussões, projetos e comitês visam à diminuição do número de animais usados em experimentos toxicológicos, forçando uma reflexão acerca do tema e a implementação de testes preliminares que permitam realizar inferências que possibilitem a redução do uso de animais (BALLS, 1994; BALLS; VAN ZELLER; HALDER, 2000; DIPASQUALE; HAYES, 2001; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Nesse contexto o *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) ou mais vulgarmente conhecido como paulistinha ou peixe-zebra surge como modelo experimental alternativo. Esse pequeno peixe tropical de água doce é originário da Ásia, mede no

máximo 5 cm de comprimento, onívoro, pacífico, muito ativo e possui ciclo de vida curto em média 3 anos (KNIE; LOPES, 2004). Passou a ser utilizado como modelo experimental em toxicologia a partir dos anos 90.

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

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

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

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

Um caso notável da aplicação desse modelo experimental embrionário foi a descoberta da prostaglandina E₂ 16,16- dimetilada, em testes de bioatividade, como

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

1.4 A UTILIZAÇÃO DA HISTOLOGIA COMO FERRAMENTA PARA AVALIAR EFEITOS TÓXICOS EM *Danio rerio* (ZEBRAFISH)

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

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

1.4.1 Brânquias

Assim como na maioria dos teleósteos, as brânquias do *D. rerio* localizam-se na cavidade opercular e dividem-se em 4 arcos em cada lado da faringe. Destes divergem filamentos branquiais nos quais se inserem duas fileiras de lamelas secundárias que se projetam de ambos os lados do filamento (FERGUSON, 1989).

A respiração nos peixes é realizada através do fluxo de água pela cavidade bucal e consequentemente, para o interior da faringe e através das brânquias. A respiração branquial possui função efetiva quando a água se move em uma direção unilateral sobre as membranas branquiais. A maioria dos peixes boeiam água através das suas brânquias alternando concentração e relaxamento da cavidade bucal

(anterior às brânquias) e cavidade opercular (posterior as brânquias) (HUGHES, 1980; HELFMAN; COLLETTE; FACEY, 1997; HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2012).

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

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

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

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

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

Devido o seu contato direto com a água durante as trocas gasosas, as brânquias são particularmente sensíveis a substâncias tóxicas presentes no meio (LINS et al., 2010). Sendo assim, este órgão possui a maioria dos estudos histopatológicos voltados a avaliação de impactos ambientais, e atualmente também tem sido avaliado para a triagem toxicológica de nanocompostos (SOUZA et al., 2016).

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

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

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

1.4.2 Fígado

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

O fluxo sanguíneo hepático do zebrafish é similar ao dos mamíferos. O sangue entra no fígado pela veia porta e artéria hepática. Após sua entrada, o sangue flui pelos ramos menores destes importantes vasos, que acabam numa série de sinusóides, os quais são revestidos por células endoteliais. As células de Kupffer, que

estão ligadas nas células endoteliais hepáticas dos mamíferos, provavelmente não existem em *Danio rerio* (zebrafish). Dos sinusóides, o sangue é coletado para o interior das veias centrais e então vai para o coração através da veia hepática (HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2012).

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

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

A complexidade e importância das funções do fígado, tornam a hepatotoxicidade uma das principais preocupações durante o desenvolvimento de novas drogas. Para

avaliá-la ensaios com roedores geralmente são realizados, mas em geral possuem um elevado custo e grande tempo para execução. Além disso, outro problema como pequena amostragem é característico deste tipo de teste (MCGRATH; LI, 2008). O *Danio rerio* (zebrafish) em estágios embrionários e adulto podem ser utilizados para a triagem de hepatotoxicidade de novas drogas ou investigações. As razões para a utilização deste peixe são motivadas pela sua transparência, velocidade de desenvolvimento, grandes tamanhos amostrais e baixo custo. Portanto, os estudos de hepatotoxicidade em zebrafish são realizados mais cedo, facilitando a tomada de decisões para a aceleração do desenvolvimento de novos medicamentos (MCGRATH; LI, 2008).

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

1.4.3 Rins

Nos vertebrados superiores (repteis, aves e mamíferos) o desenvolvimento dos rins ocorre em três estágios. O primeiro estágio do rim em fase embrionária é o pronefron. Este é caracterizado por um par de glomérulos e dois ductos pronefricos separados que drenam produtos residuais para o interior da cloaca. A cloaca nos teleósteos é uma pequena estrutura embrionária, que é perdida na fase adulta. Em seguida, durante a embriogênese os pronefrons são substituídos pelos mesonefrons, que por sua vez são substituídos por metanefrons ou rim adulto. Nos teleósteos, o desenvolvimento do rim termina com a formação dos mesonefrons (HOAR, 1955; PETERSEN; FISCHER 1986; HELFMAN; COLLETTE; FACEY, 1997; HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2012).

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

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

Os néfrons do *Danio rerio* (zebrafish) são compostos por glomérulos, túbulos proximal/distal e ductos coletores. Os glomérulos são facilmente visualizados como um grupo de capilares lobulados cercados pela cápsula de Bowman. O sangue é filtrado pelos glomérulos e então entra no espaço da cápsula de Bowman de onde segue para os túbulos proximais. Estes túbulos podem ser facilmente identificados em cortes histológicos de rotina como túbulos com coloração eosinófilica e borda em escova. Sódio, cloro, água e glicose são absorvidos nos túbulos proximais. A borda em escova é o reflexo de inúmeras microvilosidades apicais nesta região dos néfrons. Já nos túbulos distais continuam a ser absorvidos sódio e cloreto, porém água não é absorvida nesta porção (HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2012).

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

Uma vez no túbulo distal, a urina flui para o interior do ducto coletor. É difícil distinguir túbulos coletores e túbulos distais em cortes histológicos de rotina. Estes

túbulos não possuem coloração eosinófilica e não possuem borda em escova. A principal função do ducto coletor é conduzir a urina para o interior da bexiga urinária (MOCHIZUKI et al., 2005).

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

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

Souza e colaboradores (2016) estudaram a toxicidade da nanoemulsão de álcool perílico sobre zebrafish e conclui que as concentrações de 25,35 e 50 µg/L ocasionaram alterações no tecido hepático como: necrose, ruptura dos vasos sanguíneos e degeneração glomerular, entre outras.

1.4.4 Intestino

O zebrafish possui intestino longo e desprovido de estômago verdadeiro, é considerado onívoro, pois pode se alimentar de grande variedade de alimentos, podendo assim consumir grande variedade de crustáceos bentônicos, plâncton, vermes e larvas de insetos (DUTTA, 1993; MOYLE; CECHE, 2000; SPENCE et al., 2006).

Pelo fato dele não possuir estômago, a produção de sucos gástrico que ocorre na maioria das espécies de peixes, não ocorre, assim como também não são formados o ácido clorídrico ou a pepsina (FANGE; GROVE, 1979). Nessas espécies, a digestão ocorre no intestino quando há o encontro das enzimas com esses alimentos.

A lipase e amilase, em peixes sem estômago definido pode ocorrer à síntese na mucosa intestinal. A amilase em peixes herbívoros pode aparecer em maiores

concentrações no intestino, devido ser essencial à digestão de carboidratos presentes no alimento (BORLONGAN, 1990). Apesar de ser encontrada lipase no sítio anterior do intestino e nos cecos pilóricos de alguns peixes (GISBERT et al., 1999), a digestão de lipídeos continua nas demais porções do intestino (SMITH, 1989).

A absorção dos aminoácidos no intestino delgado pode ocorrer a partir de transporte passivo (LOVELL, 1998), ou de dois prováveis sistemas de transporte ativo, semelhante ao das hexoses, sendo uma para aminoácido neutros, um para básicos e outro para ácidos (NUNES, 1998). As proteínas intactas também podem ser absorvidas diretamente para o sistema sanguíneo, via rota paracelular ou absorvido pelos enterócitos via pinocitoses (HORN, 1998). Após entrarem nos enterócitos, os mesmos são transportados pela corrente sanguínea até o fígado como aminoácidos livres ou lipoproteínas (NRC, 2011).

O intestino desempenha várias funções importantes no sistema digestório e é, conseqüentemente, um órgão chave para homeostase do organismo. Conseqüentemente, a exposição a xenobióticos pode comprometer a função intestinal por alterar os componentes histológicos associados a esse órgão (HONORATO et al., 2011).

Assim como nos mamíferos, o intestino de algumas espécies de peixe também apresenta porção delgada e outra grossa (WANG et al., 2010; MENKE et al., 2011). O intestino delgado tem como função a absorção de nutrientes, secreção de enzimas que auxiliam na digestão e de hormônios. Já o intestino grosso tem como principais funções a absorção de líquidos e a secreção de muco (WANG et al., 2010).

Histologicamente o intestino de *Danio rerio* (zebrafish) é composto por 3 camadas: a mucosa, a submucosa e a muscular (SANTOS et al., 2016). Carvalho et al., (2017) analisou as alterações nesse tecido causadas pelo veneno *Bothrops alternatus* (BAV) e relatou as diversas alterações apresentadas nesse órgão.

1.4.5 Cérebro

O sistema nervoso dos peixes se caracteriza pelo cérebro dividido em cinco partes: o mielencéfalo, metaencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo, telencéfalo e a medula espinhal. O telencéfalo tem função olfativa; o diencéfalo nos peixes origina o tálamo, o centro para impulsos olfativos e visuais. Do diencéfalo surgem duas estruturas

medianas; anteriormente surge o corpo parietal, e na região posterior, o corpo pineal (PRECHTL et al., 1998).

Nos ciclóstomos existem as duas estruturas, enquanto que na maioria dos peixes ocorre somente o corpo pineal. O mesencéfalo dos peixes é o centro de coordenação nervosa. Esta estrutura desenvolve a partir da região dorsal dois lobos ópticos. O metencéfalo dá origem ao cerebelo, o centro de coordenação muscular, sendo mais desenvolvido nos tubarões, peixes de movimentos muito rápidos. O mielencéfalo forma o bulbo do encéfalo, que, em todos os vertebrados está relacionado com os centros de atividades vitais, como a respiração, batimento cardíaco e metabolismo. Nos peixes esta região é o centro do sistema da linha lateral e do ouvido interno. Da mesma maneira que os anfíbios os peixes possuem 10 nervos cranianos (LAGLER et al., 1977; PRECHTL et al., 1998).

Em trabalho publicado por Berntssen et al., (2003), o cérebro pareceu ser o órgão mais sensível aos danos oxidativos provocados por mercúrio quando comparado com outros órgãos em peixes expostos ao MeHg via oral. Embora o rim e o fígado acumulem a maioria do MeHg, as injúrias oxidativas ocorrem no cérebro devido a pequena capacidade de regeneração, e não no fígado e nos rins, como esperado. Então observa-se dentre os órgãos que devem ser analisados, o cérebro está incluído.

1.5 USO DE *Danio rerio* (ZEBRAFISH) EM MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS COM PRODUTOS NATURAIS

O uso de zebrafish já está estabelecido como uma plataforma de pesquisa para a descoberta de novos fármacos, além de ser um modelo útil em outras áreas da ciência. A facilidade com que produtos naturais e pequenas moléculas podem ser analisados neste animal, o torna um modelo para triagem de bioatividade de extratos e componentes deles derivados. O grande número de testes que podem ser realizados com zebrafish é um dos atrativos dos modelos, já que não é possível realizar um número tão grande de testes em outros modelos experimentais. Os ensaios com base em *Danio rerio* (zebrafish) podem auxiliar no isolamento de grande número de moléculas bioativas provenientes de extratos vegetais, identificadas em triagens de larga escala, aumentando a relevância biológica de tais descobertas, e

outro fator positivo na utilização deste modelo animal para triagem em larga escala é a quantidade diminuta de extratos ou produtos isolados requeridos para a realização dos testes. Portanto, a importância dos modelos de zebrafish é comprovada pelo número crescente de publicações e dos diversos testes realizados (CRAWFORD et al., 2011; TABASSUM et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

1.5.1 Produtos naturais e suas perspectivas

O termo produtos naturais, refere-se a pequenas moléculas produzidas por organismos vivos (particularmente metabólitos secundários), que ainda são uma excelente fonte química subutilizada para a descoberta de novos medicamentos. Componentes bioativos isolados de plantas, fungos e bactérias deram origem a uma vasta gama de compostos terapêuticos para humanos. Além disso, outros são ferramentas em farmacologia, bioquímica e biologia celular (CRAWFORD; ESGUERRA; WITTE, 2008).

O aprimoramento da química computacional nos anos 90 e o desenvolvimento de novas tecnologias, provocaram o declínio no campo da pesquisa de drogas derivadas de produtos naturais (CRAWFORD; ESGUERRA; WITTE, 2008). É válido lembrar que algumas empresas farmacêuticas eliminaram suas pesquisas com drogas derivadas de produtos naturais. A pesquisa com produtos naturais possui outros desafios inerentes como a dificuldade do isolamento de compostos puros de extratos brutos, identificação do mecanismo de ação e síntese de estruturas complexas, muitas vezes em quantidades tão pequenas, que não tem a sua atividade detectada através de triagem de alto rendimento (CLARDY; WALSH, 2004). Apesar dos maciços investimentos em novas tecnologias para o desenvolvimento de compostos químicos, a quantidade de novos fármacos lançados no mercado não tem aumentado proporcionalmente. Sendo assim, a química computacional e combinatória não consegue atingir seu objetivo de ser uma fonte primária de novos compostos bioativos candidatos a fármacos inovadores (YUNES; PEDROSA; CECHINEL, 2001).

Neste contexto, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos. Há uma crescente valorização dos produtos naturais, pois estes possuem estruturas, que foram evolutivamente selecionadas com base em sua habilidade de

interagir com macromoléculas biológicas (KOEHN; CARTER, 2005; MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007). Portanto, a pesquisa com produtos naturais vai continuar a se expandir, tendo estes como fonte inspiradora para o desenvolvimento de novas drogas.

A pesquisa com produtos naturais enfrenta outra grande dificuldade, a reduzida complexidade das análises das triagens de alto rendimento, que utiliza testes *in vitro* para a triagem da atividade farmacológica de milhares de moléculas candidatas a fármacos, sendo uma avaliação para um único alvo. Entretanto, esta análise gera muitas vezes compostos com pouca/nenhuma efetividade *in vivo* (VAN DER GREEF; MCBURNEY, 2005). Entretanto, a consequência desta deficiência tem sido estimuladora a busca por novas metodologias de bioensaios para triagem da atividade farmacológica, que sejam mais eficientes nessa avaliação e independentes do alvo (CRAWFORD; ESGUERRA; WITE, 2008).

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

1.6 VANTAGEM DO *Danio rerio* (ZEBRAFISH) COMO ORGANISMO MODELO

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

A chave de todo sucesso do *Danio rerio* (zebrafish), como modelo experimental, reside no fato deste possuir características favoráveis como: pequeno custo e espaço requerido para manutenção, desenvolvimento rápido e externo ao corpo, ciclo biológico curto, grande prole (centenas de ovos por acasalamento). Os embriões são translúcidos e pequenos (1-5 mm dependendo do estágio de desenvolvimento) adequados à manipulação e microinjeção (LELE; KRONE, 1996; BAILEY; OLIVERI; LEVIN, 2013). É válido lembrar que a maioria dos testes realizados utilizam embriões e larvas.

A vantagem chave no teste de bioatividade de pequenas moléculas, utilizando larvas e embriões de zebrafish é que os compostos podem ser simplesmente diluídos

em água não estéril, e as moléculas de baixo peso molecular são rapidamente absorvidas pela pele e brânquias, promovendo aumento da capacidade de análise centenas de moléculas por dia (LANGHEINRICH, 2003; ZON; PETERSON, 2005).

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

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

Outro aspecto importante deste peixe é a sua utilização como modelo de estudos genéticos, tendo sido estabelecido nos anos 70 por Streisinger, que estudou o desenvolvimento embrionário do zebrafish (STREISINGER, 1981). Nos anos 2000, ocorreu um progresso considerável na genética e genômica do *Danio rerio* (zebrafish). Em 2001, o Instituto Sanger iniciou o sequenciamento total do genoma do zebrafish e em 2013 o seu genoma foi totalmente sequenciado, mostrando que 70 % de seus 26 mil genes são semelhantes aos genes humanos (STERN; ZON, 2003; HOWE et al., 2013), o seu genoma mitocondrial encontra-se totalmente sequenciado desde outubro de 2001 (BROUGHTON; MILAM; ROE, 2001), e comparando as sequências do genoma humano e do zebrafish, muitos genes como os do ciclo celular, crescimento, diferenciação, funções teciduais, supressores tumorais e oncogênese permanecem conservados, tornando o *Danio rerio* (zebrafish) um organismo modelo fidedigno para

a triagem de bioatividade de drogas e produtos químicos (AMATRUDA et al., 2002; CRAWFORD; ESGUERRA; WITTE, 2008).

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

Além das diversas linhagens mutantes, o *Danio rerio* (zebrafish) tem se mostrado um modelo vertebrado versátil para estudos de genética reversa. —Antisense morpholinol oligonucleotídeos, comumente referidos apenas como —morpholinosll, é a técnica mais utilizada para a produção de zebrafish nocautes. Esta técnica bloqueia especificamente a função de um gene em embrião de zebrafish. Os —morpholinosll estão disponíveis em bibliotecas, e sua microinjeção é realizada de maneira dose-dependente em embriões nos primeiros estágios de desenvolvimentos. Dois tipos de —morpholinosll são mais utilizados para interferir na expressão génica das proteínas —ATG-morpholino” (bloqueia a tradução dos ribossomos e deixa o embrião sem uma proteína) e o —splice- 31 morpholinol, se liga e interfere no splicing do RNA, resultando numa proteína de forma truncada que é utilizado para o estudo de um domínio da proteína específico. Contudo, numerosos genes já foram funcionalmente analisados desta maneira, incluindo diversos identificados no contexto de triagens genéticas reversas de alta escala (HEASMAN,

2002; DOITSIDOU et al., 2002; PICKART et al., 2004; ESGUERRA et al., 2007; BILL et al., 2009).

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

1.7 AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS UTILIZANDO *Danio rerio* (ZEBRAFISH) COMO MODELO EXPERIMENTAL

A utilização do zebrafish como modelo *in vivo* para a descoberta de pequenas moléculas candidatas a drogas foi primeiramente proposta há 50 anos, este estudo já utilizava os embriões e larvas de zebrafish para a triagem de drogas sintéticas e produtos naturais (JONES; HUFFMAN, 1957). Porém, apenas em 2000 foi descrito o primeiro experimento utilizando placas de múltiplos poços. Desde então, mais de 60 trabalhos reportaram o uso do zebrafish para a realização de projetos inteiros visando à descoberta de medicamentos (RENNEKAMP; PETTERSON, 2015).

O zebrafish tem sido largamente utilizado para estudos de toxicidade ambiental caracterizando os danos provocados por diversos poluentes e é considerado o padrão ouro para avaliação de toxicidade ambiental e qualidade da água (SCHOLZ et al.,

2008). Diversas substâncias consumidas por humanos como flavonoides, drogas de abuso, alcaloides já foram testados quanto ao seu potencial teratogênico e embriotóxico sobre zebrafish (JONES et al., 1964; THOMAS, 1975; KIM et al., 2009; STEWART; KALUEFF, 2014; LU et al., 2014). Com a expansão da nanotecnologia o zebrafish vem ganhando espaço como modelo experimental para testes de segurança ambiental e de saúde dos mais variados nanomaterias e nanocompostos (SCHOLZ et al., 2008; LIN et al., 2013).

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

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

1.8 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS E COMPONENTES ISOLADOS DE PLANTAS UTILIZANDO *Danio rerio* (ZEBRAFISH) COMO MODELO EXPERIMENTAL

No que se refere à descoberta de produtos naturais, a triagem em larga escala de produtos naturais tem se expandido nos últimos anos. Além disso, os estudos utilizando o zebrafish como modelo experimental *in vivo* para teste de extratos de vegetais tem se tornado mais comum (VALLE-MOJICA; ORTÍZ, 2012; BANSODE et al., 2013; BENNEH et al., 2017). Os ensaios com zebrafish *in vivo* para descoberta de atividade de frações de extrato tem se mostrado bastante útil e muito explorado.

Atualmente, o zebrafish já foi utilizado para a triagem de diversas atividades de extratos de vegetais, dentre as quais estão a toxicidade de extratos e a ação destes sobre doenças neuropsiquiátricas.

1.9 DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS

A utilização do zebrafish para pesquisa em neurociências tem crescido bastante nos últimos anos (DARLAND; DOWLING, 2001; GERLAI et al., 2000; NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006; LEVIN; CHEN, 2004; STEWART; KALUEFF; GERLAI, 2014; FREIFELD et al., 2017).

Além da praticidade e do componente genético bem estudado, muitos sistemas de neurotransmissão já foram identificados nesta espécie, tais como: glutamatérgico (EDWARDS; MICHEL, 2002), colinérgico (BEHRA et al., 2002), dopaminérgico (BOEHMLER et al., 2004), serotoninérgico (RINK; GUO, 2004), purinérgico (KUCENAS et al., 2003; RICO et al., 2003) e gabaérgico (KIKUCHI et al., 2004).

1.9.1 Depressão

A depressão não é uma única doença, ela representa um espectro de distúrbios com sintomas sobrepostos ou compartilhados (NESTLER et al., 2002). Ela também é conhecida como transtorno depressivo maior (MDD, do inglês major depressive disorder) e tem um impacto significativo na saúde pública (KESSLER et al., 2003), sendo considerada o fator primordial de problemas de saúde e incapacidade no mundo.

De acordo com as últimas estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 300 milhões de pessoas vivem com depressão. A falta de apoio às pessoas com transtornos mentais, é um dos motivos que impedem muitas pessoas de acessarem o tratamento que necessitam para viver de forma saudável e produtiva (WHO, 2017). Esse transtorno pode ser crônico ou recorrente, prejudicando consideravelmente o desempenho do indivíduo nas suas tarefas cotidianas. Quase 90% dos indivíduos com depressão apresentam episódios recorrentes (KENNEDY, 2008). Os quadros mais graves podem levar ao suicídio.

A depressão é caracterizada por baixa autoestima, tristeza, sentimento de culpa, perda de interesse, cansaço, desânimo, baixa concentração e distúrbios de sono ou apetite (WHO, 2017). A etiologia dessa desordem pode ser genética e ambiental, apresentando relação com outros distúrbios psiquiátricos (EHLERS; FRANK; KUPFER, 1988; REGIER et al., 1998; MCDONALD; RICHARD; DELONG, 2003).

Diversos fatores aumentam a predisposição a depressão, como obesidade, sedentarismo, adversidade na infância e experiências traumáticas (CARPENTER et al., 2000; BLUMENTHAL et al., 2007; MORINA et al., 2013; TUNNARD et al., 2014). As principais hipóteses relativas à base biológica da depressão estão situadas nos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores. Monoaminas são a principal teoria envolvendo os neurotransmissores cerebrais. A suposição das monoaminas fundamenta-se no conceito da deficiência das aminas biogênicas como a causa das depressões (SCHILDRAUT, 1965; BUNNEY; DAVIS, 1965; VAN PRAAG; KORF, 1971; WILLNER, 1990).

A depressão é frequentemente relacionada com outros transtornos mentais, como ansiedade, transtorno da personalidade, dependência e abuso de drogas (REGIER, 1990; IKETANI et al., 2002).

1.9.2 Ansiedade

Um levantamento publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostra que 264 milhões de pessoas no mundo sofrem com transtornos de ansiedade. No Brasil são mais de 18 milhões de pessoas com algum transtorno de ansiedade (WHO, 2017).

A ansiedade é uma reação emocional adaptativa resultante de uma circunstância aversiva que causa sentimento de insegurança e impotência. É considerada uma condição fisiológica normal, no entanto a patologia é definida a partir do momento em que o sofrimento provocado pela ansiedade trazer prejuízos psicológicos e social ao indivíduo (BRAGA et al., 2010).

Ela é estabelecida por fatores emocionais e/ou comportamentais e fisiológicos. No contexto emocional pode-se manifestar sensação de medo, insegurança, apreensão e aumento do período de alerta. De acordo com a definição fisiológica a

ansiedade é um estado de funcionamento cerebral em que ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), ocasionando sintomas como insônia, taquicardia, palidez, aumento da respiração, tensão muscular, tremor, tontura, desordens intestinais, entre outros (MACKENZIE, 1989; ANDRADE; GORENSTEIN, 1998).

Diferentes vias de neurotransmissão fazem parte dos mecanismos de mediação da ansiedade, em especial, os sistemas gabaérgico e serotoninérgico assim como os dopamínicos, neuropeptídicos, entre outros (GRAEFF; GUIMARÃES, 2005).

O funcionamento dessas estruturas pode ser facilitado pelas aferências noradrenérgicas e serotoninérgicas advindas do mesencéfalo e drogas ansiolíticas reduziram a ação facilitadora dessas monoaminas (GRAY, 1984).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades ansiolítica, antidepressiva e os efeitos tóxicos agudo do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) em *Danio rerio* (zebrafish).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a concentração letal média (CL₅₀) e a dose letal média (DL₅₀) do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin*;
- ✓ Avaliar os efeitos da administração aguda das diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* sobre os parâmetros comportamentais e observação da mortalidade de *D. rerio* de ambos os sexos;
- ✓ Avaliar os efeitos da administração aguda (48 horas) das diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* sobre os parâmetros histopatológicos (brânquias, fígado, rins, intestino e cérebro) de *D. rerio* de ambos os sexos;
- ✓ Avaliar a atividade ansiolítica do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* no teste de preferência claro/escuro, bem como, suas possíveis correlações com as variáveis comportamentais;
- ✓ Avaliar a atividade antidepressiva do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* no teste de mergulho em tanque novo, bem como, suas possíveis correlações com as variáveis comportamentais.

Submetido ao Journal Ethnopharmacology

**Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic:
Pharmacological analysis on *Danio rerio* (zebrafish)
scototaxis**

Tafnis Ingret dos Santos Sampaio^{1,2}, Nayara Costa de Melo^{2,3}, Bianca Thais de Freitas Paiva², Gerley Anatê da Silva Aleluia², Fernando Luiz Pinheiro da Silva Neto², Heitor Ribeiro da Silva², Hady Keita⁴, Brenda Lorena Sánchez-Ortiz⁵, Elizabeth Arlen Pineda-Peña⁵, José Luis Balderas⁵, Andres Navarrete Castro⁵, José Carlos Tavares Carvalho^{1,2,6*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

²Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Curso de Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

⁴Universidad de la Sierra Sur, Division de Pós-Grado, Instituto de Investigación sobre la Salud Pública, Calle Guillermo Rojas Mijangos S/N, Ciudad Universitaria, Miahuatlán de porfirio Díaz, Oaxaca, Mexico

⁵Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Laboratorio de Farmacología de Productos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México.

⁶Rede Bionorte, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amapá

*Corresponding to author: email - farmacos@unifap.br

Abstract

Ethnobotanical relevance: *Spondias mombin* L. is a plant that is found dispersed throughout the tropical regions of South America, Africa, and Asia, being found mainly in the North and Northeast of Brazil, where the leaves are used in preparations for neuropsychiatric disorders. Therefore, it is of great importance to carry out studies in different pharmacological models that can prove the traditional use of this plant species.

Materials and methods: the hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm) was evaluated by oral administration (25 mg/kg) and by immersion (25 mg/l) in scototaxis test in *Danio rerio* (zebrafish). For this study, caffeine (100 mg/kg) and buspirone (25 mg/kg) were used as standard drugs.

Results: by the HPLC-UV fingerprint analysis, the HELSm presents several derivatives of polyphenolic compounds and flavonoids and identified ellagic acid and isoquercitrin. By immersion, the LC₅₀ was 49.86 mg/l in zebrafish. For all spatiotemporal and behavioral variables (time spent, white compartment, latency, toggle, erratic swimming, freezing duration, thigmotaxis, and risk assessment), the treatment with HELSm produced a similar effect to buspirone and was significant when compared to the caffeine and control group ($p < 0.01$, Tukey-Kramer test).

Conclusions: From the obtained results, it can be suggested that the acute administration of the HELSm in the scototaxis test in a zebrafish model (*Danio rerio*) produced an anxiolytic effect, devoid of hypnotic and sedative actions by immersion, and this action was improved when administered by oral via. Possibly, the presence of isoquercitrin in the leaves of *Spondias mombin* participates in the anxiolytic effect.

Keywords: *Spondias mombin*, scototaxis test, *Danio rerio*, zebrafish, anxiolytic.

1. Introduction

The World Health Organization (WHO) has shown that 264 million people worldwide suffer from anxiety disorders. In Brazil, there are more than 18 million people with some anxiety disorder (WHO, 2017).

Anxiety is an adaptive emotional reaction resulting from an aversive circumstance that causes feelings of insecurity and impotence. It is considered a standard physiological condition. However, the pathology is defined from the moment in which the suffering provoked by the anxiety brings psychological and social damages to the individual (Braga et al., 2010).

Anxiety is established by emotional and/or behavioral and physiological factors. In the psychological context, there may be a feeling of fear, insecurity, apprehension and an increase in the alert period. According to the physiological definition, anxiety is a state of cerebral functioning in which activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis occurs, causing symptoms such as insomnia, tachycardia, paleness, increased respiration, muscle tension, tremor, dizziness, and disorders like intestinal diseases, among others (Mackenzie, 1989; Andrade and Gorenstein, 1998).

Different pathways of neurotransmission are part of the mechanisms of anxiety mediation, especially the gabaergic and serotonergic systems, as well as dopamine and neuropeptide, among others (Graeff, 2005). The functioning of these structures can be facilitated by noradrenergic and serotonergic afferents from the midbrain, and anxiolytic drugs would reduce the facilitating action of these monoamines (Gray, 1984).

Therapy with medicinal plants may be an effective alternative for the treatment of various psychiatric disorders, including anxiety and control of the systems involved (Faustino et al., 2010).

Spondias mombin L. (Anacardiaceae) is found in the tropical area of South America, in parts of Asia, western India, and parts of Africa (Croat 1974; Ayoka et al. 2006). Phytochemical studies of the leaves detected the presence of tannins, saponins, glycosylated anthraquinones, alkaloids (Corthout et al., 1991; Abo et al., 1999; Njoku, and Akumefula, 2007; Silva et al., 2011), triterpenes (Fred-Jaiyesimi et al. 2009), and flavonoids (Njoku and Akumefula, 2007; Silva et al., 2012).

In Brazil and other South American countries, leaves are used in traditional medicine as anti-inflammatory, antitumoral, antidepressive, and anxiolytic (Elufioye et

al., 2017; Albuquerque et al., 2007; Lorenzi and Matos 2008; Offiah and Anyanwu 1989; Ayoka et al., 2005; Uchendu and Isek 2008).

Because *Spondias mombin* L. is a plant used by traditional medical practitioners in Nigeria in the treatment of various nervous disorders, Ayoka et al. (2005 and 2006) studied the anxiolytic properties of the aqueous, methanol and ethanol extracts of the leaves. However, these extracts were administered intraperitoneally, and the ethanol extract was effective in abolishing rats' aggressive attacks and reducing swimming time in mice.

The use of zebrafish for neuroscience research has grown in recent years (Gerlai et al. 2000; Ninkovic and Bally-Cuif 2006; Darland and Dowling 2001; Levin and Chen 2004; Stewart et al. 2014; Kalueff et al. 2014; Freifeld et al. 2017). The use of zebrafish is attractive for genetic studies because it is a useful intermediate between invertebrates and rodents (Guo, 2004). The vast majority of the genes discovered in this species are evolutionarily conserved and have homologs in mammals (Cerdà et al. 1998; Parng et al. 2002). The degree of homology is 70-80% (Barbazuk et al. 2000), allowing for the results found in this species to be more directly extrapolated to humans than those obtained in invertebrates (Parng et al. 2002) and more economically to rodents. In addition to its practicality and well-studied genetic component, this tool may be essential in the study of preparations that are popularly used to treat neurovegetative disorders.

Also, many neurotransmission systems have already been identified in this species, such as the glutamatergic (Edwards and Michel, 2002), cholinergic (Behra et al. 2002), dopaminergic (Boehmler et al. 2004), serotonergic (Rink and Guo 2004), purinergic (Kucenas et al. 2003; Rico et al. 2003) and gabaergic (Kikuchi et al. 2004) systems. Thus, the objective of this study was to evaluate the acute anxiolytic effect of the hydroethanolic extract of the leaves of *Spondias mombin* (HELSm) on the scototaxis (dark/light preference) protocol with *Danio rerio* (zebrafish) by oral and immersion administration.

2. Material and methods

2.1. Obtaining plant material

The leaves of *Spondias mombin* were collected in the city of Macapá (0°00'22.67": -51°06'57.60"), Amapá State, Brazil. A sample of fertile plant material

was identified and deposited in the Embrapa Herbarium of the Eastern Amazon (IAN), located in Belém, PA - Brazil, under the exsiccate number 195999.

The extract was obtained by maceration, from leaves crushed by turbolise, with a hydroethanolic solution (75%), for 48 hours. The extract was concentrated by rotaevaporator and then lyophilized, yielding 29.58%. It was stored in an amber bottle in a desiccator until the moment of use.

2.2. Analysis of HELSm by high-performance liquid chromatography

The analytical standards were purchased from ellagic acid and isoquercitrin (Sigma–Aldrich®, ≥ 98%). The solvents used in extract preparation were analytical grade and in HPLC analysis were HPLC grade solvents. The water was purified with a Milli-Q system (Millipore®, Bedford, USA). All solutions prepared for HPLC analysis were filtered through a 0.45 mm membrane before use.

Chromatographic analyses were performed using a method described by Cabral et al. (2016). An elution system with acetonitrile 100% (solvent A) and acetic acid 1%, adjusted to pH 3 (solvent B) at the follow gradient flow was used: 0–30 min, a linear change from A:B (13:87, v/v) to A:B (15:85, v/v); 30–40 min, an isocratic elution with A:B (15:85, v/v); 40–45 min, a linear variation up to A:B (20:80, v/v). The flow rate was kept constant at 1 ml/min, and the chromatograms were recorded at 340 nm, whereas the UV spectra were monitored at a wavelength of 220-540 nm. The peaks were characterized by comparison of their retention times and UV spectra with the reference standards and by a co-injection (extract + reference standard). The references standards were prepared in H₂O:methanol (1:1, v/v). The HELSm extract was analyzed at 5 mg/ml.

The apparatus was an HPLC-UV Shimadzu, Class-VP (Japan) equipped with a high-pressure pump (LC-20 AT); automatic sampler (SIL-20AC) and UV detector SPD 20A. A column C-18 Watters® at 30°C was used with a guard column.

2.3. Animal

Animals of both sexes of the species *Danio rerio* (wild strain type, 6 months of age, 3.5-4.0 cm in length and weighing on average 650 mg) were used from Acqua New Aquarium and Fish Ltda. ME, Igarassu-PE, Brazil. The animals were kept in the Zebrafish Platform of the Laboratory of Research on Drugs, Federal University of

Amapá, at a temperature of $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ with a light/dark cycle of 12 h. Feeding was carried out twice daily with *Artemia salina* and/or own ration for the species.

The experimental protocols are in accordance with the legislation for animal experimentation established by the National Council of Animal Experimentation of Brazil (CONCEA). The project was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Amapá-UNIFAP under protocol number 003/2017.

2.4. Determination of the LC_{50}

In a 1-liter aquarium, the HELSm was diluted in different concentrations (25, 50, 75 mg/l). Each concentration was performed in triplicate, using 12 animals for each concentration, and the fish remained in contact with the solution for 48 hours. During this period the animals were observed, the behavioral changes and mortality were recorded. For the determination of the LC_{50} , the probit test was used.

2.5. Drugs and route of administration

Oral administration (gavage, $n = 4$ / group) was based on the method described by Collymore et al. (2013) with modifications, using the following doses, in the volume of $2\mu\text{l}/\text{animal}$: caffeine 100 mg/kg (anhydrous, Jilin Shulan Co., CA201609033, China), buspirone 25 mg/kg (Libbs Pharmaceutical Ltda., lote 16I0258, São Paulo), HELSm 25 mg/kg (dose established from the toxicity study), and the control group (treated with distilled water, $2\mu\text{l}/\text{animal}$).

In immersion administration ($n = 4/\text{group}$), each drug was diluted in distilled water in the following dilutions: caffeine 100 mg/l, buspirone 25 mg/l, HELSm (25 mg/l), and the control group had contact with distilled water only. Each animal in the specific group was exposed to the solution containing the drug for 30 minutes. Then, individually, it was submitted for a scototaxis test.

2.6. Scototaxis test in zebrafish

This assay was based on the method described by Maximino et al. (2010), which consisted in the use of a specific aquarium for this type of test (Maximino et al., 2007; Maximino et al., 2010), comprising of a black and a white side and a 75 W lamp that was placed 1.80 m high in the center of the apparatus. The experiments were recorded using a video camera (Nikon D3300) positioned 56 cm above the test tank.

The individualized behavioral analysis was performed through the Any-maze[®] software (Stoelting CO, EUA).

After oral treatment or immersion, individually, each animal was placed in the central compartment of the apparatus for acclimatization for 3 minutes. After this period, the hatches delimiting the central compartment were removed, and thus, the behavior of the animals was recorded for 15 minutes. Data from animals that did not cross the midline in the 15-minute session were discarded to prevent false positives in preference measures (Noakes and Baylis, 1990).

In the individualized behavioral analysis, the following spatiotemporal and behavioral variables were recorded (Maximino et al., 2010): time spent in the white compartment (s), latency, (s, time to enter the white compartment), toggle (n, the total number of times that the center-point of the animal crossed through the center of the tank that divided the black and white compartments), erratic swimming (n), freezing duration (s, the proportion of the time spent in the white compartment that the animal was immobile, moving less than 0.75 cm/s), duration of thigmotaxis (s, the proportion of the time spent in the white compartment used in sustained swimming at a distance of up to 2 cm of the nearest wall), and risk assessment (n).

2.7. Statistical analysis

For statistical analysis of the obtained results, the GraphPad Prism Software (version 6.0) was used. For the determination of the LC₅₀ the probit test was used and ANOVA (one-way) was applied for data analysis, followed by the Tukey-Kramer test for comparison of the test and control groups. The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation of the mean. Values with $p < 0.01$ were considered significant.

3. Results

3.1. Analysis of HELSm by high-performance liquid chromatography

The HPLC-UV fingerprint analysis of each peak showed that the HELSm presents several derivatives of polyphenolic compounds and flavonoids (Figure 1). Ellagic acid (rt = 36,861 min) and isoquercitrin (rt = 39,547) were identified and determined by comparison of their retention times and UV spectra with the reference standards and by a co-injection (extract + reference standard).

3.2. Determination of the LC₅₀

From the exposure of the animals by immersion at the concentrations of 25, 50 and 75 mg/l of HELSm, the determined LC₅₀ was 49.86 mg/l (Table 1).

3.3. Scototaxis test in zebrafish

In the two different routes of administration (oral and immersion), significant differences were observed in the time spent in the white compartment, whereas the various groups treated with HELSm presented more extended time in the white compartment, compared to the caffeine and control groups (Figure 2).

As for the latency time to enter the white compartment of the aquarium, treatments with buspirone and HELSm by immersion and oral administration presented similar results, with a significant decrease when compared to the control and caffeine groups (Figure 3, $p < 0.01$). About the number of alternations (toggle) shown in Figure 4 (by immersion and oral), the HELSm and buspirone groups presented a more significant number, rotating more times between one compartment and another. when compared to the control and caffeine groups ($p < 0.01$).

Significant differences ($p < 0.01$) were observed in the number of erratic swimming events in the white compartment. The HELSm group showed a decrease in erratic swimming similar to that found for buspirone; both opposed to the caffeine group that presented the highest erratic swimming, followed by the control group. These results were identical for the two treatment routes (immersion and oral, Figure 5). This same behavior was observed for the duration of freezing in the white compartment (Figure 6, $p < 0.01$), since the buspirone and HELSm groups had a lower freezing time recorded compared to the caffeine group that presented similar activity to the control.

For thigmotaxis (Figure 7), the immersion and oral routes presented similar activities. The HELSm and buspirone groups produced less thigmotaxis than the control and caffeine groups ($p < 0.01$). The risk assessment events were altered (Figure 8); the treatment with HELSm produced similar activity to the buspirone group, in which the risk assessment was lower than the caffeine group that presented a higher risk assessment in comparison to the control group.

4. Discussion

Cabral et al. (2016) reported the presence of several polyphenolic compounds with four major peaks (chlorogenic acid, ellagic acid, isoquercitrin and one no

identified). Ellagic acid has also been detected by HPLC in the leaves' methanolic extract (Silva et al, 2012).

In the determination of LC₅₀, it was observed that up to the concentration of 25 mg/l HELSm by immersion, it did not produce a marked behavioral change in the animals, only increased swimming activity in the initial minutes. However, Ayoka et al. (2006) determined the LD₅₀ in mice intraperitoneally for the aqueous, methanolic, and ethanolic of *S. mombin* L. leaves extracts of 480 mg/kg, 1.1 g/kg, and 1.36 g/kg, respectively, and in rats was 620 mg/kg, 1.08, and 1.42 g/kg.

In the present study, we demonstrated the effects of HELSm by immersion and gavage administration (oral) on *Danio rerio* (zebrafish), relating to the effects of caffeine and buspirone on the same routes of administration and comparing with the control group, treated with water.

According to Serra, Medalha and Mattioli (1999), staying longer on the dark side of the aquarium is a typical reaction of zebrafish. This preference for the dark seen in the scototaxis test represents a typical defensive strategy of the species as if it were a predator avoidance behavior (Rosemberg et al., 2011). This reaction was observed in the control and caffeine-treated groups, thus indicating the possible anxiogenic effect of caffeine on zebrafish, while the group treated with HELSm, as well as with buspirone, demonstrated that these substances produced an anxiolytic effect on the scototaxis test (light/dark preference test, Figure 2). Previous studies have shown in adult zebrafish that treatment with the 5-HT_{1A} receptor partial agonist, buspirone, produced markedly anxiolytic effects (Bencan et al. 2009; Maaswinkel et al. 2012; Gebauer et al. 2011; Maaswinkel et al. 2013; Laua et al. 2011; Maximino et al. 2011).

The higher latency to enter the light side of the apparatus, after going through the dark side, is indicative that the animal prefers the dark side (Serra, Medalha and Mattioli, 1999), indicating defensive behavior. The latency to the clear compartment output was statistically significant for the caffeine-treated group when compared to the groups treated with HELSm and buspirone, either by immersion or by oral route (Figure 3). This result is in agreement with the data described by Maximino (2011), which indicates that the dose of 100 mg/kg of caffeine potentiates the anxiogenesis. In rodents, the tendency was to search for the dark compartment in the light/dark box test after administration of caffeine (Bradley et al. 2011).

The number of alternations of the caffeine group was the least when compared with the other groups; the HELSm and buspirone groups obtained the

higher number of alternations (Figure 4). The innate aversion of rodents to light environments is measured from anxiogenic components and expressed in behaviors such as the lower exposure to the light side of the box and the smaller number of alternations between the compartments (Bourin and Hascoët 2003), as observed in zebrafish.

Erratic swimming is another parameter used to assess anxiety. Anxiolytic drugs reduce anxiety-like behaviors, while anxiogenic agents potentiate these responses (Kalueff et al. 2013). In a factorial analysis, this behavior varies according to the preference for darkness (Blaser et al. 2010). This finding was observed in this study because the number of erratic swimming events was significantly higher in the caffeine group (oral and immersion) and lower in the HELSm treated group (Figure 5). In the scototaxis test (light/dark preference), erratic swimming varies along with the latency for the first entry into the white compartment and with the risk assessment (Maximino et al. 2014).

In this study, the freezing time was significantly visible in the white compartment of the apparatus for the caffeine-treated group, such as the control group. The HELSm-treated group, as well as buspirone, decreased this behavior, strengthening the anxiogenic response of caffeine and anxiolytic HELSm and buspirone (Figure 6). According to Blaser et al. (2010), this may be the variable that best confirms the increase in anxiety in the scototaxis test.

Among the behavior variables formulated by Kalueff et al. (2013), thigmotaxis is one of the indicators of anxiety in zebrafish. The animal searches for a place of the apparatus in which it feels protected. This behavior is potentiated with the treatment with anxiogenic drugs (Maximino, 2011). For this thigmotactic evaluation, the animals treated with caffeine had a long time for this behavior, similar to the control group, to the groups treated with HELSm and buspirone (Figure 7).

For the risk assessment parameter, the caffeine group showed a significant number for this event, followed by the control group that naturally presents this reaction because the zebrafish recognizes the new environment. The HELSm treated group had a lower number of risk assessments, as did the buspirone group (Figure 8). Anxiety can be defined as a risk assessment behavior in situations where the threat is not high, but it is potential and may occur from exposure to new environments, negative subjective experiences, or through a possible aversive stimulus to the environment (Blanchard, 1990; Graeff, 2007; Graeff and Zangrossi Jr, 2010). The frequent

manifestation of this behavior leads to the development of anxiety disorder, and this disease is becoming more prevalent in several countries.

The study by Ayoka et al. (2006) with *Spondias mombin* leaves extracted with aqueous, methanol and ethanol solvents demonstrated the presence of tannins, anthraquinones, flavonoids, glycosides and saponins in the aqueous ethanolic and methanolic extracts. In this study, the HELSm presents several derivatives of polyphenolic compounds and flavonoids (Ellagic acid and isoquercitrin, figure 1). Aguirre-Hernández et al. (2016) demonstrated that the flavonoid mixture, composed of quercetin, isoquercitrin, and rutin, was identified as partially responsible for the anxiolytic and sedative-like effects of *Tilia americana* var. Mexicana with GABAergic and serotonergic participation. Therefore, the presence of isoquercitrin can be related to the results obtained in this study for HELSm.

This set of analyzes was carried out on the scototaxis test, obtaining significant results for the treatments with HELSm, either by immersion or by oral route, presenting no differences between the routes, as well as for the group treated with buspirone, an anxiolytic drug, supports the hypothesis already reported by other authors, who used different animal models, such as studies by Ayoka et al. (2005 and 2006) that demonstrated the anxiolytic properties of the aqueous, methanol and ethanol extracts of the leaves of *Spondias mombin* L., but by intraperitoneal route, and the study by Asuquo et al. (2013) which demonstrated that an orally administered to rats aqueous extract of *Spondias mombin* has a learning and memory enhancing potential at low dose.

Ayoka et al. (2006) demonstrated in mice and rats that the leaves extract of *Spondias mombin* contains compound(s) with sedative, anticonvulsant, and antipsychotic properties, and these neuropharmacological properties are possibly mediated via the facilitation of GABA transmission as well as the blockade of D₂ receptors. Therefore, the association of different studies is of great importance for the validation of traditional use as is the case of *Spondias mombin* leaf phytopreparations, which are widely used in the Brazilian Amazon region mainly in cases of neuropsychiatric disorders.

It is necessary to emphasize that the results obtained in this study using *Danio rerio* (zebrafish), a model currently widely accepted for behavioral studies, using two different routes of administration and the most traditional form of popular use, which

was a hydroethanolic extract, help to explain the positive results previously obtained at the nonclinical level and the popular use by diverse traditional populations.

5. Conclusion

Considering the experimental results obtained in this study, it can be suggested that EHEFSm demonstrated anxiolytic action devoid of hypnotic and sedative effect by immersion, and this effect was improved orally (gavage) with the acute administration on the scototaxis test/dark in model *Danio rerio* (zebrafish). Possibly, the presence of isoquercitrin in the leaves of *Spondias mombin* participates in the anxiolytic effect.

The mechanism of action of the anxiolytic activity observed in this study, considering the animal model used (scototaxis test), seems to involve modulation of the serotonergic and/or noradrenergic systems, possibly by the regulation of the monoaminergic system.

Acknowledgment

The authors thank CAPES Pró-Amazonia Proc. Auxpe - 3292/2013 and Proc. 88881.120909/2016-01 (Estágio Senior), CNPq – RAPBioFar Proc. 407768/2013-0 for the financial support, CAPES for the student scholarship awarded to the first author, and Universidad Nacional Autónoma de México – Programa de Estancias de Investigacion (PREI-2017).

Authors' contributions

TISS, NCM, BTFP, GASA, and FLPSN carried out in-vivo tests under the supervision of JCTC and HK. HRS, BLSO and JLB did the phytochemical profiling with HPLC-UV studies. EAPP, ANC and JCTC prepared the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

References

- Abo, K.A., Ogunleye, V.O., Ashidi, J.S., 1999. Antimicrobial Potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. *Phytotherapy Research*. 13, 494–497.

- Aguirre-Hernández, E., González-Trujano, M.E., Terrazas, T., Santoyo, J.H., Guevara-Fefer, P., 2016. Anxiolytic and sedative-like effects of flavonoids from *Tilia americana* var. mexicana: GABAergic and serotonergic participation. *Salud Mental*. 39(1), 37-46.
- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., Lins Neto, E.M.F., Melo, J.G., Santos, J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*. 114, 325-354.
- Andrade, L.H.S.G. and Gorenstein, C., 1998. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. *Revista Psiquiatria Clínica*. 25(6), 285-290.
- Asuquo, O.R., Udonwa, U.N., Eluwa, M.A., Ekanem, T.B., 2013. Effects of *Spondias mombin* Leaf Extract on the Cytoarchitecture of the Cerebral Cortex and on Learning and Memory in Wistar Rats. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 2(9), 5-8.
- Ayoka, A.O., Akomolafe, R.O., Iwalewa, E.O., Ukponmwan, O.E., 2005. Studies on the Anxiolytic Effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*. 2(2), 153-165.
- Ayoka, A.O., Akomolafe, R.O., Iwalewa, E.O., Akanmu, M.A., Ukponmwan, O.E., 2006. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 103, 166-175.
- Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J.A., McPherson, J.D., Johnson, S.L., 2000. The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. *Genome Research* 10, 1351–1358.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strähle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience*. 5, 111-118.
- Bencan, Z., Sledge, D., Levin, E.D., 2009. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 94, 75-80.
- Blanchard, D.C. and Blanchard, R.J., 1990. Behavioral Correlates of Chronic Dominance-Subordination Relationships of Male Rats in a Seminatural Situation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 14(4), 455-462.
- Blaser, R.E., Chadwick, L., McGinnis, G.C., 2010. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*. 208, 56–62.
- Boehmler, W., Obrecht-Pflumio, S., Canfield, V., Thisse, C., Thisse, B., Levenson, R., 2004. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Developmental Dynamics*. 230(3), 481-493.
- Bourin, M. and Hascoët, M., 2003. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*. 463(1-3), 55-65.
- Bradley, B.F., Bridges, N.J., Starkey, N.J., Brown, S.L., Lea, R.W., 2011. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on male and female gerbils in the black-white box. *Behavioural Brain Research*. 216(1), 285-292.
- Braga, J.E.F., Pordeus, L.C., Silva, A.T.M.C., Pimenta, F.C.F., Diniz, M.F.F.M., Almeida, R.N., 2010. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 14(2), 93-100.
- Cabral, B., Siqueira, E.M.S., Bitencourt, M.A.O., Lima, M.C.J.S., Lima, A.K., Ortmann, C.F., Chaves, V.C., Fernandes-Pedrosa, M.F., Rocha, H.A.O., Scortecchi, K.C., Reginatto, F.H., Giordani, R.B., Zucolotto, S.M., 2016. Phytochemical study and

- anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 26, 304-311.
- Cerdà, J., Conrad, M., Markl, J., Brand, M., Herrmann, H., 1998. Zebrafish vimentin: molecular characterization, assembly properties and developmental expression. *European Journal of Cell Biology*. 77, 175-187.
- Collymore, C., Rasmussen, S., Tolwani, R.J., 2013. Gavaging Adult Zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*. 78, 1-5.
- Corthout, J., Pieters, L., Claeys, M., Berghe, D.V., Vlietinck, A.J., 1991. Antiviral Ellagitannins from *Spondias mombin*. *Phytochemistry*. 30, 1129-1130.
- Croat, T.B., 1974. A Reconsideration of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 61(2), 483-490.
- Darland, T. and Dowling, J.E., 2001. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(20), 11691–11696.
- Edwards, J.G. and Michel, W.C., 2002. Odor-Stimulated Glutamatergic Neurotransmission in the Zebrafish Olfactory Bulb. *Journal of Comparative Neurology*. 454(3), 294–309.
- Elufioye, T.O., Obuotor, E.M., Agbedahunsi, J.M., Adesanya, S.A., 2017. Anticholinesterase constituents from the leaves of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). *Biologics*. 11, 107-114.
- Faustino, T.T., Almeida, R.B., Andreatini, R., 2010. Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 32(4), 429-436.
- Fred-Jaiyesimi, A., Kio, A., Wilkins, R., 2009. α -Amylase inhibitory effect of 3 β -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf. *Food Chemistry*. 116, 285-288.
- Freifeld, L., Odstrcil, I., Förster, D., Ramirez, A., Gagnon, J.A., Randlett, O., Costa, E.K., Asano, S., Celiker, O.T., Gao, R., Martin-Alarcon, D.A., Reginato, P., Dick, C., Chen, L., Schoppik, D., Engert, F., Baier, H., Boyden, E.S., 2017. Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114(50), E10799-E10808.
- Gebauer, D.L., Pagnussat, N., Piato, A.L., Schaefer, I.C., Bonan, C.D., Lara, D.R., 2011. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 99(3), 480-486.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 67(4), 773-782.
- Graeff, F.G. and Guimarães, F.S., 2005. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. 2ª Edição. Atheneu.
- Graeff, F.G., 2007. Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 29, S3-6.
- Gray, J.A. 1984. The Neuropsychology of Anxiety. In: Pawlik K. (eds), *Fortschritte der Experimentalpsychologie. Lehr-und Forschungstexte Psychologie*, Springer, Berlin, Heidelberg. 5, 52-71.
- Graeff, F.G. and Zangrossi, H.Jr., 2010. The Dual Role of Serotonin in Defense and the Mode of Action of Antidepressants on Generalized Anxiety and Panic Disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 10, 207-217.

- Guo, S., 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes, Brain and Behavior*. 3(2), 63-74.
- Kalueff, A.V., Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhauss, S.C., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*. 10(1), 70-86.
- Kalueff, A.V., Stewart, A.M., Gerlai, R., 2014. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacological Sciences*. 35(2), 63-75.
- Kikuchi, Y., Verkade, H., Reiter, J.F., Kim, C.H., Chitnis, A.B., Kuroiwa, A., Stainier, D.Y., 2004. Notch signaling can regulate endoderm formation in zebrafish. *Developmental Dynamics*. 229(4), 756-762.
- Kucenas, S., Li, Z., Cox, J.A., Egan, T.M., Voigt, M.M., 2003. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience*. 121, 935-945.
- Lau, B.Y., Mathur, P., Gould, G.G., Guo, S., 2011. Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(6), 2581-2586.
- Levin, E.D. and Chen, E., 2004. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*. 26, 731-735.
- Lorenzi, H. and Matos, F.J.A., 2008. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 544p.
- Maaswinkel, H., Le, X., He, L., Zhu, L., Weng, W., 2013. Dissociating the effects of habituation, black walls, buspirone and ethanol on anxiety-like behavioral responses in shoaling zebrafish. A 3D approach to social behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 108, 16-27.
- Maaswinkel, H., Zhu, L., Weng, W., 2012. The immediate and the delayed effects of buspirone on zebrafish (*Danio rerio*) in an open field test: a 3-D approach. *Behavioural Brain Research*. 234(2), 365-374.
- Mackenzie, J.W., 1989. Daycase anaesthesia and anxiety A study of anxiety profiles amongst patients attending a day bed unit. *Anaesthesia*. 44(5), 437-440.
- Maximino, C., Brito, T.M., Moraes, F.D., Oliveira, F.V.C., Taccolini, I.B., Pereira, P.M., Colmanetti, R., Gazolla, R.A., Tavares, R.I., Rodrigues, S.T.K., Valéria, S., Pontes, A.A.A., Romão, C.F., Prado, V.M., Gouveia Júnior, A., 2007. A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *International Journal of Comparative Psychology*. 20(4), 351-367.
- Maximino, C., Brito, T.M., Colmanetti, R., Pontes, A.A.A., Castro, H.M., Lacerda, R.I.T., Morato, S., Gouveia Júnior, A., 2010. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behavioural Brain Research*. 210(1), 1-7.
- Maximino, C., 2011. Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*) by environmental stressors. *Psychology & Neuroscience*. 4(1), 149-155.
- Maximino, C., Silva, A.W.B., Gouveia Júnior, A., Herculano, A.M., 2011. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 35(2), 624-631.
- Maximino, C., Brito T.M., Dias, C.A.G.M., Gouveia Júnior, A., Morato S., 2010. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*. 5, 209-216.

- Maximino, C., Silva, A.W.B., Araújo, J., Lima, M.G., Miranda, V., Puty, B., Benzecry R., Picanço-Diniz, D.L.W., Gouveia Júnior, A., Oliveira, K.R.M., Herculano, A.M., 2014. Fingerprinting of Psychoactive Drugs in Zebrafish Anxiety-Like Behaviors. *Plos One*. 9(7), 1-8.
- Ninkovic, J. and Bally-Cuif, L., 2006. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. 39(3), 262-274.
- Njoku, P.C. and Akumefula, M.I., 2007. Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias Mombin* Leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*. 6(6), 613-615
- Noakes, D.L.G. and Baylis, J.R., 1990. Behavior. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. *Methods for Fish Biology*. Bethesda: American Fisheries Society. p. 555-584.
- Offiah, V.N. and Anyanwu, I.I., 1989. Abortifacient activity of an aqueous extract of *Spondias mombin* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 26(3), 317-320.
- Parng, C., Seng, W.L., Semino, C., McGrath, P., 2002. Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. *Assay and Drug Development Technologies*. 1(1):41-48.
- Rico, E.P., Senger, M.R., Fauth, M.G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD., 2003. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sciences* 73, 2071-2082.
- Rink, E. and Guo, S., 2004. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*. 127(1), 147-154
- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Mussulini, B.H.M., Piato, A.L., Calcagnotto, M.E., Bonan, C.D., Dias, R.D., Blaser, R.E., Souza, D.O., Oliveira, D.L., 2011. Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. *Plos one*. 6(5), 1-11.
- Serra, E.L., Medalha, C.C. and Mattioli, R., 1999. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32, 1551-1553.
- Silva, A.R.A., Morais, S.M., Marques, M.M., Lima, D.M., Santos, S.C.C., Almeida, R.R., Vieira, I.G.P., Guedes, M.I.F., 2011. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 17(4), 406-413.
- Silva, A.R.A., Morais, S.M., Marques, M.M., Oliveira, D.F., Barros, C.C., Almeida, R.R., Vieira, I.G., Guedes, M.L., 2012. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. *Pharmaceutical Biology*. 50(6), 740-746.
- Stewart, A.M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., Kalueff, A.V., 2014. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci*. 37(5), 264-278.
- Uchendu, C.N. and Isek, T., 2008. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. *African Health Sciences* 8(3), 163-167.
- World Health Organization (WHO), 2017. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: WHO/MSD/MER, 2017, 22p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>. Acesso: 15 de Novembro de 2017.

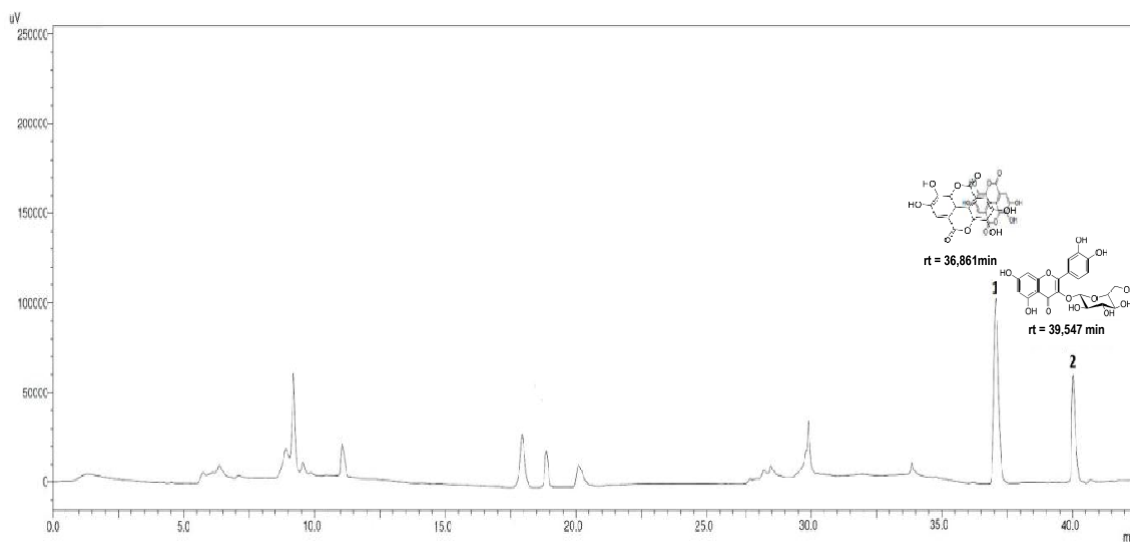


Figure 1. HPLC-UV chromatogram of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves. 1) Ellagic acid (rt = 36,861min) and 2) Isoquercitrin (rt = 39,547 min). Detection wavelength at 340 nm, whereas the UV spectra were monitored at wavelength of 220-540 nm.

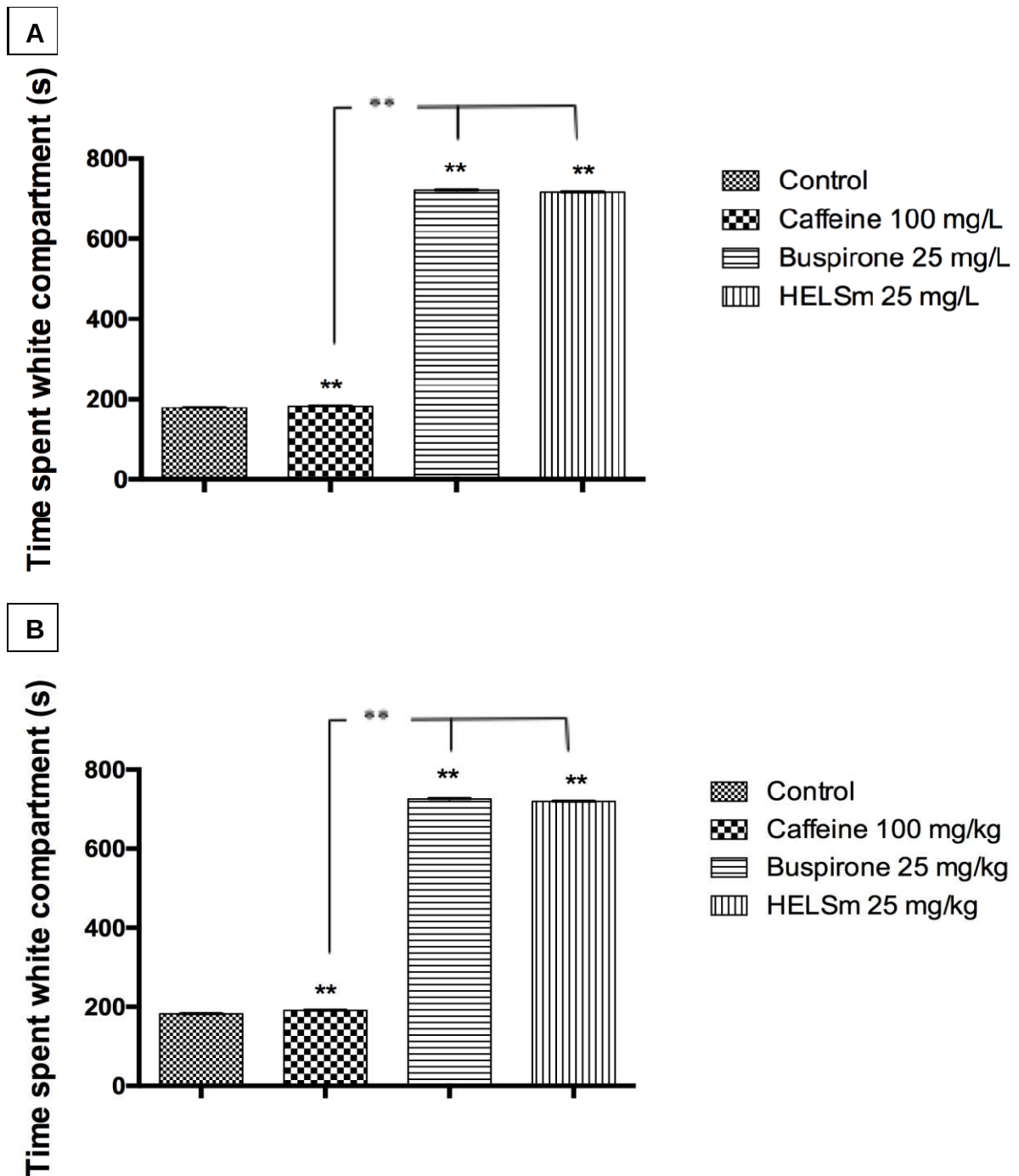


Figure 2. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (time spent white compartment). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p < 0.01 vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one –way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.

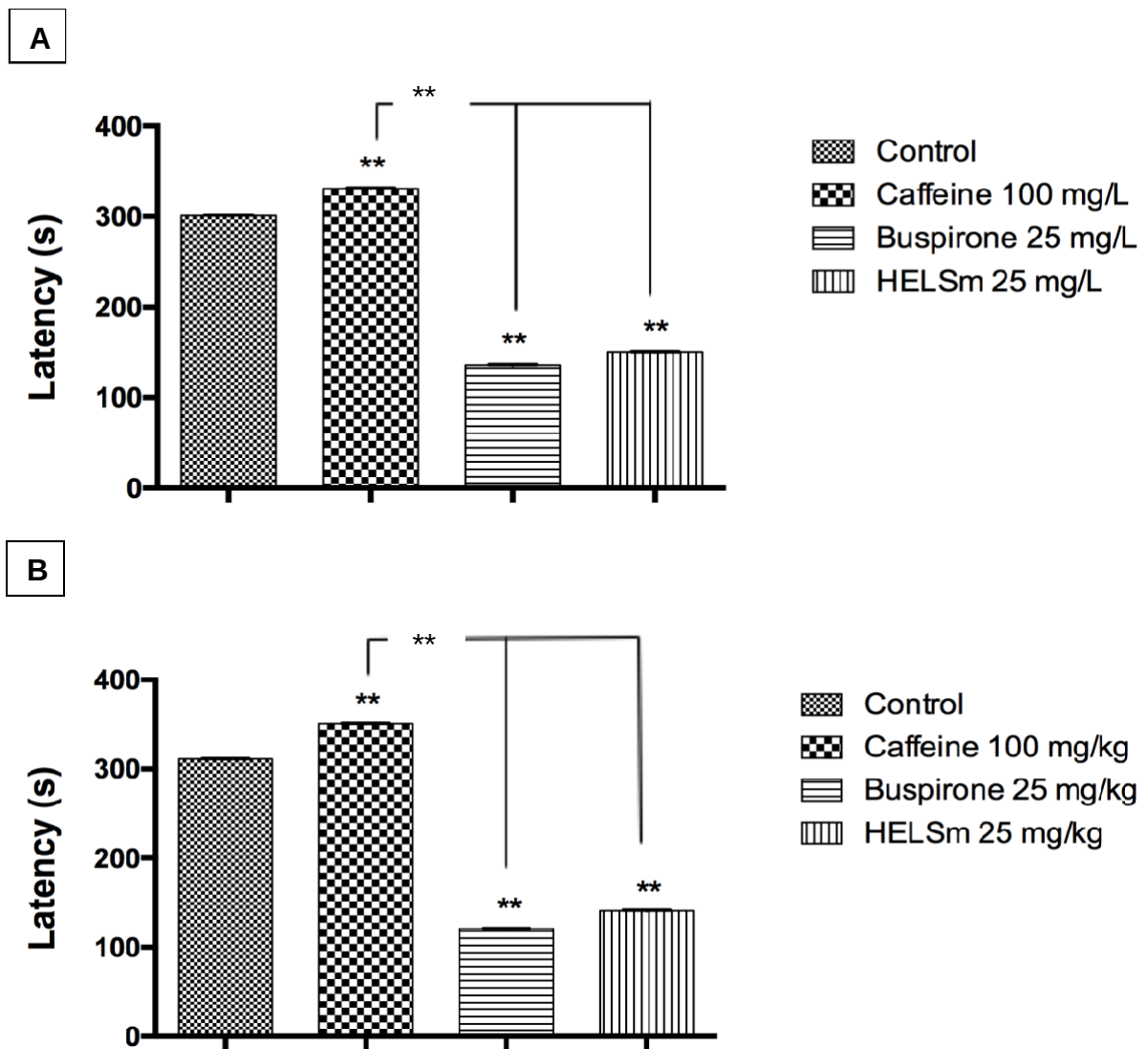


Figure 3. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (latency). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p < 0.01 vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one – way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.

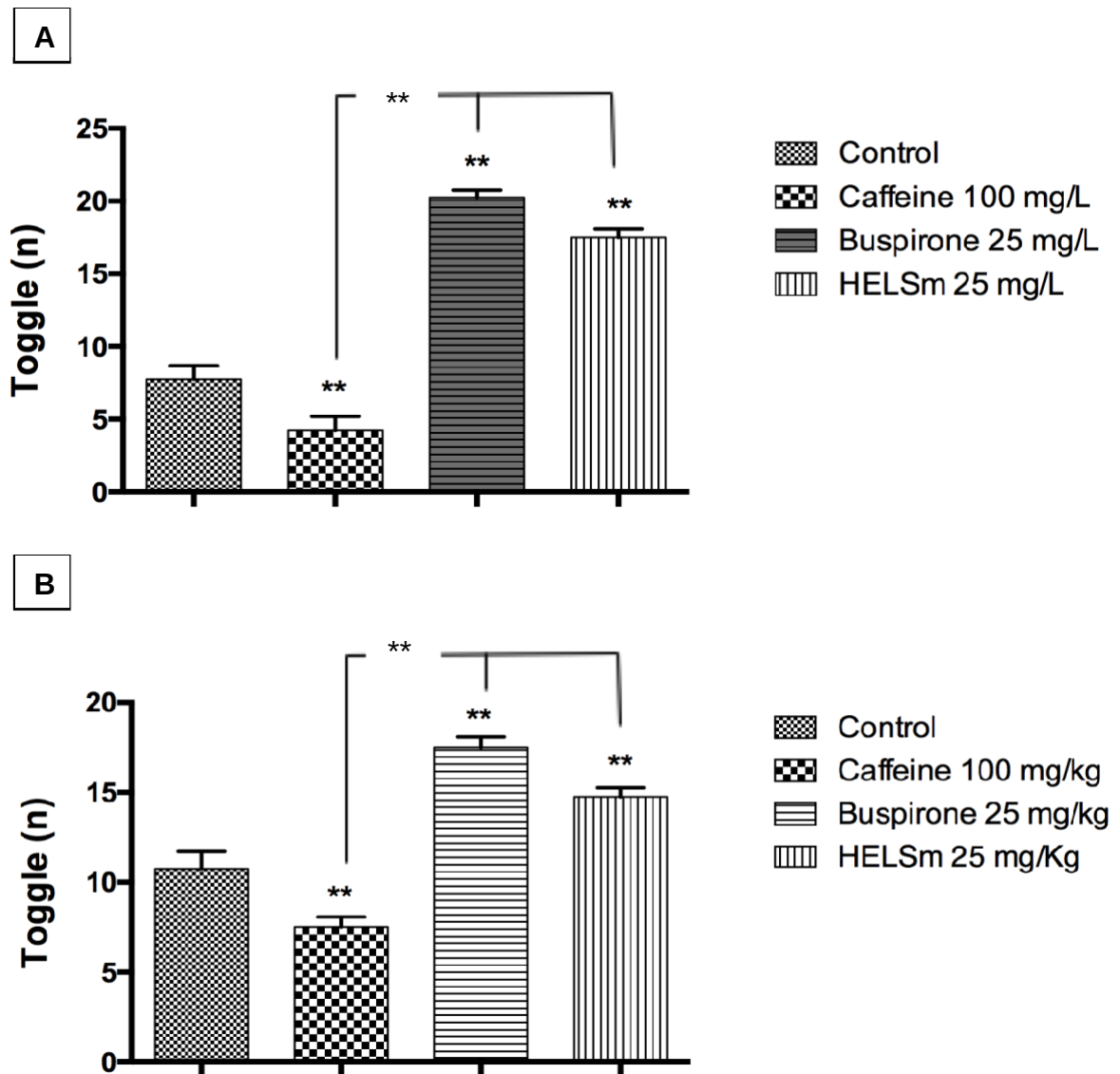


Figure 4. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (toggle). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p < 0.01 vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one – way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.

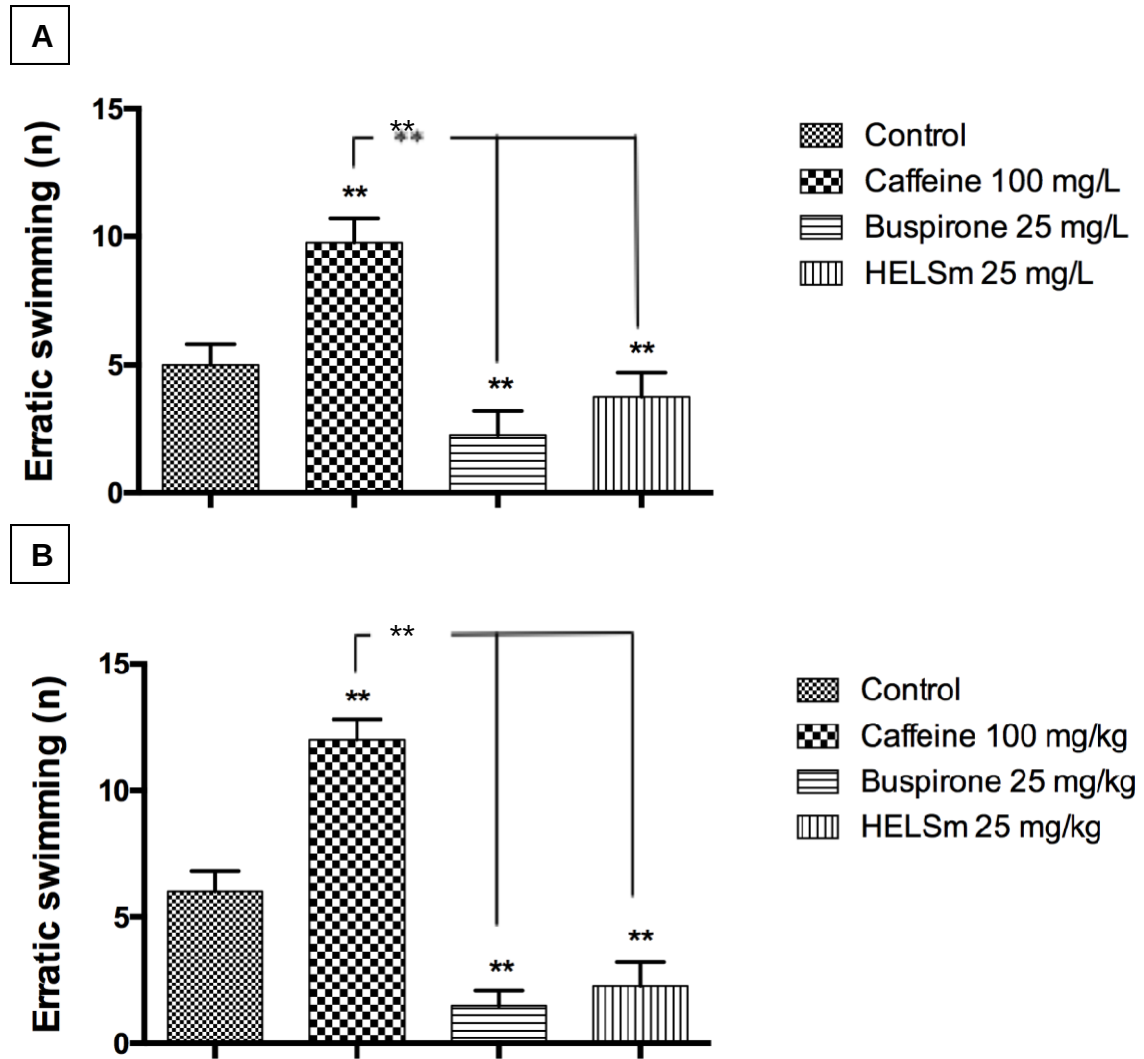


Figure 5. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (erratic swimming). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n= 12/groups), ** p < 0.01 vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one -way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.

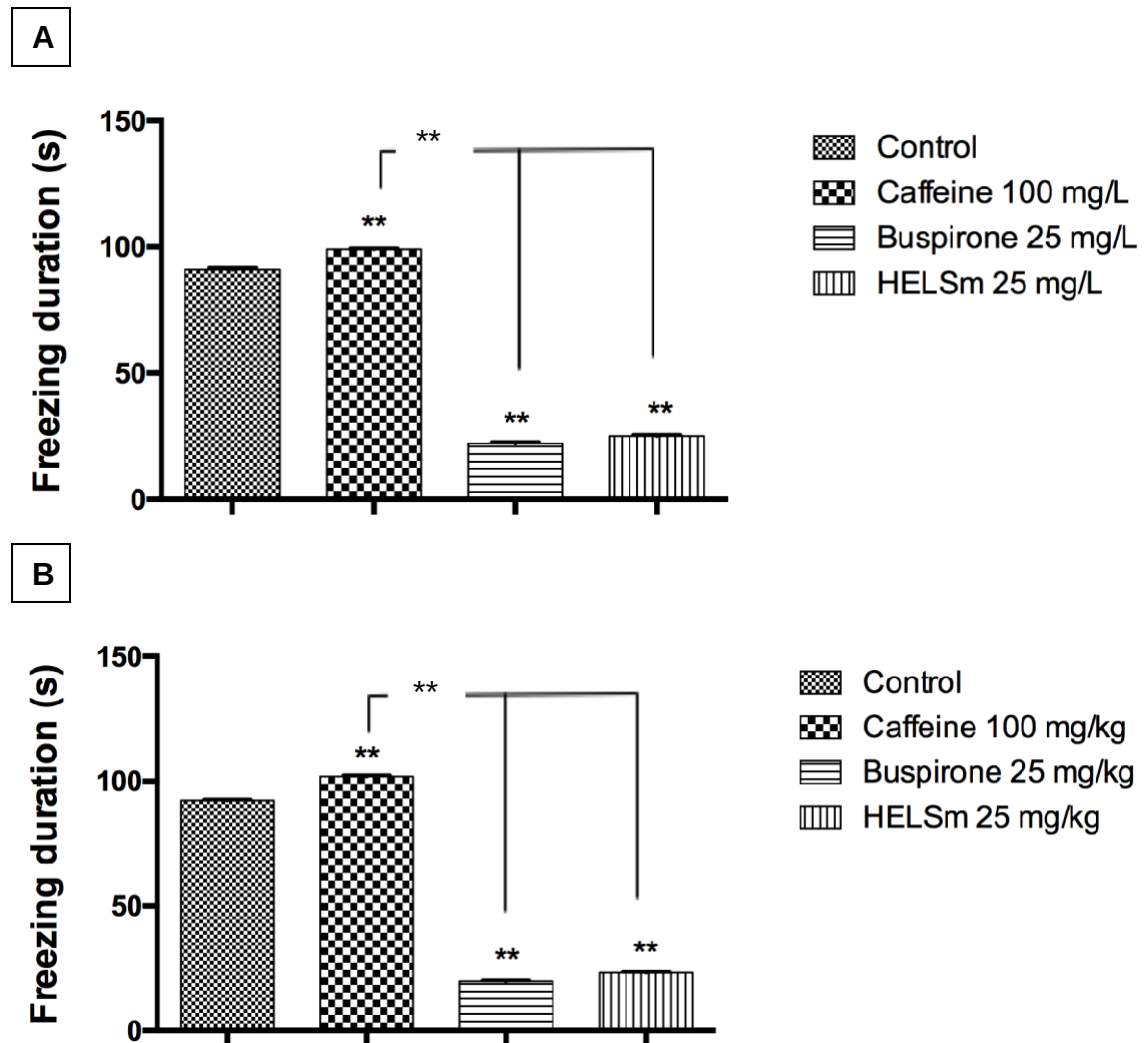


Figure 6. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (freezing duration). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 12$ /groups), ** $p < 0.01$ vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one -way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.

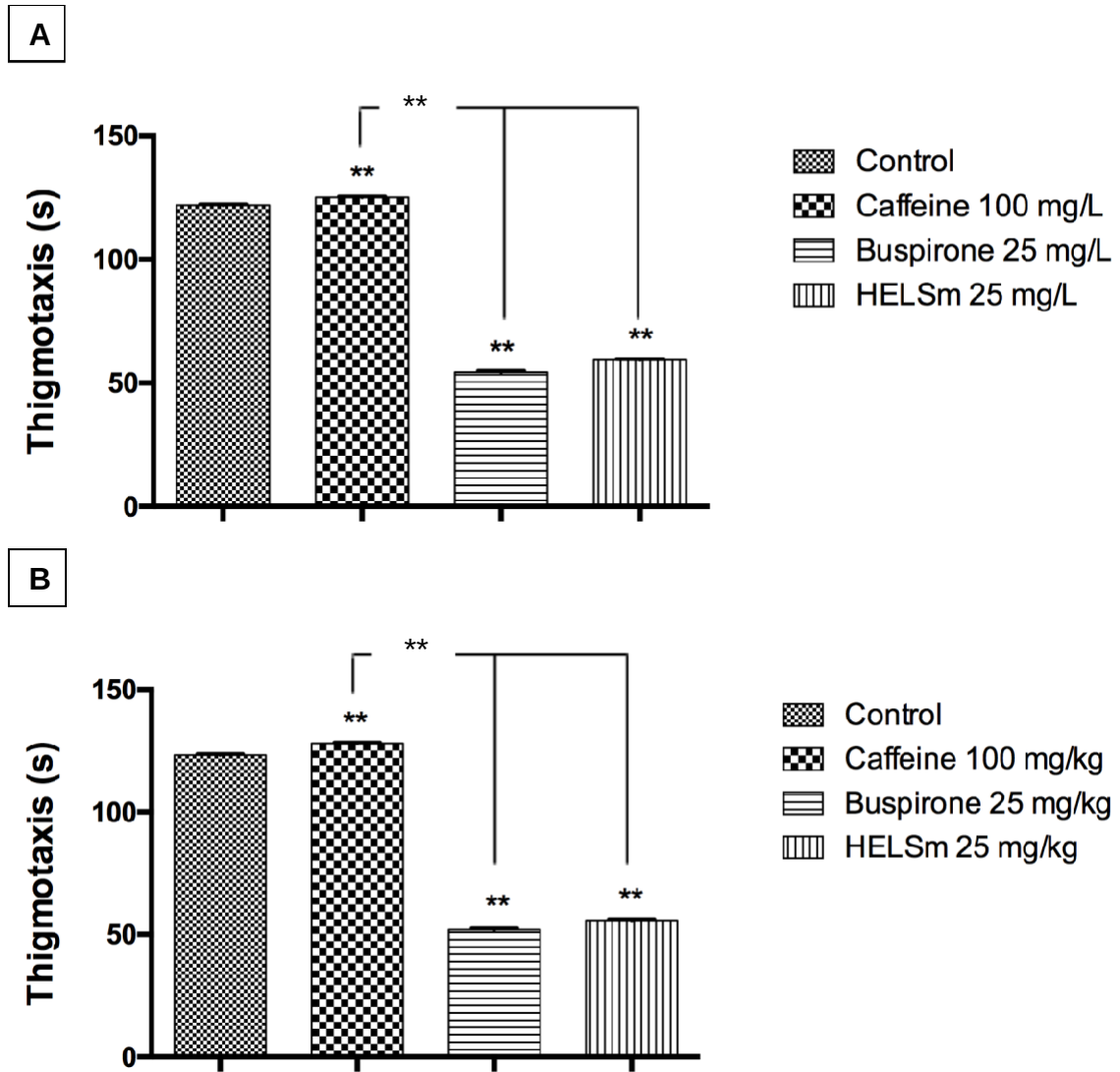


Figure 7. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves, buspirone and caffeine on zebrafish behavior in the scototaxis test (thigmotaxis). A) immersion, B) oral (gavage). Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 12$ /groups), ** $p < 0.01$ vs. control and caffeine group, statistical analysis was done by one -way ANOVA test and then followed by post -hoc Tukey.

A submeter

AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Spondias mombin* L. SOBRE MODELO DE DEPRESSÃO EM *Danio rerio* (ZEBRAFISH)

Tafnis Ingrid dos Santos Sampaio^{1,2}, Brenda Lorena Sánchez-Ortiz^{2,4}, Nayara Costa de Melo^{2,3}, Bianca Thais de Freitas Paiva², Gerley Anatê da Silva Aleluia², Fernando Luiz Pinheiro da Silva Neto², Hady Keita⁵ e José Carlos Tavares Carvalho^{2*}.

1Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

2Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Curso de Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

3Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

4Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510 Ciudad de México, México.

5Universidad de la Sierra Sur, Division de Pós-Grado, Instituto de Investigación sobre la Salud Pública, Calle Guillermo Rojas Mijangos S/N, Ciudad Universitaria, Miahuatlán de porfirio Díaz, Oaxaca, Mexico

RESUMO

Spondias mombin L. é uma espécie pertencente à família Anacardiaceae. No Brasil, é encontrada, principalmente no Norte e Nordeste. Suas folhas são usadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças, dentre elas, transtornos neuropsiquiátricos, como a depressão. Assim sendo, foi avaliado a ação antidepressiva do extrato hidroetanólico das folhas de *S. mombin* (EHEFSm) em modelo de *Danio rerio* (zebrafish). O EHEFSm foi administrado em zebrafish por via oral (27 mg/kg) e por imersão (27 mg/l) e avaliado no teste de mergulho em tanque novo. Neste estudo, um grupo com etanol 1%, um com estresse leve crônico imprevisível (UCMS), e outro com isolamento social na fase do desenvolvimento foram utilizados como grupos de indução de comportamento tipo depressão e a fluoxetina (20 mg/kg) como droga padrão. Para todas as variáveis espaciotemporais e comportamentais avaliadas (tempo gasto no topo do aparato, quadrantes cruzados, natação errática e duração de congelamento), o tratamento com EHEFSm produziu uma modificação no comportamento tipo depressão nos grupos testados com efeito similar ao da fluoxetina, ambos com uma diferença significativa quando comparado aos grupos controle ($p < 0.01$). A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a administração aguda do EHEFSm no modelo *Danio rerio* (zebrafish) produziu efeito antidepressivo e, esta ação foi melhorada quando administrado por via oral (gavagem).

Palavras-chave: *Spondias mombin*; zebrafish; *Danio rerio*; folhas; antidepressivo.

1. INTRODUÇÃO

A depressão não é uma única doença, ela representa um espectro de distúrbios com sintomas sobrepostos ou compartilhados (NESTLER et al., 2002). Ela também é conhecida como transtorno depressivo maior (MDD, do inglês major depressive disorder) e tem um impacto significativo na saúde pública (KESSLER et al., 2003), sendo considerada o fator primordial de problemas de saúde e incapacidade no mundo.

De acordo com as últimas estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 300 milhões de pessoas vivem com depressão. A falta de apoio às pessoas com transtornos mentais, é um dos motivos que impedem muitas pessoas de acessarem o tratamento que necessitam para viver de forma saudável e produtiva (WHO, 2017). Esse transtorno pode ser crônico ou recorrente, prejudicando consideravelmente o desempenho do indivíduo nas suas tarefas cotidianas. Quase 90% dos indivíduos com depressão apresentam episódios recorrentes (KENNEDY, 2008). Os quadros mais graves podem levar ao suicídio.

A depressão é caracterizada por baixa autoestima, tristeza, sentimento de culpa, perda de interesse, cansaço, desânimo, baixa concentração e distúrbios de sono ou apetite (WHO, 2017). A etiologia dessa desordem pode ser genética e ambiental, apresentando relação com outros distúrbios psiquiátricos (EHLERS, FRANK E KUPFER, 1988; REGIER et al., 1998; MCDONALD, RICHARD E DELONG, 2003).

Diversos fatores aumentam a predisposição a depressão, como obesidade, sedentarismo, adversidade na infância e experiências traumáticas (CARPENTER et al., 2000; BLUMENTHAL et al., 2007; MORINA et al., 2013; TUNNARD et al., 2014). As principais hipóteses relativas à base biológica da depressão estão situadas nos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores. Monoaminas são a principal teoria envolvendo os neurotransmissores cerebrais. A suposição das monoaminas fundamenta-se no conceito da deficiência das aminas biogênicas como a causa das depressões (SCHILDRAUT, 1965; BUNNEY; DAVIS, 1965; VAN PRAAG E KORF, 1971; WILNNER, 1990).

A depressão é frequentemente relacionada com outros transtornos mentais, como ansiedade, transtorno da personalidade, dependência e abuso de drogas (REGIER, 1990; IKETANI, 2002).

A terapia com plantas medicinais pode ser considerada uma alternativa efetiva para o tratamento de vários transtornos psiquiátricos (Faustino; Almeida; Andreatini, 2010; Gutiérrez; Chilpa; Jaime, 2014).

Spondias mombin L. é encontrada na área tropical da América do Sul, algumas partes da Ásia, oeste da Índia e partes da África (CROAT, 1974; AYOKA et al., 2006). Estudos fitoquímicos realizados com as folhas confirmaram a presença de taninos, saponinas, antraquinonas glicosiladas, alcaloides (CORTHOUT et al., 1991; ABO; OGUNLEYE; ASHIDI, 1999; NJOKU; AKUMEFULA, 2007; FRED-JAIYESIMI; KIO; RICHARD, 2009; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012) triterpenos e flavonoides (NJOKU; AKUMEFULA, 2007). Relatos da literatura descrevem que preparações das folhas são usadas popularmente por possuírem propriedades anti-inflamatória, antitumoral, antidepressiva e ansiolítica (OFFIAH; ANYANWU, 1989; BEHRA et al., 2002; AYOKA et al., 2005; ALBUQUERQUE, 2007; LORENZI; MATOS, 2008; UCHENDU; ISEK, 2008; ELUFIOYE et al., 2017).

Usar o zebrafish como um organismo modelo de alto rendimento para validação de drogas antidepressiva é uma abordagem prática e econômica (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014). Seu amplo uso na pesquisa neurocomportamental e comportamental é relacionado a várias características específicas (GUO, 2004); é farmacologicamente sensível; tem semelhanças genéticas e fisiológicas quando comparado com mamíferos; e apresenta vários padrões comportamentais, que permitem a criação ou adaptação de diferentes modelos para estudos de psicopatologias (KALUEFF et al., 2013).

Diversos modelos de psicopatologia são utilizados para estudar o comportamento em zebrafish (GERLAI et al., 2000; DARLAND; DOWLING, 2001; LEVIN; CHEN, 2004; LOCKWOOD et al., 2004; GERLAI; LEE; BLASER, 2006; NINKOVIC; BALLY-CUIF, 2006; ECHEVARRIA et al., 2010; MAXIMINO et al., 2011; PIATO et al., 2011; STEWART et al., 2014; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; NASCIMENTO; WALSH-MONTEIRO; GOUVEIA JR., 2016; FREIFELD et al., 2017) e, apesar da ausência de um protocolo comportamental para transtorno depressivo, o peixe zebra mostra alguns fenótipos comportamentais observados nos protocolos de ansiedade, que podem ser paralelos para os sintomas clínicos da depressão (NGUYEN; STEWART; KALUEFF, 2014).

Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito antidepressivo do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) no teste de mergulho em tanque novo em modelo de *Danio rerio* (zebrafish) por via de imersão e gavagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Spondias mombin* foram coletadas na cidade de Macapá (0°00'22.67": -51°06'57.60"), Estado do Amapá, Brasil. Uma amostra do material vegetal fértil, foi identificada e depositada no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental (IAN), situado em Belém, PA – Brasil, sob o número de exsicata 195999. O extrato foi preparado por maceração a partir das folhas secas de *Spondias mombin* trituradas, com solução hidroetanólica (75%), durante 48 horas. O extrato foi concentrado por rotaevaporação e, posteriormente liofilizado, apresentando rendimento de 29,58%. Foi armazenado em frasco âmbar, em dessecador, até o momento de uso.

2.2. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS GASOSAS E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Spondias mombin* (EHEFSm)

O EHEFSm (1,1 g) foi extraído com n-hexano (2 x 10 mL). A fração hexana foi analisada por um cromatógrafo a gás GC-MS-QP2010 (SHIMADZU) equipado com um espectrômetro de massa usando ionização de elétrons. As condições do CG foram as seguintes: Injector temperatura, 260; temperatura do detector, 290; gás de arraste (Hélio), taxa de fluxo de 1 mL min⁻¹ e split injection com relação de divisão 1:40. A temperatura do forno era inicialmente de 60 ° C e depois aumentada para 290 a uma taxa de 3 min⁻¹. A amostra foi diluída com n-hexano (1: 100, v / v) e injectado numa coluna ZB-5 (i.d. = 0,25 mm, comprimento 30 m, espessura do filme = 0,25 µm). As condições de MS foram tensão, 70 eV e taxa de varredura; 1 digitalizar s⁻¹. Fragmentação MS O padrão de compostos foi verificado com as bibliotecas de espectros de massa NIST.

2.3. ANIMAIS

Foram utilizados animais de ambos os sexos da espécie *Danio rerio* (linhagem tipo selvagem, com 6 meses de idade, 3-3,5 cm de comprimento e pesando em média 600 mg), os mesmos foram criados na Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, da Universidade Federal do Amapá, a partir de peixes provenientes de Acqua New Aq. e Peixes Ltda ME, Igarassu-PE. Os animais foram mantidos em aquários do biotério com temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH (6.0-8.0), com ciclo claro/escuro de 12 h. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com artemia salina e/ou ração.

Os protocolos experimentais estão de acordo com a legislação para experimentação animal estabelecida pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP sob o número de protocolo 003/2017.

2.4. DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MÉDIA (DL₅₀)

Para obtenção da concentração letal média (DL₅₀), foram utilizados animais adultos, coletados aleatoriamente do tanque e submetidos, um a cada vez, a administração por via oral (por gavagem, n=4/grupo). Os peixes foram anestesiados com água gelada 4°C , em seguida imobilizados em esponja umedecida de 7 cm, preparada para este fim, e assim, com auxílio de uma pipeta volumétrica (HTL Lab Solutions) foram administradas por via oral as diferentes doses no volume de 2 µl/animal (1, 3, 5, 7, 9 g/kg). Cada dose foi realizada em triplicata com grupos de 4 peixes cada uma, utilizando-se 12 animais para cada dose, e, por via de imersão os peixes permaneceram em contato com a solução por 48 horas. Nesse período os animais foram observados, as alterações comportamentais e mortalidade foram registradas. A DL₅₀ foi determinada utilizando o método de próbitos.

2.5. DROGAS, REAGENTES E VIA DE ADMINISTRAÇÃO

Foram administradas por via oral (gavagem, n=12/grupo), no volume de 2 µl/animal as seguintes drogas: etanol 1% (Solven Solventes e Químicos LTDA., lote

536/16, São Paulo), fluoxetina 20 mg/kg (Eurofarma Laboratórios S.A., lote 426954, São Paulo), EHEFSm 27 mg/kg (dose estabelecida a partir do estudo de toxicidade) e, o grupo controle tratado com água destilada. Depois de 60 minutos do tratamento os animais foram submetidos ao ensaio.

Na administração por imersão (n=12/grupo), cada droga foi diluída em água destilada nas seguintes diluições: etanol 1%, fluoxetina 20 mg/l, EHEFSm 27 mg/l e o grupo controle teve contato somente com água do tanque de manutenção. Cada animal no grupo específico foi exposto à solução contendo o medicamento por 30 minutos. Então, individualmente, era submetido ao teste de mergulho em tanque novo.

2.6. ISOLAMENTO SOCIAL NA FASE DE DESENVOLVIMENTO

Logo após a fertilização, os embriões foram separados individualmente para se desenvolverem. Dessa forma foi garantida a condição de isolamento social. Os embriões foram colocados em aquários de 1 litro, sem acesso visual, tátil ou olfativo com os demais aquários. O mesmo procedimento foi seguido para o grupo controle, com a diferença de que nesse grupo houve a condição de criação social com cinco embriões por tanque. A circulação de água dos aquários do sistema foi desligada até 8 dias pós fertilização (dpf) para controle de possíveis pistas olfativas que estivessem associadas com reconhecimento de parentesco (GERLACH et al., 2008; HINZ et al., 2013).

Para garantir a qualidade da água dos aquários, as trocas foram realizadas de forma manual. Essas mudanças de água foram realizadas diariamente, usando água de um reservatório isolado sem peixe até 8 dpf, após o qual o fluxo de água e a filtração central foi ativada. Os peixes foram criados e monitorados até a idade adulta para que os testes fossem realizados.

2.7. ESTRESSE LEVE CRÔNICO IMPREVISÍVEL (UCMS)

Para garantir a imprevisibilidade, os estressores foram aleatorizados. Ao todo foram empregados seis estressores e cada animal foi exposto diariamente a dois estressores, durante o período de 15 dias consecutivos em horas predeterminadas (Tabela 1).

Os estressores foram selecionados de acordo com o estresse agudo anterior e regras do UCMS da seguinte forma: (1) os níveis de água nos tanques de alojamento foram reduzidos resultando na exposição da parte dorsal do corpo do peixe por 2 min (PIATO et al., 2011; CHAKRAVARTY et al., 2013); (2) os indivíduos foram transferidos de um tanque para outro, seis vezes consecutivas (CHAKRAVARTY et al., 2013); (3) os indivíduos foram perseguidos com rede por 8 minutos (PIATO et al., 2011; CHAKRAVARTY et al., 2013); (4) os peixes foram elevados de seus tanques e expostos à atmosfera de ar com o auxílio de uma rede por 2 minutos (TRAN et al., 2014); (5) a água do tanque de habitação foi substituída (três quartos da água do tanque), três vezes consecutivas, enquanto os indivíduos permaneceram no tanque (PIATO et al., 2011); e (6) os peixes foram isolados individualmente durante 60 minutos em tubos de Eppendorf de 2 mL com perfurações em ambas as extremidades para permitir fluxo de água (CHAKRAVARTY et al., 2013). Com exceção do estressor de mudança de tanque, os estressores ocorreram no tanque de habitação. Os sujeitos na condição "social" foram separados apenas para a situação dos estressores de rede e de restrição, em seguida foram devolvidos para seus grupos imediatamente após o tratamento. Todos os peixes dos grupos de tratamento submetidos ao estresse, receberam o mesmo número e tipo de tratamento de estresse em geral, e os testes começaram no dia seguinte.

2.8. TESTE DE MERGULHO EM TANQUE NOVO (MTN)

Esse experimento foi adaptado dos métodos descritos por diferentes autores (CACHAT et al., 2010; CACHAT et al., 2011; PITTMAN; ICHIKAWA, 2013; PITTMAN; HYLTON, 2015). Para tanto, foi utilizado um aquário retangular medindo 15 cm x 25 cm x 20 cm (largura x comprimento x altura), dividido igualmente em duas seções horizontais de 9,3 cm de altura cada (topo e fundo), demarcado por oito retângulos de 60,45 cm², marcadas externamente por caneta permanente. A coluna d'água foi mantida em 18,6 cm de altura, produzindo um volume final de 6,9 litros. Uma câmera de vídeo (modelo Nikon D3300) foi posicionada na parte frontal do aparato em torno de 35 cm do aquário para captar a exploração de todo o ambiente. A análise comportamental foi realizada pelo software ANY-maze[®] (Stoelting CO, EUA).

Após a indução de comportamento tipo depressão, os animais foram tratados com as substâncias testes antidepressiva (fluoxetina e EHEFSm). Depois de 60

minutos, os animais, individualmente, foram transferidos ao compartimento central do aquário teste, sem período de aclimatização. O comportamento do peixe foi registrado durante o período de 6 minutos (CACHAT et al., 2010).

As seguintes variáveis foram registradas: tempo gasto no topo (s); quadrantes cruzados (n), número de eventos de nado errático (n) (múltiplas ocorrências de nados acelerados e que apresentavam sucessão rápida de mudança de direção do movimento); tempo de congelamento (s) (duração do tempo que o animal permaneceu imóvel (com exceção dos opérculos e olhos), distância percorrida (m) e latência (s) (CACHAT et al., 2010).

2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados obtidos, foi utilizado o Software GraphPad Prism versão 6.0. Para análise dos dados aplicou-se ANOVA (one-way) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação dos grupos testes e grupos controle. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Valores com $p < 0,01$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. CROMATOGRAFIA GASOSA E IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FÓLHAS DE *Spondias mombin* (EHEFSm)

Os constituintes de baixa polaridade do extrato foram analisados utilizando um GC-MS técnica (Figura 1). A maioria dos compostos identificados foram ácidos graxos, ésteres e álcoois. No entanto, o pico com tempo de retenção de 86,50 min foi identificado como o esteroide sitosterol.

3.2. DETERMINAÇÃO DA DL₅₀

O tratamento por via oral com extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) nas doses de 1, 3, 5, 7, e 9 g/kg, possibilitou a determinação da DL₅₀ em 48 horas de 4,515 g/kg (Tabela 2).

3.3. TESTE DE MERGULHO EM TANQUE NOVO (MTN)

Em relação ao tempo gasto no topo do aparato, os grupos tratados por via oral e imersão com o extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) e com fluoxetina, apresentaram o maior tempo, em relação aos grupos etanol 1%, estresse leve crônico imprevisível (UCMS), isolamento social na fase do desenvolvimento e controle (Figura 2).

Quanto ao número de quadrantes cruzados, os grupos tratados com EHEFSm (por via hídrica e gavagem) e o grupo fluoxetina, apresentaram significativamente, o maior número dessa atividade, revezando mais vezes entre um quadrante e outro, quando comparados aos grupos controle, estresse leve crônico imprevisível (UCMS), isolamento social na fase do desenvolvimento e etanol 1% (Figura 3).

Diferenças significativas foram observadas no número de eventos de nado errático, houve similaridade entre os resultados observados no grupo tratado com fluoxetina e o tratamento com o EHEFSm no tanque novo, esses apresentaram uma diminuição no número de eventos de nado errático em comparação com os grupos avaliados (etanol 1%, estresse leve crônico imprevisível (UCMS), isolamento social na fase do desenvolvimento e seguidos do grupo controle). Os resultados para o EHEFSm foram similares tanto por via hídrica quanto por gavagem (Figura 4).

Resultados semelhantes foram observados para o parâmetro de congelamento no tanque novo (Figura 5), onde os grupos tratados com fluoxetina e com o EHEFSm apresentaram de forma significativa, o menor tempo de congelamento registrado, quando comparado com o grupo etanol 1%, estresse leve crônico imprevisível (UCMS) e isolamento social na fase do desenvolvimento que apresentaram atividade similar ao controle.

Em relação ao parâmetro de distância total percorrida, pode-se observar que o grupo álcool 1%, o estresse e o isolamento foram capazes de acentuar de forma relevante a distância que o peixe nadou no tanque teste e que essa atividade foi revestida pela ação do EHEFSm e da fluoxetina principalmente na via oral (gavagem) (Figura 6).

A latência para entrar no quadrante superior foi maior nos grupos em que os animais foram expostos a condições adversas (Figura 7). Enquanto que os grupos tratados com o EHEFSm e o grupo tratado com fluoxetina praticamente não ficaram no quadrante inferior do tanque.

4. DISCUSSÃO

Levando em consideração que os produtos de origem natural da medicina popular colaboram consideravelmente na descoberta de novas drogas e são uma alternativa a drogas neuroativas (NASSIRI-ASL; SHARIATI-RAD; ZAMANSOLTANI, 2008). Como por exemplo, o uso popular da preparação das folhas de *S. mombin* por possuírem propriedades antidepressiva e ansiolítica, pode ser influenciada pelos derivados de compostos polifenólicos e flavonoides encontrados no extrato hidroetanólico.

Vários estudos propõem que os flavonóides possuem propriedades neuroativas (GUARALDO et al., 2000; HARBONE; WILLIAMS, 2000; WATANABE et al., 2001; DHAWAN; KUMAR; SHARMA, 2001; LAU; SHUKIT-HALE; JOSEPH, 2005; SCHMITT-SCHILLIG; 2005). Um estudo realizado por Youdim, Shukit-Hale e Joseph em 2004 mostrou que as características da barreira hemato-encefálica fazem que ela se torne uma passagem regulatória que limita o trânsito de compostos para o sistema nervoso central para que danos a essa estrutura sejam evitados, mesmo assim o estudo apresentou evidências de que flavonóides são capazes de ultrapassar essa barreira, agindo de forma mais consistente sobre o sistema nervoso.

Neste estudo, demonstramos os efeitos comportamentais da administração do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) e fluoxetina por via hídrica e por via oral (gavagem) em *Danio rerio* adulto, relacionando as atividades apresentadas com os tratamentos usando etanol 1%, comparando aos grupos de estresse leve crônico imprevisível (UCMS), isolamento social na fase do desenvolvimento e os grupos controle. Um grupo controle foi tratado apenas com água, condição natural do peixe para que se pudesse verificar a atividade que o animal teria normalmente caso entrasse em contato com o ambiente pela primeira vez.

O teste de Mergulho em Tanque Novo, é um experimento que faz uso de um aquário onde o peixe jamais esteve antes. Testes desse tipo foram descritos por Blaser e Gerlai (2006), eles são utilizados para avaliar o comportamento tipo ansiedade, que está relacionada com a depressão (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; EGAN et al., 2009). Segundo Serra; Medalha e Mattioli (1999), permanecer mais tempo no fundo do aquário é uma reação comum dos peixes. Essa preferência pelo fundo representa uma típica estratégia defensiva da espécie, como se fosse um comportamento de esquiva ao predador (ROSEMBERG et al., 2011). Essa reação foi

observada nos grupos controle, tratado com etanol 1%, estresse leve crônico imprevisível (UCMS), isolamento social na fase do desenvolvimento e, revertida no grupo tratado com EHEFSm, assim como com fluoxetina, demonstrando assim, que essas substâncias podem desencadear um efeito antidepressivo no teste de mergulho em tanque novo (Figura 2). Drogas ansiolíticas, como fluoxetina diminuem a preferência pelo fundo do tanque (LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007).

A exposição ao etanol 1% por 1h promoveu alterações nos parâmetros relacionados à atividade locomotora, diminuindo consideravelmente a locomoção dos animais, possivelmente devido ao efeito depressor do etanol na concentração testada (1% em volume) (ROSEMBERG et al., 2012). O fato da atividade locomotora ter sofrido redução fez com que o número de quadrantes cruzados no grupo tratado com etanol 1% tenha sido menor em relação aos demais grupos, entretanto, o grupo tratado com EHEFSm apresentou elevado número de alternâncias, assim como o tratado com fluoxetina (Figura 3) (EGAN et al., 2009; CACHAT et al., 2010; CACHAT et al., 2011).

O nado errático é outro parâmetro usado para avaliar a depressão no teste de mergulho em tanque novo. A partir de estudos já publicados (BLASER; GERLAI, 2006; BASS; GERLAI, 2008; SPEEDIE; GERLAI, 2008; PARRA; ADRIAN JR.; GERLAI, 2009; AHMED; FERNANDES; GERLAI, 2012; LUCA; GERLAI, 2012A; MATHURU ET AL., 2012) é possível sugerir que o aumento desse parâmetro tem relação com as reações de medo expressadas pelo animal, esse aumento foi observado nos grupos álcool 1%, estresse leve crônico e isolamento social (Figura 4). Além disso, o número de atividades de nado errático varia positivamente com o tempo de congelamento e negativamente ao tempo que o animal gasta no topo (CACHAT et al., 2001). O tratamento com fluoxetina diminui a frequência de nado errático (EGAN et al., 2009). O grupo tratado com o EHEFSm apresentou diminuição similar a da fluoxetina, evidenciando a atividade antidepressiva do extrato.

O tempo de congelamento parece ser um dos melhores parâmetros para avaliar o aumento da ansiedade. Quanto maior o tempo que o animal passar manifestando a cessação completa do movimento, mais ansioso ele está (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010). Nesse estudo o congelamento foi aumentado no grupo tratado com etanol 1%, sendo que foi um dos que mais apresentou aumento no tempo de congelamento. Estudos demonstraram que concentrações elevadas de etanol durante um curto período de tempo, acarretaram efeitos sedativos, os quais estão

relacionados a diversas alterações neuroquímicas promovidas pelo etanol, inclusive em zebrafish (GERLAI, 2003; BOYCE-RUSTAY et al., 2008; CHATTERJEE; GERLAI, 2009). O grupo tratado com EHEFSm, bem como o grupo tratado com fluoxetina diminuíram essa atividade de maneira significativa, ressaltando assim o caráter ansiolítico que o medicamento e o extrato possuem (Figura 5).

A distância total percorrida é utilizada como medida da atividade locomotora (TRAN; GERLAI, 2013; HAMILTON et al., 2017). Na Figura 6 é possível observar que o grupo tratado com álcool 1% foi o grupo com menos atividade locomotora, é importante ressaltar que, provavelmente, os efeitos observados nos parâmetros relacionados à locomoção estejam relacionados aos efeitos centrais promovidos pelo etanol e não possuem relação com alteração na visão dos animais, visto que as respostas ópticocinéticas da espécie não foram modificadas na presença de 1,5% de etanol (BROCKERHOFF et al., 1995; WAGLE; MATHUR; GUO, 2011). Levando em consideração que os grupos utilizados como controle depressivo foram os que menos se locomoveram, pode-se afirmar que a diminuição da atividade locomotora está relacionada a atividades como medo, ansiedade e estresse.

A latência é um dos melhores índices de alarme em zebrafish (SUBOSKI et al., 1990; HALL; SUBOSKI, 1995). Analisando esse parâmetro e o comparando com os demais parâmetros comportamentais é possível avaliar a ansiedade dos animais (BARCELLOS et al., 2007). Geralmente, uma latência mais longa para entrar na metade superior, o tempo reduzido no topo, bem como o aumento dos movimentos erráticos e o congelamento indicam maior ansiedade, serve também como parâmetro para depressão (BARCELLOS et al., 2007; LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007). Os grupos que mais demoraram a explorar a parte superior do aquário foram os do controle depressivo, e os que foram mais rápido para o topo foram o grupo tratado com o EHEFSm e fluoxetina (Figura 7).

5.CONCLUSÃO

Considerando os dados experimentais obtidos neste estudo, no modelo de mergulho em tanque novo com *Danio rerio* (zebrafish), pode-se sugerir que o tratamento agudo com o extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) demonstrou ação antidepressiva, na concentração de 27 mg/l por imersão, sendo que em geral esse efeito foi melhorado por gavagem também com a dose de

27 mg/kg. Neste ensaio o EHEFSm foi capaz de modificar os comportamentos tipo depressão nos grupos testados como aumentar o tempo de permanência no topo do aparato, com resultado similar ao efeito antidepressivo da fluoxetina, a partir desses resultados é possível sugerir que os derivados de compostos polifenólicos e flavonóides encontrados nas folhas de *Spondias mombin* são capazes de desencadear o efeito antidepressivo. Neste ensaio também, foi demonstrado que o tratamento com EHEFSm na dosagem utilizada não alteram a atividade locomotora de *D. rerio*, mas sim possuem efeito sobre os mecanismos da depressão.

Este estudo vem dá suporte aos estudos já descritos para a atividade antidepressiva de *S. mombin*, em outras espécies de animais roedores.

REFERÊNCIAS

ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. **Antimicrobial Potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea***. Phytotherapy Research, 1999. 13 v., 494-497p.

AHMED, T. S.; FERNANDES, Y.; GERLAI, R. **Effects of animated images of sympatric predators and abstract shapes on fear responses in zebrafish**. Behaviour, 2012. 149 v., 1125–1153 p.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. **Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach**. Journal of Ethnopharmacology, 2007. 114 v., 325–354 p.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; UKPONMWAN, O. E. **Studies on the Anxiolytic Affect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) Extracts**. Afr. J. Trad. CAM, 2005. 2 v., 2 n., 153-165 p.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; UKPONMWAN, O. E. **Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats**. Journal of Ethnopharmacology, 2006. 103 v., 2 n., 166-175 p.

BARCELLOS, L. J. G.; RITTER, F.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; SILVA, L. B.; BEDIN, A. C.; FINCO, J.; CERICATO, L. **Wholebody cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish *Danio rerio***. Aquaculture, 2007. 272 v., 774–778 p.

BASS, S. L. S.; GERLAI, R. **Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: The effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish**. Behavioural Brain Research, 2008. 186v., 107–117p.

BEHRA, M.; COUSIN, X.; BERTRAND, C.; VONESCH, J. L.; BIELLMANN, D.; CHATONNET, A.; STRAHLE, U. **Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo**. *Nat Neurosci*, 2002. 5 v., 2 n., 111-118 p.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. **Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety**. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2009. 94 v., 75–80 p.

BLASER, R. E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. C. **Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*)**. *Behavioural Brain Research*, 2010. 208 v., 56–62 p.

BLASER, R.; GERLAI, R. **Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods**. *Behavior Research Methods*, 2006. 38 v., 456–469 p.

BLUMENTHAL, J. A.; BABYAK, M. A.; DORAISWAMY, P. M.; WATKINS, L.; HOFFMAN, B. M.; BARBOUR, K. A.; HERMAN, S.; CRAIGHEAD, W. E.; BROSSE, A. L.; WAUGH, R.; HINDERLITER, A.; SHERWOOD, A. **Exercise and pharmacotherapy in the treatment of major depressive disorder**. *Psychosom Med*, 2007. 69 v., 7 n., 587-596 p.

BOYCE-RUSTAY, J. M.; PALACHICK, B.; HEFNER, K.; CHEN, Y. C.; KARLSSON, R. M.; MILLSTEIN, R. A.; HARVEY-WHITE, J.; HOLMES, A. **Desipramine potentiation of the acute depressant effects of ethanol: modulation by α 2-adrenoreceptors and stress**. *Neuropharmacology*, 2008. 55 v., 5 n., 803-811 p.

BROCKERHOFF, S. E.; HURLEY, J. B.; JANSSEN-BIENHOLD, U.; NEUHAUSS, S. C. F.; DRIEVER, W.; DOWLING, J. E. **A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995. 92 v., 10545-10549 p.

BUNNEY, W. E.; DAVIS, J. M. **Norepinephrine in depressive reactions. A review**. *Archives of General Psychiatry*, 1965. 13 v., 6 n., 483-494 p.

CACHAT, J.; STEWART, A.; GROSSMAN, L.; GAIKWAD, S.; KADRI, F.; CHUNG, K.M.; WU, N.; WONG, K.; ROY, S.; SUCIU, C.; GOODSPEED, J.; ELEGANTE, M.; BARTELS, B.; ELKHAYAT, S.; TIEN, D.; TAN, J.; DENMARK, A.; GILDER, T.; KYZAR, E.; DILEO, J.; FRANK, K.; CHANG, K.; UTTERBACK, E.; HART, P.; KALUEFF, A. V. **Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish**. *Nature Protocols*, 2010. 5 v., 11 n., 1786-1799 p.

CACHAT, J.; STEWART, A.; UTTERBACK, E.; HART, P.; GAIKWAD, S.; WONG, K.; KYZAR, E.; WU, N.; KALUEFF, A. V. **Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior**. *Plos One*, 2011. 6 v., 3 n., e17597 p.

CACHAT, J. M.; CANAVELLO, P. R.; ELKHAYAT, S. I.; BARTELS, B. K.; HART, P. C.; ELEGANTE, M. F.; BEESON, E. C.; LAFFOON, A. L.; HAYMORE, W. A. M.; TIEN, D. H.; TIEN, A. K.; MOHNOT, S.; KALUEFF, A. V. **Video-Aided Analysis of**

Zebrafish Locomotion and Anxiety-Related Behavioral Responses. Zebrafish Neurobehavioral Protocols, 2011. 51, 1-14.

CARPENTER, K. M.; HASIN, D. S.; ALLISON, D. B.; FAITH, M. F. **Relationships Between Obesity and DSM-IV Major Depressive Disorder, Suicide Ideation, and Suicide Attempts: Results From a General Population Study.** American Journal of Public Health, 2000. 90 v., 2 n., 251-257 p.

CHAKRAVARTY, S.; REDDY, B. R.; SUDHAKAR, S. R.; SAXENA, S.; DAS, T.; MEGHAH, V.; BRAHMENDRA SWAMY, C. V.; KUMAR, A.; IDRIS, M. M. **Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction.** Plos One, 2013. 8 v., 5 n., e63302 p.

CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. **High precision liquid chromatography analysis of dopaminergic and serotonergic responses to acute alcohol exposure in zebrafish.** Behav Brain Res, 2009. 200 v., 1 n., 208–213 p.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.A.; CLAEYS, M.; BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J. **Antiviral Ellagitannins from *Spondias mombin*.** Phytochemistry, 1991. 30 v., 4 n., 1129-1130 p.

CROAT, T. B. **A reconsideration of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae).** Annals of the Missouri Botanical Garden, 1974. 61 v., 2 n., 483-490 p.

DARLAND, T.; DOWLING, J. E. **Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. 98 v., 2 n., 11691–11696 p.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. **Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus.** Journal of Ethnopharmacology, 2001. 78 v., 165-170 p.

ECHEVARRIA, D. J.; HAMMACK, C. M.; JOUANDOT, D. J.; TOMS, C. N. **Does Acute Alcohol Exposure Modulate Aggressive Behaviors in the Zebrafish (*Danio rerio*), or is the Bark Worse than the Bite?** International Journal of Comparative Psychology, 2010. 23 v., 62-69 p.

EGAN, R. J.; BERGNER, C. L.; HART, P. C.; CACHAT, J. M.; CANAVELLO, P. R.; ELEGANTE, M. F.; ELKHAYAT, S. I.; BARTELS, B. K.; TIEN, A. K.; TIEN, D. H.; MOHNOT, S.; BEESON, E.; GLASGOW, E.; AMRI, H.; ZUKOWSKA, Z.; KALUEFF, A. V. **Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish.** Behavioural Brain Research, 2009. 205 v., 1 n., 38-44 p.

EHLERS, C. L.; FRANK, E.; KUPFER, D. J. **Social Zeitgebers and Biological Rhythms: A Unified Approach to Understanding the Etiology of Depression.** Archives of General Psychiatry, 1988. 45 v., 10 n., 948-52 p.

ELUFIOYE, T. O.; OBUOTOR, E. M.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADESANYA, S. A. **Anticholinesterase constituents from the leaves of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae).** *Biologics*, 2017. 11 v., 107-114 p.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B.; ANDREATINI, R. **Medicinal plants for the treatment of generalized anxiety disorder: a review of controlled clinical studies.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2010. 1-8 p.

FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A.; RICHARD, W. **α -Amylase inhibitory effect of 3 β -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf.** *Food Chemistry*, 2009. 116 v., 1 n., 285-288 p.

FREIFELD, L.; OSTRICIL, I.; FORSTER, D.; RAMIREZ, A.; GAGNON, J. A.; RANDLETT, O.; COSTA, E. K.; ASANO, S.; CELIKER, O. T.; GAO, R.; MARTIN-ALARCON, D. A.; REGINATO, P.; DICK, C.; CHEN, L.; SCHOPPIK, D.; ENGERT, F.; BAIER, H.; BOYDEN, E. S. **Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies.** *Proceedings of the National Academic of Sciences*, 2017.

GERLACH, G.; HODGINS-DAVIS, A.; AVOLIO, C.; SCHUNTER, C. **Kin recognition in zebrafish: a 24-hour window for olfactory imprinting.** *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 2008. 275 v., 1647 n., 2165-2170 p.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTHAL, A. **Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2000. 67 v., 773-782 p.

GERLAI, R. **Zebra Fish: An Uncharted Behavior Genetic Model.** *Behavior Genetics*, 2003. 33 v., 5 n., 461-468 p.

GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R. **Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*).** *Pharmacol Biochem Behav*, 2006. 85 v., 4 n., 752-761 p.

GUO, S. **Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish?** *Genes, Brain and Behavior*, 2004. 3 v., 2 n., 63-74 p.

GUARALDO, L.; CHAGAS, D. A.; KONNO, A. C.; KORN, G. P.; PFIFFER, T.; NASELLO, A. G. **Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior.** *Journal of Ethnopharmacology*, 2000. 72 v., 61-67 p.

GUTIÉRREZ, S. L. G.; CHILPA, R. R.; JAIME, H. B. **Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2014. 24 v., 5 n., 591-608 p.

HALL, D.; SUBOSKI, M. D. **Visual and olfactory stimuli in learned release of alarm reactions by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*).** *Neurobiology of Learning and Memory*, 1995. 63 v., 229-240 p.

HAMILTON, T. J.; MORRILL, A.; LUCAS, K.; GALLUP, J.; HARRIS, M.; HEALEY, M.; PITMAN, T.; SCHALOMON, M.; DIGWEED, S.; TRESGUERRES, M. **Establishing zebrafish as a model to study the anxiolytic effects of scopolamine.** Scientific reports, 2017. 8; 7 v., 1 n., 15081 p.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. **Advances in Flavonoid research since 1992.** Phytochemistry, 2000. 55 v., 481-504 p.

HINZ, C.; NAMEKAWA, I.; BEHRMANN-GODEL, J.; OPPELT, C.; JAESCHKE, A.; MULLER, A.; FRIEDRICH, R. W.; GERLACH, G. **Olfactory imprinting is triggered by MHC peptide ligands,** 2013. Scientific Reports 3 v., 2800 p.

IKETANI, T.; KIRIIKE, N.; STEIN, M. B.; NAGAO, K.; NAGATA, T.; MINAMIKAWA, N.; SHIDAO, A.; FUKUHARA, H. **Personality disorder comorbidity in panic disorder patients with or without current major depression.** Depression and Anxiety, 2002. 15 v., 176-182 p.

KALUEFF, A. V.; GEBHARDT, M.; STEWART, A. M.; CACHAT, J. M.; BRIMMER, M.; CHAWLA, J. S.; CRADDOCK, C.; KYZAR, E. J.; ROTH, A.; LANDSMAN, S.; GAIKWAD, S.; ROBINSON, K.; BAATRUP, E.; TIERNEY, K.; SHAMCHUK, A.; NORTON, W.; MILLER, N.; NICOLSON, T.; BRAUBACH, O.; GILMAN, C. P.; PITTMAN, J.; ROSEMBERG, D. B.; GERLAI, R.; ECHEVARRIA, D.; LAMB, E.; NEUHAUSS, S. C. F.; WENG, W.; BALLY-CUIF, L.; SCHNEIDER, H. **Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond.** Zebrafish, 2013. 10 v., 1 n., 70-86 p.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. **Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders.** Trends Pharmacol Sci, 2014. 35 v., 2 n., 63-75 p.

KENNEDY, S. H. **Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment.** Dialogues in Clinical Neuroscience, 2008. 10 v., 3 n., 271-277 p.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K. R.; RUSH, A. J.; WALTERS, E. E.; WANG, P. S. **The epidemiology of major.** Journal of the American Medical Association, 2003. 289 v., 23 n., 3095-3105 p.

LAU, F. F.; SHUKIT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. **The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging.** Neurobiology of Aging, 2005. 26S v., S128–S132 p.

LEVIN, E. D.; CHEN, E. **Nicotinic involvement in memory function in zebrafish.** Neurotoxicology and Teratology, 2004. 26 v., 6 n., 731-735 p.

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. **Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish.** Physiology and Behavior, 2007. 90 v., 54–58 p.

LOCKWOOD, B.; BJERKE, S.; KOBAYASHI, K.; GUO, S. **Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening.** Pharmacol Biochem Behav, 2004. 77 v., 3 n., 647-654 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUCA, R. M.; GERLAI, R. **In search of optimal fear inducing stimuli: Differential behavioral responses to computer animated images in zebrafish.** Behavioural Brain Research, 2012a. 226 v., 66–76 p.

MATHURU, A. S.; KIBAT, C.; CHEONG, W. F.; SHUI, G.; WENK, M. R.; FRIEDRICH, R. W.; JERUTHASAN, S. **Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish.** Current Biology, 2012. 22 v., 538–544 p.

MAXIMINO, C.; SILVA, A. W. B.; GOUVEIA JR., A.; HERCULANO, A. M. **Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011. 35 v., 2 n., 624-631 p.

MCDONALD, W. M.; RICHARD, I. H.; DELONG, M. R. **Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease.** Biological Psychiatry, 2003. 54 v., 3 n., 363-375 p.

MORINA, N.; AJDUKOVIC, D.; BOGIC, M.; FRANCISKOVIC, T.; KUCUKALIC, A.; LECIC-TOSEVSKI, D.; MORINA, L.; POPOVSKI, M.; PRIEBE, S. **Co-Occurrence of Major Depressive Episode and Posttraumatic Stress Disorder Among Survivors of War: How Is It Different From Either Condition Alone?.** J Clin Psychiatry, 2013. 74 v., 3 n., 212-218 p.

NASCIMENTO, G. S.; WALSH-MONTEIRO, A.; GOUVEIA JR., A. **A reliable depression-like model in zebrafish (*Danio rerio*): Learned helplessness.** Psychology & Neuroscience, 2016. 9 v., 3 n., 390-397 p.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. **Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 2008. 32 v., 989–993 p.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. **Neurobiology of Depression.** Neuron, 2002. 34 v., 13–25 p.

NGUYEN, M.; STEWART, A. M.; KALUEFF, A. V. **Aquatic blues: modeling depression and antidepressant action in zebrafish.** Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry, 2014. 55 v., 26-39 p.

NINKOVIC, J.; BALLY-CUIF, L. **The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse.** Methods, 2006. 39 v., 3 n., 262-274 p.

NJOKU, P. C.; AKUMEFULA, M. I. **Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias Mombin* Leaves**. Pakistan Journal of Nutrition, 2007. 6 v., 6 n., 613-615 p.

OFFIAH, V. N.; ANYANWU, I. I. **Abortifacient Activity of an Aqueous Extract of *Spondias mombin* leaves**. Journal Ethnopharmacology, 1989. 26 v., 317-320 p.

PARRA, K. V; ADRIAN JR, J. C.; GERLAI, R. **The synthetic substance hypoxanthine 3-Noxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*)**. Behavioural Brain Research, 2009. 205 v., 336-341 p.

PIATO, A. L.; CAPIOTTI, K. M.; TAMBORSKI, A. R.; OSES, J. P.; BARCELLOS, L. J. G.; BOGO, M. R.; LARA, D. R.; VIANNA, M. R.; BONAN, C. D. **Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses**. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011. 35 v., 2 n., 561-567 p.

PITTMAN, J. T.; ICHIKAWA, K. M. **iPhone® applications as versatile video tracking tools to analyze behavior in zebrafish (*Danio rerio*)**. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2013. 106 v., 137-142 p.

PITTMAN, J.; HYLTON, A. **Behavioral, endocrine, and neuronal alterations in zebrafish (*Danio rerio*) following sub-chronic coadministration of fluoxetine and ketamine**. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2015. 139 v., 158-162 p.

REGIER, D. A.; FARMER, M. E.; RAE, D. S.; LOCKE, B. Z.; KEITH, S. J.; JUDD, L. L.; GOODWIN, F. K. **Comorbidity of Mental Disorders With Alcohol and Other Drug Abuse**. Journal of the American Medical Association, 1990. 264 v., 19 n., 2511-2518 p.

REGIER, D. A.; RAE, D. S.; NARROW, W. E.; KAELEBER, C. T.; SCHATZBERG, A. F. **Prevalence of anxiety disorders and their comorbidity with mood and addictive disorders**. Journal of psychiatry, 1998. 173 v., 34 n., 24-28 p.

ROSEMBERG, D. B.; RICO, E. P.; MUSSULINI, B. H.; PIATO, A. L.; CALCAGNOTTO, M. E.; BONAN, C. D.; DIAS, R. D.; BLASER, R. E.; SOUZA, D. O.; OLIVEIRA, D. L. **Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments**. Plos One, 2011. 6 v., 5 n., e19397 p.

ROSEMBERG, D. B.; BRAGA, M. M.; RICO, E. P.; LOSS, C. M.; CORDOVA, S. D.; MUSSULINI, B. H.; BLASER, R. E.; LEITE, C. E.; CAMPOS, M. M.; DIAS, R. D.; CALCAGNOTTO, M. E.; OLIVEIRA, D. L.; SOUZA, D. O. **Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol**. Neuropharmacology, 2012. 63 v., 4 n., 613-623 p.

SCHILDRAUT, J. J. **The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence**. The american journal of psychiatry, 1965. 122 v., 5 n., 509-22 p.

SCHMITT-SCHILLIG, S.; SCHAFFER, S.; WEBER, C. C.; ECKERT, G. P.; MÜLLER, W. E. **Flavonoids and the aging brain**. Journal of physiology and pharmacology, 2005. 56 v., 23-36 p.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. **Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment**. Beazilian Journal of Medical and Biological Research, 1999. 32 v., 1551-1553 p.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; LIMA, D. M.; SANTOS, S. C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. **Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus**. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2011. 17 v., 4 n., 406-413 p.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. **Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil**. Pharmaceutical Biology, 2012. 50 v., 6 n., 740–746 p.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. **Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*)**. Behavioural Brain Research, 2008. 188 v., 168–177 p.

STEWART, A. M.; BRAUBACH, O.; SPITSBERGEN, J.; GERLAI, R.; KALUEFF, A. V. **Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside**. Trends Neurosci, 2014. 37 v., 5 n., 264-278 p.

SUBOSKI, M. D.; BAIN, S.; CARTY, A. E.; MCQUOID, L. M.; SEELEN, M. I.; SEIFERT, M. **Alarm reaction in acquisition and social transmission of simulated predator recognition by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*)**. Journal of Comparative Psychology, 1990. 104 v., 101-112 p.

TRAN, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. **Acute net stressor increases whole-body cortisol levels without altering whole-brain monoamines in zebrafish**. Behavioral Neuroscience, 2014. 128 v., 5 n., 621-624 p.

TUNNARD, C.; RANE, L. J.; WOODERSON, S. C.; MARKOPOULOU, K.; POON, L.; FEKADU, A.; JURUENA, M.; CLEARE, A. J. **The impact of childhood adversity on suicidality and clinical course in treatment-resistant depression**. Journal of Affective Disorders, 2014. 152-154 v., 122-130 p.

UCHENDU, C. N.; ISEK, T. **Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats**. African Health Sciences, 2008. 8 v., 3 n., 163-167 p.

VAN PRAAG, H. M.; KORF, J. **Endogenous depressions with and without disturbances in the 5-hydroxytryptamine metabolism: A biochemical classification?**. Psychopharmacologia, 1970. 19 v., 2 n., 148-52 p.

WAGLE, M.; MATHUR, P.; GUO, S. **Corticotropin-releasing factor critical for zebrafish camouflage behavior is regulated by light and sensitive to ethanol.** J Neurosci, 2011. 31 v., 1 n., 214-224 p.

WATANABE, C. M. H.; WOLFFRAM, S.; ADER, P.; RIMBACH, G.; PACKER, L.; MAGUIRE, J. J.; SCHULTZ, P. G.; GOHIL, K. **The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba.** PNAS, 2001. 12 v., 6577-6580 p.

WILLNER, PAUL. **Animal models of depression: an overview.** Pharmacology and Therapeutics, 1990. 45 v., 425-255 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates.** Geneva: WHO/MSD/MER, 2017, 22p. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSDMER-2017.2-eng.pdf>>. Acesso em: 15 de novembro de 2017.

YOUDIM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPHY, J. A.; **Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system.** Free Radical Biology & Medicine, 2004. 37 v., 11 n., 1683–1693 p.

Tabela 1. O horário da UCMS incluiu o total de seis estressores leves que foram aplicados aos peixes dos grupos de estresse (sociais ou isolados).

Cronograma do UCMS						
Dia	Exposição do dorso	Mudança de Tanque	Perseguição Rede	Elevar com Rede	Mudança de Água	Restringir no Tubo
Segunda-feira					13:30	14:45
Terça-feira	14:45			16:45		
Quarta-feira					13:15	11:00
Quinta-feira	13:15	15:00				
Sexta-feira			16:15	18:15		
Sábado	19:00			17:30		
Duração/ Frequência de Estressor	2 min	6 times	2 min	2 min	3 times	60 min

Tabela 2. Efeito do tratamento com extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) por exposição à gavagem em *Danio rerio* (zebrafish) por 48 horas.

Número e porcentagem de animais mortos						
Dose	0 g/kg	1 g/kg	3 g/kg	5 g/kg	7 g/kg	9 g/kg
Nº de mortes	0	0	3	7	10	12
Porcentagem	0%	0%	25%	58%	83%	100 %

N = 12/grupo, DL₅₀ = 4,515 g/kg. Teste de próbitos.

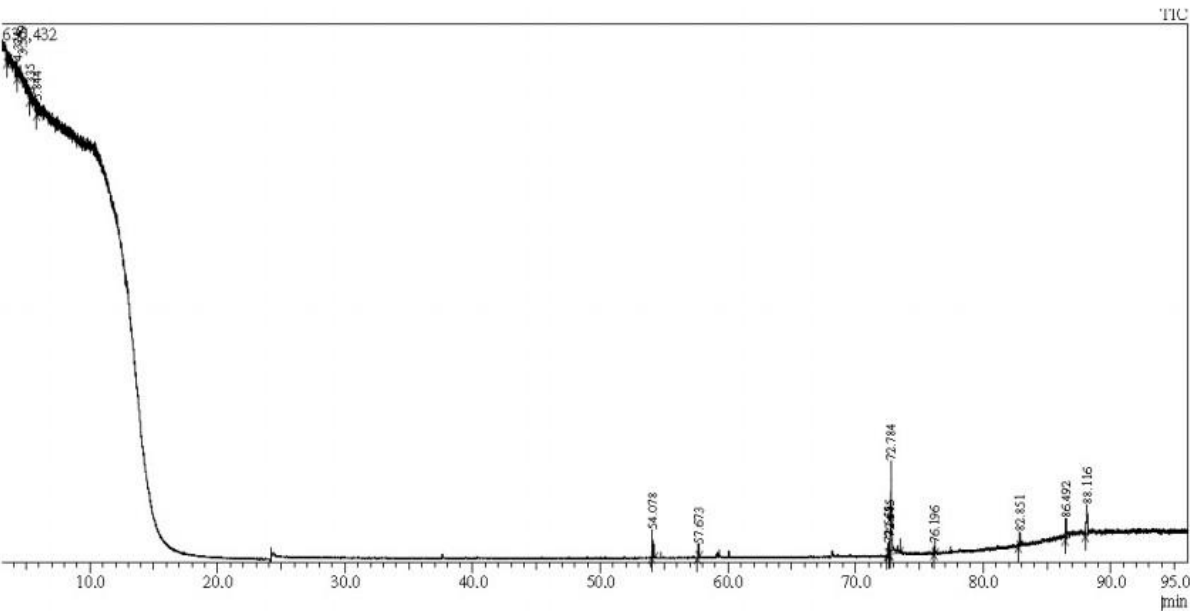


Figure 1. Chromatogram of hexane fraction of the crude extract from *Spondias mombin* leaves (HELSm).

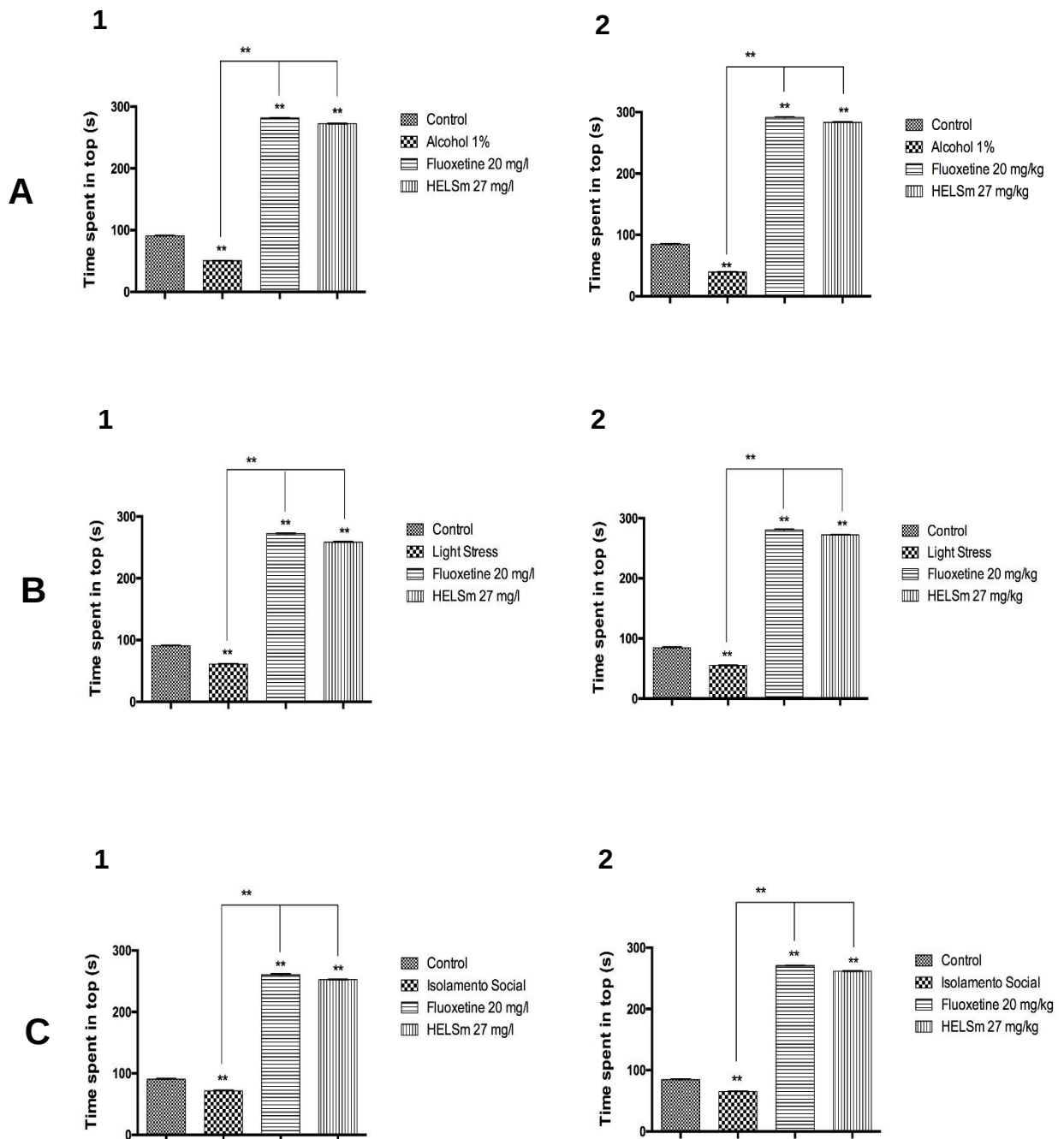


Figure 2. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (Time spent in top), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (right pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 12$ /groups), ** $p < 0.01$ vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukeytest.

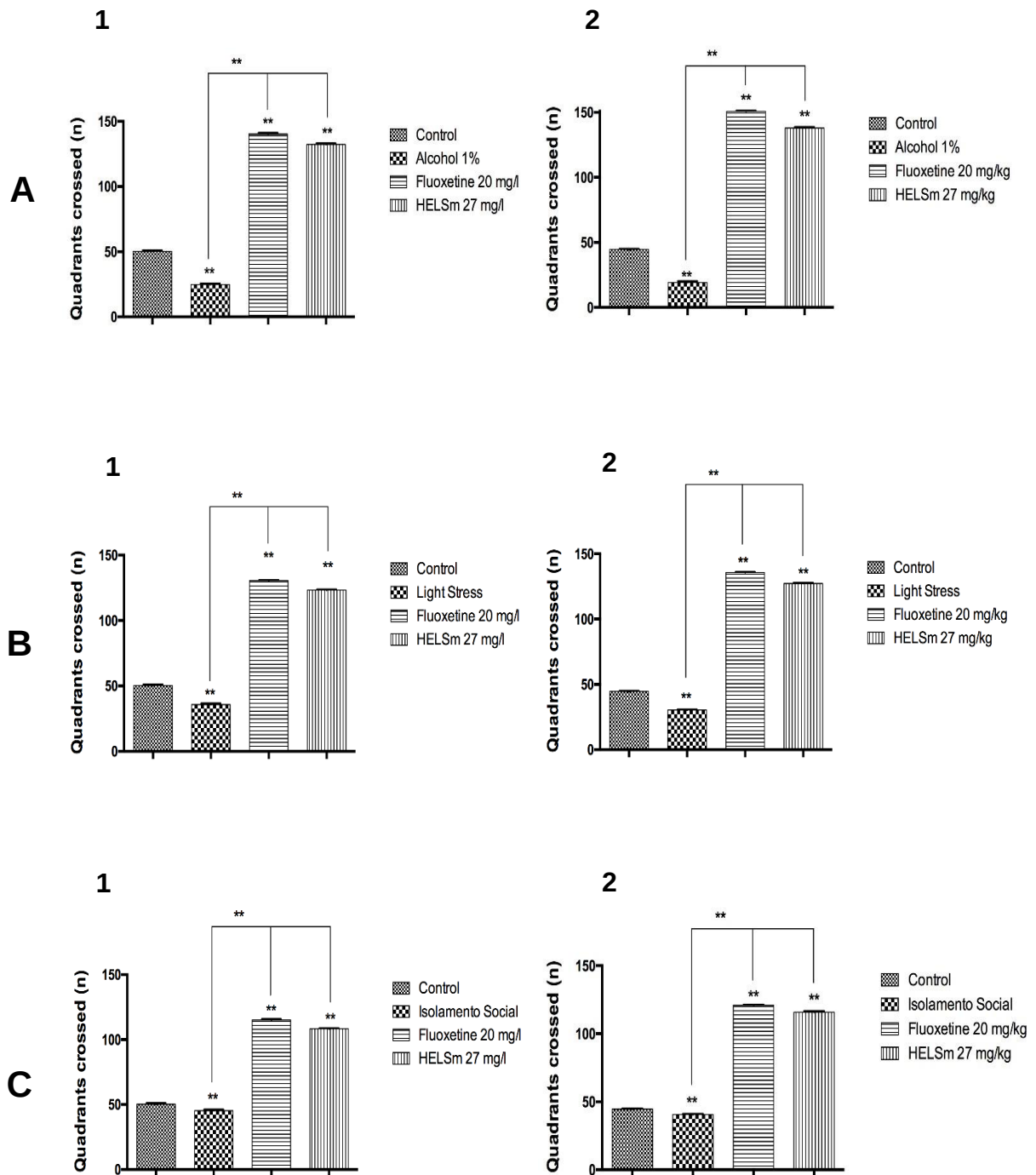


Figure 3. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (quadrants crossed), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (right pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p < 0.01 vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukey test.

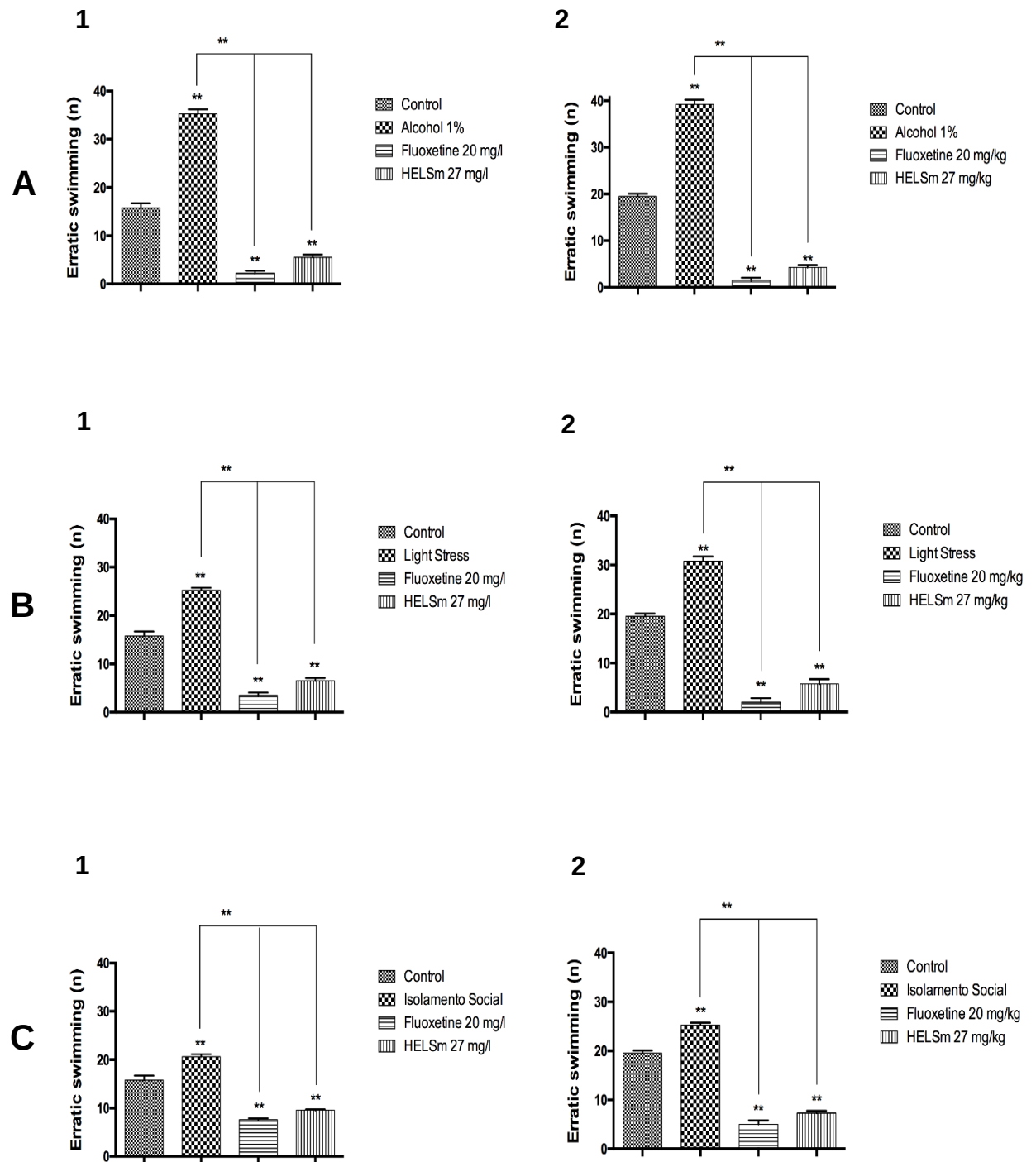


Figure 4. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (erratic swimming), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (right pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 12$ /groups), ** $p < 0.01$ vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukeytest.

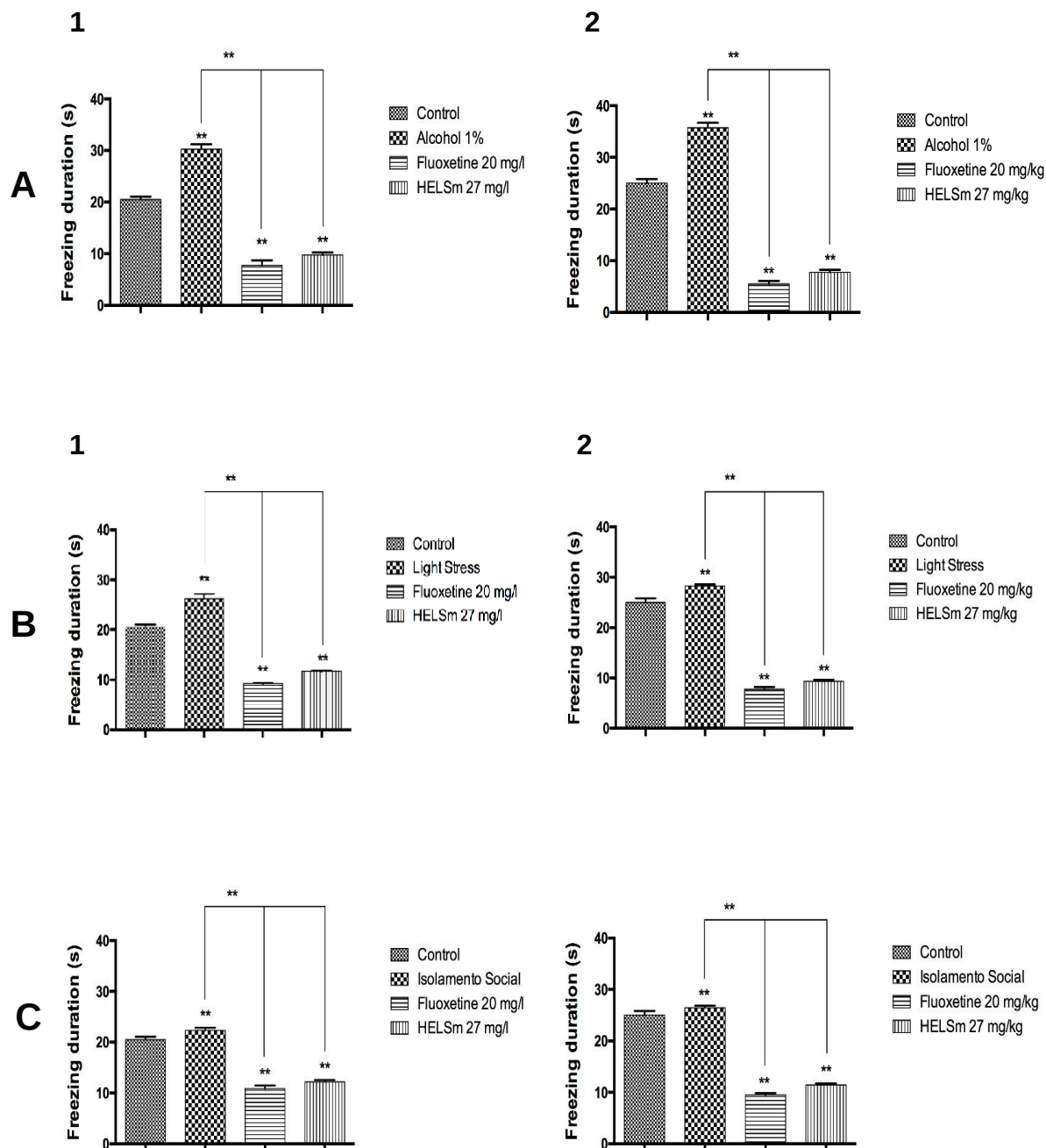


Figure 5. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (freezing duration), between immersion 1) (left panel) and oral (gavage) 2) (right panel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p < 0.01 vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukeytest.

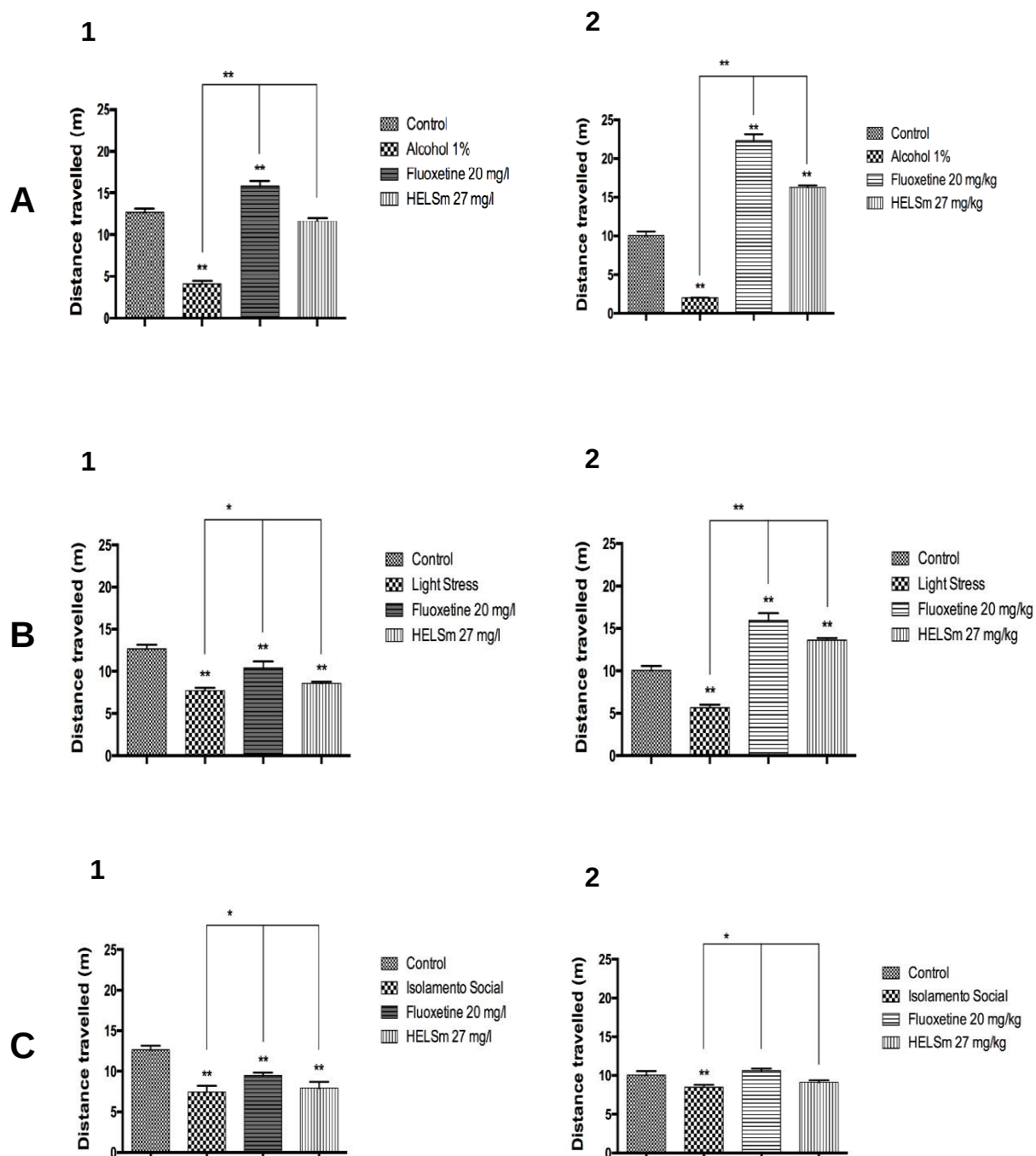


Figure 6. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (distance travelled), between immersion 1) (left pannel) and oral (gavage) 2) (right pannel). Data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 12/groups), ** p< 0.01 vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukeytest.

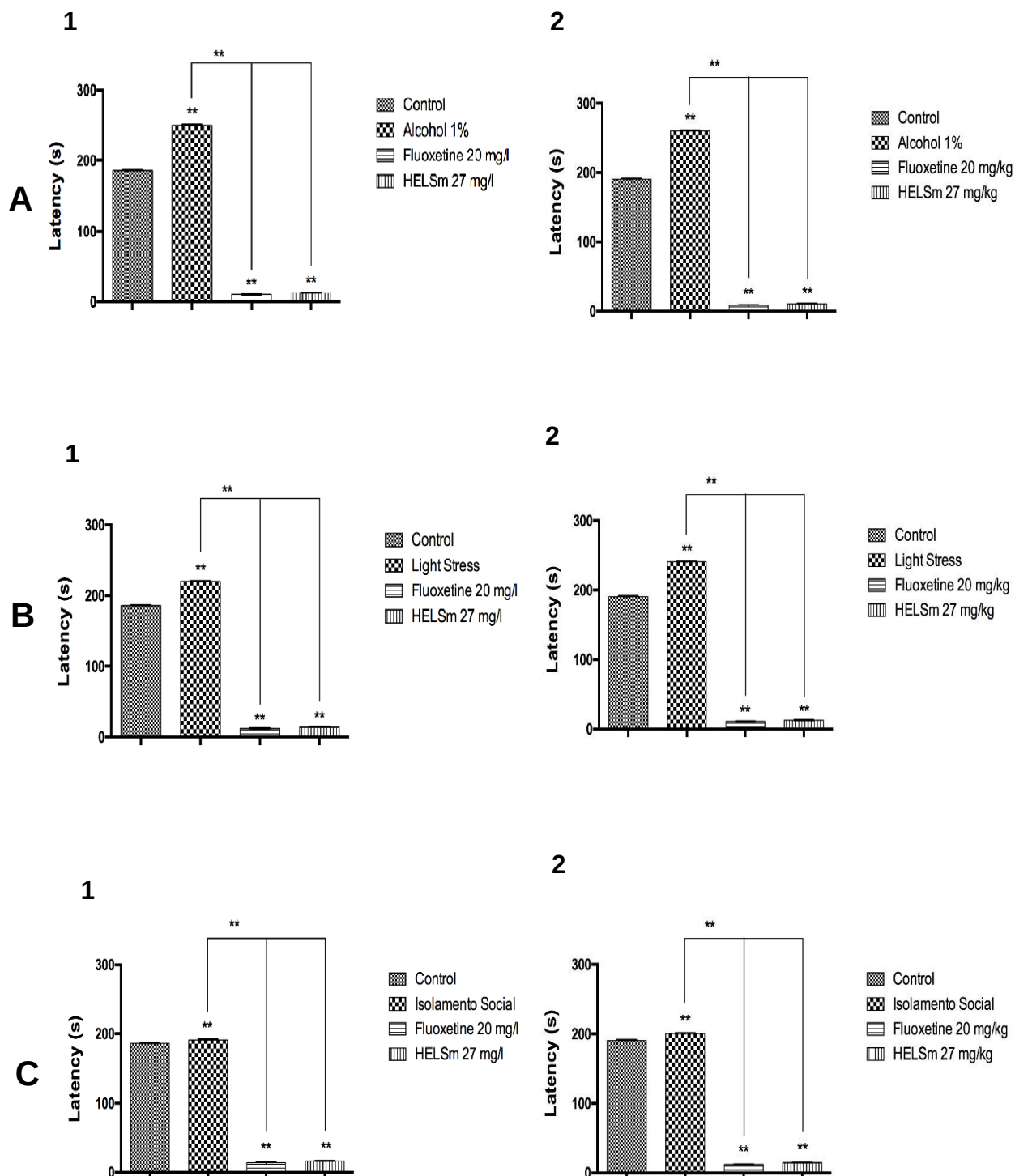


Figure 7. Effects of hydroethanolic extract from *S. mombin* leaves (HELSm), fluoxetine (positive control) in groups of induction of comportamientso type depression A) alcohol B) light stress C) social isolation on zebrafish behavior in the novel tank diving test (latency), between immersion 1) (left panel) and oral (gavage) 2) (right panel). Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 12$ /groups), ** $p < 0.01$ vs. controls groups, statistical analysis was done by one-way ANOVA followed by Tukeytest.

A submeter

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Spondias mombin L. EM *Danio rerio* (ZEBRAFISH)**

Tafnis Ingret dos Santos Sampaio^{1,2}, Brenda Lorena Sánchez-Ortiz^{2,4}, Nayara Costa de Melo^{2,3},
Raphaëlle Sousa Borges^{2,3}, Gisele Custódio de Souza^{2,3}, Bianca Thais de Freitas Paiva², Gerley
Anatê da Silva Aleluia², Fernando Luiz Pinheiro da Silva Neto², Heitor Ribeiro da Silva², Hady Keita⁵, e
José Carlos Tavares Carvalho^{2*}.

1Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Biológicas e
da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

2Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Curso de Farmácia, Departamento de Ciências Biológicas e
da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

3Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica, Departamento de Ciências Biológicas e da
Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá, Brasil.

4 Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad Universitaria, Coyoacán, CP 04510 Ciudad de México, México.

5Universidad de la Sierra Sur, Division de Pós-Grado, Instituto de Investigación sobre la Salud
Pública, Calle Guillermo Rojas Mijangos S/N, Ciudad Universitaria, Miahuatlán de porfirio Díaz,
Oaxaca, Mexico

RESUMO

Spondias mombin L. é uma planta usada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. Em suas folhas são encontradas polifenóis e derivados. É reconhecido suas atividades antifúngica, antibacteriana e ansiolítica. Apesar de seu grande potencial para indústria farmacêutica, o seu potencial em termos de toxicidade ainda não foi relatado em zebrafish. Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) em *Danio rerio* (zebrafish) por duas vias: imersão e oral. A Concentração letal (CL₅₀) e a Dose letal (DL₅₀) foram determinadas e, os efeitos da administração aguda (48h) sobre o comportamento, sobre os parâmetros histopatológicos do cérebro, brânquias, fígado, rins e intestino foram avaliados. A exposição por imersão em diferentes concentrações do EHEFSm (25, 50 e 75 mg/l) permitiu a determinação da CL₅₀ = 49.86 mg/l em 48h. O EHEFSm na concentração de 75 mg/l induziu 100% de mortalidade. O tratamento por via oral com as diferentes doses (1, 3, 5, 7 e 9 g/kg) permitiu a determinação da DL₅₀=4,515 g/kg em 48h. O EHEFSm na concentração de 9 g/kg induziu 100% da mortalidade. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a administração por via oral do EHEFSm é altamente segura e, as alterações histopatológicas encontradas são dependentes da dose utilizada e da via de administração.

Palavras-chave: *Spondias mombin*; zebrafish; *Danio rerio*; folhas; toxicidade.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos fitoterápicos costumam apresentar menor incidência de efeitos colaterais do que as drogas sintéticas (DREW; MYERS, 1997). Porém, afirmar que as drogas vegetais são seguras e livres de efeitos colaterais não é correto. Alguns constituintes ativos das plantas apresentam alta toxicidade.

Dentre as plantas que são utilizadas na medicina popular encontra-se a *Spondias mombin* L., uma árvore nativa das Américas Central e Sul (CROAT, 1974; AYOKA et al. 2006), e encontrada também no Oeste da Índia, nas florestas úmidas do Sul do México até o Peru estendendo-se até o Brasil. Apesar dos extratos dessa planta apresentarem vários estudos com atividade farmacológica reconhecida, ainda há pouco conhecimento sobre o potencial de toxicidade *in vivo* desta planta. Assim, são necessários maiores estudos para garantir a segurança de seu uso (OFFIAH; ANYANWU, 1989; BEHRA et al., 2002; AYOKA et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007; UCHENDU; ISEK, 2008; IGWE et al., 2011; OLOYE et al., 2013; ELUFIOYE et al., 2017).

O estudo de toxicidade de um determinado produto, utiliza metodologias para verificar e classificar à sua capacidade de provocar danos agudos a organismos vivos, e pode contribuir para estabelecer parâmetros de segurança, juntamente com outros dados de toxicidade, para a saúde humana (VALADARES, 2006; ZATTA et al., 2009). Quanto as plantas, este estudo é válido para identificar a toxicidade que as mesmas possam apresentar e, dessa forma, diminuir a ideia da população em acreditar que produtos naturais não possuem efeitos tóxicos ou adversos (LAPA, 1999; LAPA et al., 2001; MARLIÉRE et. al., 2008; SILVEIRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

A toxicidade dos produtos fitoterápicos não é avaliada regularmente, distoando com o aumento das pesquisas realizadas, na tentativa de descobrir e produzir drogas convencionais. A carência de dados sobre a avaliação da toxicidade ratifica a necessidade de estudos dessa natureza que possam contribuir para a utilização segura desses produtos (OUEDRAOGO et al., 2012; WILLS et al., 2012).

A literatura tem apresentado diversos estudos de extratos de plantas com algum efeito terapêutico, o que torna cada vez mais necessário estabelecer parâmetros de toxicidade (SHAHJAHAN et al., 2004; TCHAMADEU et al., 2011).

Uma parcela considerável das pesquisas médicas faz uso de modelos animais para aumentar o conhecimento sobre as causas de doenças e testes com terapias

inovadoras. Os animais mais utilizados nas pesquisas biológicas são ratos e camundongos. Mas o *Danio rerio* (zebrafish) foi introduzido no cenário científico, pois é um pequeno teleósteo (3 a 4 cm), tropical de água doce, que nos últimos anos vem se mostrando um excelente modelo experimental para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas, testar novos agentes terapêuticos estudos comportamentais, genéticos e toxicológicos (LIESCHKE; CURRIE, 2007; KARI; RODECK; DICKER, 2007). Em estudos para a triagem de produtos naturais, o zebrafish tem se destacado como modelo experimental devido ao número crescente de publicações nos últimos anos utilizando o animal em ensaios biológicos para a avaliação de moléculas bioativas de extratos de plantas (SANTOS et. al, 2016). Por apresentar órgãos bastante sensíveis, o zebrafish pode ser útil para avaliar os efeitos tóxicos de substâncias através do estudo histopatológico dos órgãos danificados (CARVALHO et. al, 2017).

O estudo histopatológico utiliza metodologias sensíveis para o diagnóstico dos efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetam os tecidos animais. Por essa razão é considerada um método eficaz na avaliação de agentes tóxicos sobre os animais e, por isso, é utilizada em análises do efeito de xenobióticos (HEATH, 1995; SCHWAIGER et al., 1997; MARTINEZ; CÓLUS, 2002; ALBINATI et al., 2009). A histopatologia gera dados sobre lesões em níveis teciduais, ela não especifica a causa da lesão, mas sim a resposta biológica à agressão. Apesar disso, quando associados a outros métodos de análises, estudos histológicos podem auxiliar na compreensão profunda de determinadas situações. Por isso, a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos (LINS et al., 2010).

Com base no que foi exposto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito toxico agudo do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) em modelo *Danio rerio* (zebrafish) por via de imersão e oral (gavagem).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Spondias mombin* foram coletadas na cidade de Macapá (0°00'22.67": -51°06'57.60"), Estado do Amapá, Brasil. Uma amostra do material

vegetal fértil, foi identificada e depositada no Herbário da Embrapa Amazônia Oriental (IAN), situado em Belém, PA – Brasil, sob o número de exsicata 195999.

O extrato foi preparado por maceração a partir das folhas secas de *Spondias mombin* trituradas, com solução hidroetanólica (75%), durante 48 horas. O extrato foi concentrado por rotaevaporação e, posteriormente liofilizado, apresentando rendimento de 29,58%. Foi armazenado em frasco âmbar, em dessecador, até o momento de uso.

2.2. ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

2.2.1. Animais

Foram utilizados animais de ambos os sexos da espécie *Danio rerio* (linhagem tipo selvagem, com 6 meses de idade, 3,5-4,0 cm de comprimento e pesando em média 650 mg) provenientes de Acqua New Aq. e Peixes Ltda ME, Igarassu-PE. Os animais foram mantidos na Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, da Universidade Federal do Amapá, na temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ com ciclo claro/escuro de 12 h. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com artemia salina e/ou ração.

Os protocolos experimentais estão de acordo com a legislação para experimentação animal estabelecida pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP sob o número de protocolo 003/2017.

2.2.2. Avaliação dos parâmetros comportamentais de *Danio rerio* (zebrafish)

A análise comportamental foi realizada através da exposição dos animais as soluções testadas durante 48 horas. Nesse período foi observado o comportamento dos peixes após a aplicação do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm). O comportamento foi avaliado por um observador humano e filmado com uma câmera (Nikon D3300), após: 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas da exposição ao EHEFSm. As reações comportamentais foram caracterizadas em três estágios:

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

2.2.3. Determinação da concentração letal média (CL₅₀)

Em um aquário de 1 litro, o extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) foi diluído em diferentes concentrações (25, 50, 75 mg/l) para obtenção da concentração letal média (CL₅₀). Cada concentração foi realizada em triplicata, utilizando-se 4 animais para cada concentração e, os peixes permaneceram em contato com a solução por 48 horas. Nesse período os animais foram observados, as alterações comportamentais e mortalidade foram registradas. Os mesmos ficaram em jejum por 24 horas antes do experimento, de modo a manter constante as concentrações durante a exposição.

2.2.4. Determinação da dose letal média (DL₅₀)

Para obtenção da concentração letal média (DL₅₀), foram utilizados animais adultos, coletados aleatoriamente do tanque e submetidos, um por vez, a administração por via oral. Os peixes foram anestesiados com água gelada 4°C, em seguida imobilizados em esponja umedecida de 7 cm, preparada para este fim, e assim, com auxílio de uma pipeta volumétrica (HTL Lab Solutions) foram administradas por via oral as diferentes doses no volume de 2 µl/animal (1, 3, 5, 7, 9 g/kg). Cada dose foi realizada em triplicata, utilizando-se 4 animais para cada dose, e os peixes permaneceram em contato com a solução por 48 horas. Nesse período os

animais foram observados, e as alterações comportamentais e mortalidade foram registradas. A DL₅₀ foi determinada utilizando o método de próbitos.

2.2.5. Avaliação da mortalidade

A mortalidade foi monitorada continuamente, e os peixes foram considerados mortos quando o movimento do opérculo e resposta a estímulos mecânicos já não puderem ser detectados. Após o término do experimento os peixes restantes foram submetidos à eutanásia.

2.2.6. Avaliação dos parâmetros histopatológicos

Os órgãos (cérebro, brânquias, fígado, rins e intestino) foram fixados em solução de Bouin por 24 horas. Após este período, os peixes fixados tiveram as nadadeiras removidas e cauda seccionada na linha que vai do ânus até a porção posterior da nadadeira dorsal. Em seguida, o material foi descalcificado em solução de EDTA a 7% por 48 horas. As metades foram desidratadas em bateria de álcoois, diafanizadas em xilol e depois incorporadas em parafina (Inlab Co.), seguindo a técnica descrita por Souza et al., (2016). A coloração utilizada foi HE (Hematoxilina de Harris – LABORCLIN e Eosina Amarelada – INLAB), de acordo com a técnica de Souza et al. (2016).

A análise histopatológica dos órgãos foi realizada usando microscopia óptica (Olympus-micronal BX41) e as fotografias foram obtidas usando MDCE-5C Câmera Digital USB 2.0. Seguidamente, eles foram classificados de acordo com sua gravidade e ocorrência, permitindo a determinação dos valores médios de avaliação (VMA) descrito por Schwaiger et al., (1996), e IHA (índice de alterações histológicas) com base no método descrito por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). Os parâmetros histopatológicos são mostrados nas Tabelas 3-7.

2.3. MÉTODO DE ANÁLISE DO MATERIAL PREPARADO

Para a análise das lâminas foi considerada uma série de alterações histopatológicas nos órgãos, conforme mostram as Tabelas 3-7, que foram classificadas em ordem de gravidade e as ocorrências foram registradas.

Possibilitando a aplicação de dois índices para a avaliação das alterações. Um deles é o VMA, proposto por Schwaiger et al. (1997), calculado a partir de uma análise semiquantitativa baseada em uma escala de severidade e ocorrência das lesões:

grau 1 = sem alterações patológicas;

grau 2 = alterações pontuais brandas a moderadas;

grau 3 = alterações patológicas severas e amplamente distribuídas.

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

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

Estágio I: Alterações que não comprometem o funcionamento do tecido.

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

Estágio III: Alterações muito severas e irreversíveis.

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

a) para o primeiro estágio: 10^0

b) para o segundo estágio: 10^1

c) para o terceiro estágio: 10^2

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

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

Sendo:

a: primeiro estágio de alterações.

b: segundo estágio de alterações.

c: terceiro estágio de alterações.

na: número total de alterações consideradas como sendo do primeiro estágio.

nb: número total de alterações consideradas como sendo do segundo estágio.

nc: número total de alterações consideradas como sendo do terceiro estágio.

N: número de peixes analisados por tratamento.

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

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

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados obtidos, foi utilizado o Software GraphPad Prism versão 6.0. Para análise dos dados aplicou-se ANOVA (one-way) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação dos grupos testes e controle. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS DE *Danio rerio* (ZEBRAFISH)

A exposição de *D. rerio* a diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) induziu várias alterações, e foram classificados de acordo com os estágios I, II e III.

Por imersão a concentração de 25 mg/l do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) não produziu alteração comportamental acentuada sobre os animais, apenas aumento da atividade do nado nos minutos iniciais. Todos os peixes nessa concentração ficaram 48 horas em imersão.

Na concentração de 50 mg/l, os animais apresentaram aumento na atividade do nado, perda de postura, perda de motilidade, deposição do animal no fundo do aquário e morte, essas alterações foram expressadas durante as primeiras 24 horas, após esse período não houve alteração nos peixes que permaneceram vivos.

Já na concentração de 75 mg/l, nenhum dos animais sobreviveu às 48 horas de teste, após 9 horas de teste, todos os peixes haviam expressado aumento da atividade do nado, espasmos, tremores no eixo da cauda, nado circular, perda de postura, clônus, perda de motilidade, deposição do animal no fundo do aquário e morte.

Em relação ao teste realizado por via oral, na dose de 1 g/kg do EHEFSm, embora nenhum peixe tenha morrido até o final do experimento, assim que foram submetidos ao teste, os animais apresentaram aumento da atividade do nado e leves tremores no eixo da cauda.

Na dose de 3 g/kg observou-se aumento da atividade do nado, espasmos e tremores no eixo da cauda. A dose 5 g/kg apresentou os mesmos estágios da dose anterior e o nado circular do animal. É importante ressaltar que essa dose estimulou a liberação de ovos nas fêmeas férteis utilizadas nesse teste.

Nas doses 7 e 9 g/kg os animais apresentaram todas as atividades descritas nos estágios com clônus acentuado, mas ainda assim a dose de 7 g/kg foi capaz de chegar ao fim do teste de 48 horas com peixes ainda vivos, e na dose de 9 g/kg todos os peixes morreram antes das primeiras 24 horas.

3.2. DETERMINAÇÃO DA CL₅₀

O tratamento por imersão com extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) nas concentrações de 25, 50 e 75 mg/l, possibilitou a determinação da CL₅₀ em 48 horas de 49,86 mg/l (Figura 1).

3.3. DETERMINAÇÃO DA DL₅₀

O tratamento por via oral com extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) nas doses de 1, 3, 5, 7, e 9 g/kg, possibilitou a determinação da DL₅₀ em 48 horas de 4,515 g/kg (Figura 2).

3.4. AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE

A Tabela 1 e a Tabela 2 apresentam o percentual de animais mortos com os tratamentos, tanto por imersão quanto por gavagem com o extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm). Sendo que em elevadas concentrações (75 mg/l) e (9 g/kg) a letalidade chegou a 100%.

3.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

3.5.1 Via de imersão

No estudo histopatológico das brânquias, no tratamento realizado por imersão a concentração de 25 mg/l do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) apresentou alterações de nível I, como afastamento das células epiteliais, congestão dos vasos e fusão parcial das lamelas, além de alterações de nível II, ruptura epitelial (Figura 3). O índice de alteração histológica (IHA) foi de 3,2 demonstrando assim, que o órgão permaneceu funcionalmente normal.

Na concentração de 50 mg/l, as alterações encontradas foram de nível I e II, afastamento das células epiteliais e a fusão parcial das lamelas, as alterações de nível II foram a ruptura epitelial e o distanciamento da lamela primária. Com o IHA de 5,5 caracterizando o órgão como funcionalmente normal.

A imersão realizada com 75 mg/l resultou em alterações de nível I, II e III. As alterações de nível I foram congestão nos vasos e infiltração de leucócitos. Como alterações de nível II estão a ruptura epitelial, o distanciamento da lamela primária, a fusão completa das lamelas e a degeneração celular. A alteração de nível III foi a necrose. Apresentou o IHA de 35,5. Dessa forma, esse órgão foi classificado como apresentando alterações moderadas a graves. As alterações mais frequentes nas brânquias de *D. rerio* podem ser observadas na Tabela 3.

O fígado do zebrafish foi outro órgão analisado na histologia, quando o animal é exposto, por imersão, a concentração de 25 mg/l do EHEFSm o fígado dele apresenta alterações nível I e II (Figura 4). As alterações de nível I foram aumento do volume dos vasos e vacuolização citoplasmática, as alterações de nível II foram degeneração celular, vacuolização nuclear e atrofia nuclear. O índice de alteração foi de 8 demonstrando que o órgão permaneceu funcionalmente normal.

Na concentração de 50 mg/l, as alterações encontradas foram de nível I e II, como alterações de nível I estão a perda do contorno nuclear, diminuição da frequência relativa de núcleos e diminuição de glicogênio, as alterações de nível II foram degeneração celular, vacuolização nuclear, atrofia nuclear e degeneração citoplasmática (Figura 4). O IHA foi de 8,2 caracterizando o órgão como funcionalmente normal.

Quando o peixe entrou em contato com a concentração de 75 mg/l as alterações histopatológicas encontradas foram de nível I e II. As alterações de nível I foram perda do contorno nuclear, aumento da frequência de vasos e diminuição, no nível II foram degeneração celular, vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática e atrofia nuclear (Figura 4). O cálculo do IHA resultou no valor de 8,2 que significa órgão funcionalmente normal. As alterações que foram encontradas no fígado de *D. rerio* são apresentadas na Tabela 4.

As alterações habitualmente encontradas nos rins de *D. rerio* foram apresentadas na Tabela 5. Na concentração de 25 mg/l de nível I foram degeneração hialina tubular, desorganização tubular e aumento do espaço da cápsula de Bowman. De nível II foi encontrada a hiperemia. O índice de alteração histológica foi de 3,2 demonstrando como normal o funcionamento do órgão. Esses resultados estão expressos na Figura 5.

Já na concentração de 50 mg/l foram observadas desorganização tubular, aumento do espaço da cápsula de Bowman e dilatação dos capilares glomerulares, que são alterações de nível I. As alterações de nível II foram degeneração hialina tubular e hiperemia. O IHA foi de 5,8 dessa forma, o funcionamento do órgão foi considerado normal (Figura 5).

A concentração de 75 mg/l causou alterações dos três níveis, as alterações de nível I foram aumento do espaço da cápsula de Bowman e desorganização tubular; nível II degeneração hialina tubular, hiperemia e degeneração citoplasmática das células tubulares; nível III necrose. O IHA foi de 33 assim sendo, as alterações foram classificadas como moderadas a graves.

Os animais submetidos ao tratamento com a concentração de 25 mg/l apresentaram no intestino alterações de nível I e II. Dentre as alterações foram encontradas atrofia dos vilos, vacuolização dos enterócitos e encurtamento da lâmina própria. A alteração de nível II foi distanciamento da lâmina própria, resultando em IHA de 3,2 classificado como órgão funcionalmente normal.

Na concentração de 50 mg/l as alterações de nível I encontradas foram atrofia dos vilos, distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal, infiltração de leucócitos, hipertrofia das células epiteliais e degeneração das células. As alterações de nível II foram degeneração do vilo e distanciamento da lâmina própria, a necrose foi a alteração de nível III. O IHA foi de 31,2 sendo alterações moderadas a graves.

A concentração de 75 mg/l apresentou como alterações de nível I atrofia dos vilos, distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal, infiltração de leucócitos, degeneração das células, encurtamento da lâmina própria, degeneração da camada muscular e vacuolização dos enterócitos, como alterações de nível II degeneração do vilo e destruição da mucosa intestinal, como alteração nível III a necrose. O IHA foi de 31,7 sendo alterações classificadas como moderadas a graves. As alterações frequentes no intestino estão na Tabela 6 e os resultados referentes a ele na Figura 6.

As alterações frequentes no cérebro estão na Tabela 7. No cérebro a alteração causada pelo tratamento com a concentração de 25 mg/l foi de nível I, apresentando dilatação dos vasos (Figura 7). O IHA foi 0,2 classificando os órgãos como normais.

Na concentração de 50 mg/l a exposição resultou em alterações de nível II com atrofia de neurônios, cromatólise central e células grânulo-adiposas. O IHA foi de 7,5 demonstrando assim, que o órgão permaneceu funcionalmente normal.

A concentração de 75 mg/l apresentou alteração de nível II com cromatólise central e células grânulo-adiposas e nível III com necrose de neurônios. O IHA foi de 30, classificando as alterações como moderadas a graves.

3.5.2 Via oral

O tratamento por via oral (gavagem) com a dose de 1 g/kg do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) apresentou alterações de nível I e II nas brânquias, as alterações de nível I foram afastamento das células epiteliais, congestão dos vasos e hiperplasia das células de cloreto. A alteração de nível II foi a ruptura epitelial (Figura 8). O índice de alteração histológica (IHA) foi de 3,2 demonstrando que o órgão permaneceu funcionalmente normal.

Na dose de 3 g/kg foi possível observar alterações de nível I e II. Dentre as alterações de nível I estão afastamento das células epiteliais, congestão dos vasos,

presença das células de cloreto na lamela, infiltração de leucócitos e hiperplasia das células epiteliais. As únicas alterações de nível II encontradas foram a ruptura epitelial e a degeneração celular (Figura 8). O IHA encontrado foi de 6,2 resultando em órgão funcionalmente normal.

A dose de 5 g/kg apresentou alterações nos três níveis. No nível I afastamento das células epiteliais, presença das células de cloreto na lamela, infiltração de leucócitos e fusão parcial das lamelas. No nível II degeneração celular e ruptura epitelial. No nível III necrose e fibrose (Figura 8). IHA foi de 56 classificado como danos irreversíveis.

Os animais submetidos a dose de 7 g/kg demonstraram alterações nos três níveis. No nível I afastamento das células epiteliais, infiltração de leucócitos e fusão completa das lamelas. No nível II ruptura epitelial, degeneração celular e aneurisma. No nível III necrose e fibrose (Figura 8). IHA foi de 58,2 caracterizando alterações com danos irreversíveis.

A dose de 9 g/kg também teve alterações nos três níveis. No nível I afastamento das células epiteliais, presença das células de cloreto na lamela e fusão completa das lamelas. As alterações de nível II foram ruptura epitelial, hemorragia, aneurisma e degeneração celular. No nível III foram encontradas necrose e fibrose (Figura 8). O IHA foi de 60,7 com alterações com danos irreversíveis.

Com o tratamento com a dose de 1 g/kg do EHEFSm por via oral o fígado do animal apresentou alterações de nível I e II. No nível I a alteração encontrada foi a perda do contorno celular. No nível II degeneração nuclear, degeneração citoplasmática, ruptura celular e hiperemia (Figura 9). O IHA foi de 2,5. Órgão funcionalmente normal.

A dose de 3 g/kg do EHEFSm mostrou alterações de nível I e II. No nível I foram encontradas a perda do contorno celular e a perda do contorno nuclear. No nível II ruptura celular, vacuolização nuclear e esteatose (Figura 9). O cálculo do IHA teve como resultado o valor de 5,5 classificando o órgão como funcionalmente normal.

No tecido hepático a dose de 5 g/kg do EHEFSm produziu alterações de nível I e II. No nível I foi encontrada perda do contorno nuclear. No nível II degeneração nuclear, degeneração citoplasmática, ruptura celular, hiperemia, colestase, esteatose, atrofia nuclear e vacuolização nuclear (Figura 9). O IHA foi de 20,2 classificando como órgão apresentando alterações moderadas a graves.

Na dose de 7 g/kg do EHEFSm mostrou alterações nos três níveis. No nível I foi encontrada perda do contorno nuclear e vacuolização citoplasmática. No nível II degeneração nuclear e ruptura celular. No nível III foi encontrada necrose (Figura 9). O valor do IHA foi de 30,5 classificando o órgão como apresentando alterações moderadas a graves.

A dose de 9 g/kg do EHEFSm mostrou alterações nos três níveis. No nível I foi encontrada perda do contorno nuclear. No nível II degeneração nuclear, atrofia nuclear, ruptura celular e vacuolização. No nível III foi encontrada necrose (Figura 9). O cálculo do IHA apresentou resultado com valor de 35,2 classificando o órgão como apresentando alterações moderadas a graves.

Com a dose de 1 g/kg do EHEFSm os rins do animal apresentaram alterações de nível I e II. No nível I as alterações foram desorganização tubular e aumento do espaço da cápsula de Bowman. No nível II degeneração hialina tubular e degeneração glomerular (Figura 10). O IHA foi de 5,5. Com o órgão funcionalmente normal.

A dose de 3 g/kg do EHEFSm provocou alterações nos três níveis. No nível I a única alteração foi o aumento do espaço da cápsula de Bowman. No nível II degeneração hialina tubular, hiperemia e degeneração citoplasmática das células tubulares. No nível III foi encontrada necrose (Figura 10). O IHA foi de 32,7. Órgão apresentando alterações moderadas a graves.

Quando administrado por via oral a dose 5 g/kg do EHEFSm provocou alterações nos três níveis. No nível I a única alteração foi o aumento do espaço da cápsula de Bowman. No nível II degeneração hialina tubular, hiperemia, degeneração citoplasmática das células tubulares e ruptura dos vasos. No nível III foi encontrada necrose (Figura 10). O IHA foi de 35,2. Com o órgão apresentando alterações moderadas a graves.

A dose de 7 g/kg do EHEFSm provocou alterações nos três níveis. No nível I as alterações apresentadas foram degeneração hialina tubular e aumento do espaço da cápsula de Bowman. No nível II degeneração tubular, hiperemia, degeneração citoplasmática das células tubulares e ruptura de vasos. No nível III foi encontrada necrose (Figura 10). O IHA foi de 35,5. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

Na maior dose testada (9 g/kg) do EHEFSm provocou alterações nos três níveis. No nível I as alterações apresentadas foram degeneração hialina tubular e aumento do espaço da cápsula de Bowman. No nível II degeneração tubular,

hiperemia, degeneração citoplasmática das células tubulares, ruptura de vasos, degeneração nuclear das células tubulares, degeneração glomerular e tecido linfóide na cápsula de Bowman. No nível III foi encontrada necrose (Figura 10). Com IHA de 43. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

Em relação ao intestino a dose de 1 g/kg do EHEFSm desencadeou alterações nos três níveis. No nível I as alterações apresentadas foram infiltração de leucócitos, degeneração das células, encurtamento da lâmina própria, vacuolização dos enterócitos e hiperplasia das células caliciformes. No nível II degeneração do vilos e destruição da mucosa intestinal. No nível III foi encontrada necrose (Figura 11). O IHA foi de 31,2. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

Na dose de 3 g/kg o EHEFSm gerou alterações em todos os níveis. No nível I as alterações apresentadas foram atrofia dos vilos, distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilos intestinal, degeneração das células, degeneração da camada muscular, vacuolização dos enterócitos e hiperplasia das células caliciformes. No nível II destruição da mucosa intestinal e degeneração do vilos. No nível III foi encontrada necrose (Figura 11). O IHA foi de 31,5. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

A dose de 5 g/kg do EHEFSm promoveu alterações em todos os níveis. No nível I atrofia dos vilos, distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilos intestinal, degeneração das células, degeneração da camada muscular, vacuolização dos enterócitos, hiperplasia das células caliciformes e encurtamento da lâmina própria. No nível II fusão dos vilos e destruição da mucosa intestinal. No nível III foi encontrada necrose (Figura 11). O IHA foi de 34,2. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

Na dose de 7 g/kg o EHEFSm levou a alterações em todos os níveis. No nível I atrofia dos vilos, degeneração da camada muscular, hiperplasia das células caliciformes e encurtamento da lâmina própria. No nível II degeneração do vilos, destruição da mucosa intestinal, fusão dos vilos e hemorragia na lâmina própria. No nível III foi encontrada necrose (Figura 11). O IHA foi de 36. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

Na dose de 9 g/kg o EHEFSm provocou alterações em todos os níveis. No nível I atrofia dos vilos, degeneração da camada muscular, hiperplasia das células caliciformes e encurtamento da lâmina própria. No nível II degeneração do vilos, destruição da mucosa intestinal, fusão dos vilos, hemorragia na lâmina própria e

distanciamento da lâmina própria. No nível III foi encontrada necrose (Figura 11). O IHA foi de 38,5. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

Em relação ao cérebro a dose de 1 g/kg do EHEFSm gerou alterações nos três níveis. No nível I dilatação dos vasos. No nível II células grânulo-adiposas. No nível III foi encontrada necrose dos neurônios (Figura 12). Apresentando IHA de 27,7. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

A dose de 3 g/kg do EHEFSm apresentou alterações nos níveis II e III. No nível II células grânulo-adiposas e astrócitos gemistocíticos. No nível III foi encontrada necrose (Figura 12). Com IHA de 30. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

A dose de 5 g/kg do EHEFSm levou a alterações nos três níveis. No nível I apresentou dilatação dos vasos. No nível II células grânulo-adiposas e astrócitos gemistocíticos. No nível III foi encontrada necrose do neurônio (Figura 12). O IHA foi de 30,2. Órgão apresentando alterações moderadas a graves.

A dose de 7 g/kg do EHEFSm produziu alterações nos níveis II e III. No nível II cromatólise central, células grânulo-adiposas e astrócitos gemistocíticos. No nível III foi encontrada necrose do neurônio (Figura 12). O valor IHA foi de 32,5. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

A dose de 9 g/kg do EHEFSm produziu alterações nos níveis II e III. No nível II cromatólise central, células grânulo-adiposas, astrócitos gemistocíticos e atrofia neuronal. No nível III foi encontrada necrose do neurônio (Figura 12). O IHA foi de 32,5. Com órgão apresentando alterações moderadas a graves.

4. DISCUSSÃO

Os flavonoides pertencem ao amplo grupo de polifenóis (HARBONE; WILLIAMS, 2000; SCHMITT-SCHILLIG, 2005), mesmos compostos que apresentaram efeito benéfico ao cérebro (LAU; SHUKIT-HALE; JOSEPH, 2005). Além disso de acordo com o trabalho realizado por Ayoka et al., (2005) o EHEFSm na dose de 5,0 g/kg por via oral, não demonstraram nenhum sinal de toxicidade aguda em ratos Wistar, já que para testes de toxicidade, geralmente se usa ratos e camundongos e, é recomendado o uso da mesma via de administração utilizada para os humanos, sendo a via oral a mais usada (KLAASSEN; AMDUR; DOULL, 1996). Por isso foi realizada a determinação da DL₅₀, que teve como resultado o valor de 4,515 g/kg,

demonstrando assim a susceptibilidade crescente do *D. rerio* as diferentes doses de exposição, sendo que nas altas doses 9,0 g/kg a letalidade chegou a 100%. Porém, como o teste de toxicidade em peixes é realizado por via de imersão (HENARES et al., 2008; ALBINATI et al., 2009; SOUZA et al., 2016) esse teste também foi realizado para que houvesse uma comparação entre as duas vias.

O resultado de CL₅₀ obtido foi de 49,86 mg/l. É notável que a medida que se aumenta a concentração, a mortalidade dos peixes também aumenta (BILBERG et al., 2012; SOUZA et al., 2016). Comparando as duas vias, é possível observar o quão distante são as duas doses que matam a metade dos animais em cada via de administração. Mas também se faz necessário analisar os parâmetros comportamentais que cada uma das administrações causou.

No emprego de zebrafish como animal de experimentação, deve-se considerar que, quando em contato com substâncias estranhas eles podem apresentar comportamento alterado (MATHUR; BERBEROGLU; GUO, 2011). E essa atividade pode acontecer mesmo que se utilize produtos de origem natural, pois o produto fitoterápico é um corpo estranho ao organismo e, como todo xenobiótico, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos (LAPA et al., 2000). Souza et. al (2016) observaram que as alterações comportamentais no zebrafish começam com o aumento da excitabilidade do animal, seguida de perda de postura, deposição no fundo do aquário e, por conseguinte a morte e, essas alterações puderam ser observadas nesse estudo.

A partir dos estudos de Souza et al., (2016) e Carvalho et al. (2017) é possível afirmar que pelo fato do zebrafish ser um animal pequeno, a exposição dele a substâncias estranhas pode provocar reações em diversos órgãos vitais tais como as brânquias, fígado, rins e intestino. Fato que foi detectado nesse estudo, onde todos os grupos testados apresentaram alterações histopatológicas em um ou mais desses órgãos. Nesse trabalho também foi analisado o cérebro, como potencial órgão que sofre alteração quando submetido a testes de toxicidade aguda.

As brânquias são estruturas que permitem ao peixe extrair eficientemente oxigênio da água para seu uso em reações metabólicas, essa estrutura é responsável pelas trocas gasosas, regulando o equilíbrio ácido-base, além de ser o primeiro local de excreção de resíduos tóxicos, exercendo um importante papel no balanceamento iônico (HOULIHAN; RANKIN; SHUTTLEWORTH, 1982; BALDISSEROTTO, 2002; HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2012).

Esse contato direto das brânquias com o ambiente aquático é uma característica importante no que diz respeito às trocas gasosas, pois as brânquias tornam-se um órgão indicador de contaminação ambiental por estar em contato direto com o ambiente externo, sendo particularmente sensíveis à presença de contaminantes no meio e, os primeiros a reagir às condições desfavoráveis de um ambiente (LINS et al., 2010).

Segundo Mazon et al., (2002) a distensão das células epiteliais promove hemorragias e aneurismas no tecido branquial, conforme observado nos grupos tratados com 7 e 9 g/kg do EHEFSm. De forma similar, Lins et al (2010), mencionou que alterações vasculares como congestão (presente nos grupos 25 e 75 mg/l, além dos grupos 1 e 3 g/kg). Alterações histopatológicas como hiperplasia das células (presente no grupo tratado com 1 e 3 g/kg do EHEFSm) e afastamento do epitélio (observados nas duas vias de administração nas doses de 1, 3, 5, 7 e 9 g/kg, e nas concentrações de 25 e 50 mg/l) indicam a tentativa de adaptação do tecido às novas condições fisiopatológicas (CARVALHO et. al, 2017). Uma das formas de adaptação do tecido é a redução da passagem de água e sangue para o interior das lamelas secundárias (SOUZA et. al, 2016). Miron (2008) relacionou danos graves, como fusão de lamelas secundárias, essa alteração foi observada nos grupos das duas vias de administração 75 mg/l, 7 g/kg e 9 g/kg.

O fígado é uma glândula digestiva composta por hepatócitos e por fibras que promovem sua sustentação. A superfície hepática é revestida por uma membrana serosa e o tecido conectivo dessa cápsula penetra no parênquima hepático. Os hepatócitos são células uninucleadas com forma poligonal que possuem importantes funções metabólicas. Também é possível visualizar no fígado vascularização de grande calibre, vasos sanguíneos de pequeno calibre, ductos biliares, tecido pancreático e centro melanomacrofágico (HIBIYA, 1982). Os centros de melanomacrófagos são agrupamentos de monócitos contendo melanossomas entre os lisossomas, além de um acúmulo de ceroides e lipofuscina. A literatura sugere que esses melanossomas têm como função a produção de radicais livres utilizados como bactericidas (ROBERTS, 1975).

O fígado é fundamental para a realização do processo de desintoxicação de substâncias, e qualquer disfunção em seu tecido pode ser prejudicial ao animal e até provocar a morte (CARVALHO et. al, 2017). Os hepatócitos são o tipo celular mais frequente no zebrafish. Seu citoplasma contém glicogênio abundante e armazenam

lipídios, ferro, produzem proteínas e aminoácidos e atuam na desintoxicação de diversos compostos (HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2012). Todos os grupos utilizados na imersão e os grupos 1 e 3 g/kg apresentaram os fígados com funcionalidade normal. Alterações no tecido podem provocar disfunção hepática (CARVALHO et. al, 2017).

A vacuolização em hepatócitos foi observada em todos os grupos, exceto na dose 1 g/kg tratados com EHEFSm, essa alteração pode estar relacionada a redução do acúmulo de glicogênio nas células. Se for intensa, pode resultar na alteração do funcionamento do fígado. Segundo Carvalho et. al (2017) o fato do zebrafish ser um animal muito ágil e possuir metabolismo acelerado pode justificar a presença de vacuolização nos hepatócitos, indicando disfunção no seu metabolismo. Os grupos tratados com a dose 3 e 5 g/kg também apresentaram hiperemia. Essa condição pode ser classificada como um mecanismo de defesa, que objetiva o aumento da quantidade de células sanguíneas no tecido e, conseqüentemente, aumento da oxigenação e da chegada de nutrientes (TAKASHIMA; HIBIYA, 1984).

O rim dos peixes teleósteos é dividido em duas porções diferentes. A porção anterior é composta por tecido hematopoiético, glândula endócrina e tecido linfóide e a porção posterior é constituída de néfrons responsáveis pela filtração de resíduos sanguíneos e pela captação de sal e água. Os líquidos orgânicos dos peixes de água doce têm concentração iônica mais elevada em relação ao meio hiperosmótico. Para manter tal concentração, não permitindo a entrada em excesso de líquidos no corpo, é exigida a remoção dos íons (YONKOS, 2000). Portanto, o principal papel dos rins nos peixes teleósteos de água doce é eliminar o grande volume de água que entra no peixe através das brânquias, não sendo necessário armazená-la (HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2012). A estrutura morfológica do rim dos teleósteos em geral é caracterizada por apresentar néfrons com corpúsculos renais (glomérulos e cápsula de Bowman) (FERRAZ-LIMA; REIS; CECCARELLI, 1993; HEATH, 1995). Em avaliações toxicológicas foram descritas alterações histológicas como degeneração hialina, oclusão de túbulos renais (CAMARGO; MARTINEZ, 2007), hipertrofia celular, intensa atividade melanomacrofágica, metaplasia cartilaginosa (CARDOSO et al., 2009) e congestão renal (ALBINATI, 2009). Os grupos tratados com as maiores doses do EHEFSm apresentaram alterações moderadas a graves, esses resultados sugerem que os rins do zebrafish em uma tentativa de defender o organismo do efeito do EHEFSm o eliminando, acabaram sofrendo alterações.

O *Danio rerio* (zebrafish) é desprovido de estômago, por conta disso, o bulbo intestinal, que precede o esôfago têm função de absorção e atua como reservatório de alimentos. A camada mucosa é formada por células mucosas (globet cells), células inflamatórias dispersas e por enterócitos, que provavelmente absorvem lipídios. Através dessas células, o epitélio intestinal realiza a absorção de nutrientes e atua na resposta imune (HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2012). Os resultados mostram que as doses mais elevadas do EHEFSm foram as que mais causaram alterações no intestino do zebrafish.

Os grupos em que a via de administração foi oral apresentaram muitas alterações histopatológicas no intestino. Essa observação se deve pelo fato de nessa via, o rim ser o primeiro órgão a entrar em contato com a substância. Segundo Carvalho et al., 2017 procedimentos invasivos em peixes podem gerar inflamação na lâmina própria intestinal e provocar infiltração leucocitária no tecido epitelial do intestino. Além de provocar aumento de células de defesa (ROBERTS; ELLIS, 2012). A exposição do zebrafish a substâncias tóxicas pode causar danos à mucosa intestinal, prejudicando a fisiologia do órgão (CARVALHO et. al, 2017).

A hipertrofia de células epiteliais, observada no grupo 50 mg/l, pode ser considerada um mecanismo de defesa, servindo como barreira para reduzir a entrada dessas substâncias no epitélio intestinal (TAKASHIMA; HIBIYA, 1984). Esse processo pode levar à necrose, alteração observada nos grupos em que foram usadas as maiores doses do EHEFSm, e à vacuolização (presente nos grupos 25, 75 mg/l e 1, 3, 5 g/kg). Essas alterações podem comprometer a capacidade do órgão de absorver nutrientes (CARVALHO et. al, 2017).

As investigações histopatológicas provaram ser uma ferramenta sensível para detectar efeitos diretos de compostos químicos dentro de órgãos-alvo de peixes em experimentos laboratoriais (SCHWAIGER et al., 1996; SOUZA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017). Altinok e Capkin (2007), em estudo experimental, avaliaram o efeito do agrotóxico Endosulfan sobre brânquias, fígado, rins, baço e cérebro de trutas arco-íris. Alterações significantes foram observadas em fígado, rim, baço e brânquias, sendo que em cérebro poucas alterações foram encontradas.

No presente estudo, poucas alterações foram encontradas no cérebro, mas em doses elevadas foi possível observar necrose de neurônios, o que reforça a importância dos testes de toxicidade aguda e nas demais doses foi possível observar dilatação dos vasos sanguíneos, Smith et al., (2007) relatou ter observado vasos

sanguíneos periféricos no cérebro mostraram deformidade consistente, de modo que o fornecimento de sangue e a oxigenação para o cérebro pode ser alterado, embora ainda não tenha sido completamente comprometido. Esses dados são importantes em relação a possibilidade de se danificar o sistema cardiovascular ou alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Pois evidentemente, tais lesões vasculares associadas a um órgão vital como o cérebro aumenta o risco de acidente vascular cerebral e, portanto, mortalidade, ou alterar o comportamento.

Neste estudo, tem que se considerar que as doses que provocaram grandes danos ao nível de histopatologia, foram doses acima do limite de segurança para um fármaco (TREVO et. al., 2013), pois fármacos ou qualquer produto que administrado por qualquer via que produza uma DL_{50} acima de 2g/kg, esse fármaco é considerado altamente seguro (MULLER; MILTON, 2012). Assim sendo, nessas condições experimentais deste estudo, a administração do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) por via oral, produziu uma DL_{50} em 48 horas de 4,515 g/kg (Figura 3), podendo ser considerado toxicologicamente atóxico.

5.CONCLUSÃO

Considerando os dados experimentais obtidos neste estudo, no modelo de toxicidade aguda de 48 horas por imersão e por via oral em *Danio rerio* (zebrafish), pode-se afirmar que os resultados obtidos foram importantes para pesquisas envolvendo esse modelo animal, pois pode ser utilizado a via oral (via mais utilizada em humanos) o tornando um modelo ainda mais interessante na tentativa de descobrir novos fármacos. Além disso, essa via permite que se faça uso de doses maiores, já que o primeiro órgão a entrar em contato com a substância é o intestino e não as brânquias do animal, evitando assim a morte por obstrução branquial e não pela toxicidade sistêmica do composto investigado.

Por via oral, o emprego das doses ainda na faixa de segurança, provocou danos visíveis nas análises histopatológicas, entretanto, os órgãos permaneceram fisiologicamente viáveis, entretanto, com as doses acima do limite de segurança toxicológica, houve grande comprometimento comportamental e, ao nível histopatológico. Assim sendo, considerando o modelo animal utilizado, pode-se considerar o EHEFSm por via oral, toxicologicamente atóxico.

REFERÊNCIAS

- ALBINATI, A. C. L.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, J. V.; LIRA, A. D.; SANTOS, G. B.; VIDAL, L. V. O. **Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*).** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009. 61 v., 3 n., 621-627 p.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. **Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach.** Journal of Ethnopharmacology, 2007. 114 v., 325–354 p.
- ALTINOK, I.; CAPKIN, E. **Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of Methiocarb or Endosulfan.** Toxicologic Pathology, 2007. 35 v., 3 n., 405 p.
- DREW, A. K; MYERS, S. P. **Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions.** The Medical Journal of Australia, 1997. 166 v., 538-541 p.
- AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; UKPONMWAN, O. E. **Studies on the Anxiolytic Affect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) Extracts.** Afr. J. Trad. CAM, 2005. 2 v., 2 n., 153-165 p.
- AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; UKPONMWAN, O. E. **Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats.** Journal of Ethnopharmacology, 2006. 103 v., 2 n., 166-175 p.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.
- BEHRA, M.; COUSIN, X.; BERTRAND, C.; VONESCH, J. L.; BIELLMANN, D.; CHATONNET, A.; STRAHLE, U. **Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo.** Nat Neurosci, 2002. 5 v., 2 n., 111-118 p.
- BILBERG, K.; HOVGGAARD, M. B.; BESENBACHER, F.; BAATRUP, E. **In Vivo Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Zebrafish (*Danio rerio*).** J of Toxicol, 2012: 293784 p.
- CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. **Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream.** Neotropical Ichthyology, 2007. 5 v., 3 n., 327-336 p.
- CARDOSO, T. P.; MÁRSICO, E. T.; MEDEIROS, R. J.; TORTELLY, R.; SOBREIRO, L. G. **Concentração de mercúrio e análise histopatológica em músculo, rim e cérebro de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) coletados na praia de Itaipu - Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.** Ciência Rural, 2009. 39 v., 2 n., 540-546 p.

CARVALHO, J. C. T.; KEITA, H.; SANTANA, G. R.; SOUSA, 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.** Inflammopharmacology, 2017. 26 v., 1 n., 273-284 p.

CROAT, T. B. **A reconsideration of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae).** Annals of the Missouri Botanical Garden, 1974. 61 v., 2 n., 483-490 p.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L. VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO Jr., R. S. **Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax.** Rev Bras Farmacogn, 2009. 19 v., 403-11 p.

ELUFIOYE, T. O., OBUOTOR, E. M., AGBEDAHUNSI, J. M., ADESANYA, S. A. Anticholinesterase constituents from the leaves of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). Biologics, 2017. 11 v., 107-114 p.

FERRAZ DE LIMA, C. L. B.; REIS, N. S.; CECCARELLI, P. S. **Estudo topográfico e histológico do rim de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) holmberg 1887 (Teleostei, Serrasalminae).** Boletim Técnico CEPTA, 1993. 6 v., 2 n., 41-52 p.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. **Advances in flavonoid research since 1992.** Phytochemistry, 2000. 55 v., 481-504 p.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology** (2nd edn) Florida: Lewis Publishers, USA, 1995.

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; GOMES, G. R.; PITELLI, R. A.; MACHADO, M. R. F. **Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*).** Acta Scientiarum Biological Sciences, 2008. 30 v., 1 n., 77-82 p.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology, normal and pathological features.** New York: Gustav Fischer Verlag, 1982.

HOLDEN, J. A.; LAYFIELD, L. L.; MATTHEWS, J. L. **The Zebrafish: Atlas of Macroscopic and Microscopic Anatomy.** Cambridge University Press, 2012. 58-100 p.

HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills.** Cambridge University, Cambridge, 1982.

IGWE, C. U.; ONWULIRI, V. A.; ONYEZE, G. O. C.; OSUAGWU, C. G. **Spasmogenic activity of ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* Linn on isolated uterine muscle strips of rat: possible hormonal mechanism of action.** Research Journal of agriculture and biological sciences, 2011. 7 v., 228-233 p.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. **Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery**. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2007. 82 v., 1 n., 70-80 p.

KLAASSEN, C. D.; AMDUR, M. A.; DOULL, J. **Casarett and Doull's: toxicology the basic science of poisons**. 5ed. New York: McGraw Hill, 1996.

LAPA, A. J. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Simões CMO. (Ed). Farmacognosia da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999. 181-96 p.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: Simões, C.M.O. (org) Farmacognosia da planta ao medicamento. 2 eds. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000. 181-196 p.

LAPA, A.J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Salvador: Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), 2001.

LAU, F. F.; SHUKIT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. **The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging**. Neurobiology of Aging, 2005. 26S v., S128–S132 p.

LIESCHKE, J. G.; CURRIE, P. D. **“Animal models of human disease: Zebrafish swim into view”**. Nature Reviews-Genetics, 2007. 8 v., 5 n., 353-67 p.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CÍRIO, S. M. **Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático**. Rev Acad Ciênc Agrár Ambient Curitiba, 2010. 8 v., 469-484 p.

MARLIÉRE, L. D. P.; RIBEIRO, A. Q.; BRANDÃO, M. G. L.; KLEIN, C. H.; ACURCIO, F. A. **Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil**. Rev Bras Farmacogn, 2008. 18 v., 754-60 p.

MATHUR, P.; BERBEROGLU, M. A.; GUO, S. **Preference for ethanol in zebrafish following a single exposure**. Behav Brain Res, 2011. 217 v., 1 n., 128-33 p.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. **Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi**. In: MEDRI, M. E. et al. (Ed.). A bacia do Rio Tibagi. Londrina: M. E. Medri, 2002.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. **Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical fish Prochilodus scrofa**. Environ Res Sect, 2002. 88 v., 52–63 p.

MIRON, D. S.; MORAES, B.; BECKER, A. G.; CRESTANI, M.; SPANEVELLO, R.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. **Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae)**. Aquaculture, 2008. 277 v., 192-196 p.

- MULLER, P. Y.; MILTON, M. N. **The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development.** Nature Reviews Drug Discovery, 2012. 11 v., 10 n., 751–61 p.
- OFFIAH, V. N.; ANYANWU, I. I. **Abortifacient Activity of an Aqueous Extract of *Spondias mombin* leaves.** Journal Ethnopharmacology, 1989. 26 v., 317-320 p.
- OLOYE, A. A.; OYEYEMI, M. O.; OLA-DAVIES, O. E.; OLURODE, S. A.; AJAYI, A. R. **Hormonal variation in gravid does after oral treatment with crude ethanol extract of *Spondias mombin*.** Journal of Natural Products, 2013. 6 v., 56-60 p.
- OUEDRAOGO, M.; BAUDOUX, T.; STÉVIGNY, C.; NORTIER, J.; COLET, J. M.; EFFERTH, T.; FAN, Q. U. F.; ZHOG, J.; CHAN, K.; SHAW, D.; PELKONEN, O.; DUEZ, P. **Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms.** J Ethnopharmacol, 2012. 140 v., 3 n., 492-512 p.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. **Fish gills as a monitor of sub lethal and chronic effects of pollution** In: Müller R & Lloyd R. Sub lethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing New Books, 1994. USA, 339-352 p.
- ROBERTS, R. J. **Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease.** In: RIBELIN, W. E.; MIGALI, G. The pathology of fishes. Madison: University of Wisconsin Press, 1975. 399-428 p.
- ROBERTS, R. J.; ELLIS, A. E. **The anatomy and physiology of teleosts.** In: Roberts RJ (ed) Fish pathology, 3rd edn. W. B. Saunders, Philadelphia, 2012. 12–54 p.
- SANTOS, I. V. F.; DUARTE, J. L.; FERNANDES, C. P; KEITA, H.; AMADO, J. R. R.; VELÁZQUEZ-MOYADO, J. A.; NAVARRETE, A.; CARVALHO, J. C. T. **Use of zebrafish (*Danio rerio*) in experimental models for biological assay with natural products.** African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2016. 10 v., 42 n., 883-891 p.
- SCHMITT-SCHILLIG, S.; SCHAFFER, S.; WEBER, C. C.; ECKERT, G. P.; MÜLLER, W. E. **Flavonoids and the aging brain.** Journal of physiology and pharmacology, 2005. 56 v., 23-36 p.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. **The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish.** Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, 1997. 6 v., 75- 86 p.
- SHAHJAHAN, M.; SABITHA, K. E.; JAINU, M.; DEVI, C. S. S. **Effect of *Solanum trilobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats.** Indian J Med Res, 2004. 120 v., 1 n., 194-8 p.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade**. Rev Bras Farmacogn, 2008. 18 v., 618-26 p.

SMITH, C. J.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. **Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects**. Aquatic Toxicology, 2007. 82 v., 94–109 p.

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*)**. Journal of Nanomedicine Research, 2016. 4 v., 4 n., 00093 p.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology-normal and pathological features**. Kodansha Ltd Tóquio, 1984. 69 v, 3 n., 406 p.

TCHAMADEU, M. C.; DZEUFLET, P. D. D.; NANA, P.; KOUAMBOU, N. C. C.; NGUEGUIM, T. F.; ALLARD, J.; BLAES, S. N. R.; ZAPFACK, L.; GIROLAMI, J. P.; TACK, I.; KAMTCHOING, P.; DIMO, T. **Acute and sub-chronic oral toxicity studies of an aqueous stem bark extract of *Pterocarpus soyauxii* Taub (*Papilionaceae*) in rodents**. J Ethnopharmacol, 2011. 133 v., 2 n., 329-35 p.

TREVOR, A. J.; KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; KNUIDERING-HALL, M. "Chapter 2: Pharmacodynamics". **Pharmacology Examination & Board Review** (10th ed.). New York: McGraw-Hill Medical, 2013. 17. ISBN 978-0-07-178923-3.

UCHENDU, C. N.; ISEK, T. **Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (*Anacardiaceae*) in rats**. African Health Sciences, 2008. 8 v., 3 n., 163-167 p.

VALADARES, M. C. **Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL₅₀”**. Revista Eletrônica de Farmácia, 2006. 3 v., 93-8 p.

WILLS, P. J.; ASHA, V. V. **Acute and subacute toxicity studies of *Lygodium flexuosum* extracts in rats**. Asian Pacific J Trop Biom, 2012. 2 v., 1 n., s200-s202 p.

YONKOS, L. T.; KANE, A.; REIMSCHUESSEL, S. **Fathead minnow histology atlas**. Worldwide web outreach and utilization, 2000.

ZATTA, D. T.; PIMENTA, F. C.; TRESVENZOL, L. M. F.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T. F.; CUNHA, L. C.; PUCCI, L. L.; GARROTE, C. F. D.; OLIVEIRA, F. N. M.; PAULA, J. R. **Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da *Jacaranda decurrens***. Latin Am J Pharm, 2009. 28 v., 4 n., 485-9 p.

Tabela 1. Número e porcentagem de animais mortos pelas diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) sobre o *Danio rerio* (zebrafish).

Número e porcentagem de animais mortos nas diferentes concentrações das EHEFSm sobre *D. rerio*

Concentração	0 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	75 mg/L
Nº de mortes	0	0	7	12
Porcentagem	0%	0%	58%	100%

Para determinação da concentração letal média (CL₅₀), os dados foram plotados no gráfico (Figura 1), foram consideradas três concentrações de exposição (25, 50 e 75 mg/L). Desse modo, a CL₅₀ foi estimada em 49,86 mg/L.

Tabela 2. Número e porcentagem de animais mortos pelas diferentes doses do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) sobre o *Danio rerio* (zebrafish).

Número e porcentagem de animais mortos nas diferentes doses das EHEFSm sobre *D. rerio*

Dose	0	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0
	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg
Nº de mortes	0	0	3	7	10	12
Porcentagem	0%	0%	25%	58%	83%	100 %

Para determinação da dose letal média (DL₅₀), os dados foram plotados no gráfico (Figura 2), foram consideradas cinco doses de exposição (1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 g/kg). Desse modo, a DL₅₀ foi estimada em 4,515 g/kg.

Tabela 3. Alterações histopatológicas consideradas na análise das branquiais de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm).

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	ESTÁGIO
Hipertrofia das células epiteliais	I
Adelgamento epitelial	I
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I
Ruptura epitelial	II
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I
Hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias	I
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	I
Fusão completa de todas as lamelas secundárias	II
Degeneração celular	II
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células mucosas	I
Presença de células mucosas nas lamelas secundárias	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células cloreto	I
Presença de células cloreto nas lamelas secundárias	I
Dilatação dos capilares	I
Desarranjo dos capilares	I
Congestão vascular	I
Hemorragia causada por ruptura de capilares	I
Aneurisma lamelar	II
Fibrose	III
Necrose	III
Presença de parasitas	I

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

Tabela 4. Alterações histopatológicas consideradas na análise dos fígados de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm).

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

O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado Souza et al., (2016).

Tabela 5. Alterações histopatológicas consideradas na análise dos rins de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm).

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

O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Takashima e Hibiya (1995).

Tabela 6. Alterações histopatológicas consideradas na análise do intestino de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm).

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	ESTÁGIO
Dilatação dos vasos presentes nas vilosidades	I
Desprendimento do revestimento epitelial do ápice das vilosidades intestinais	I
Hipertrofia das células epiteliais	I
Hiperplasia das células caliciformes	I
Degeneração celular	I
Atrofia das vilosidades	I
Degeneração da camada muscular	I
Destruição da mucosa intestinal	II
Fusão parcial ou completa das vilosidades	II
Degeneração vilosa	II
Estroma com infiltrado linfoplasmocitário	I
Redução na espessura da lâmina própria	I
Encurtamento da lâmina própria	I
Destacamento da lâmina própria	II
Hemorragia na lâmina própria	II
Vacuolização dos enterócitos	I
Infiltração leucocitária	I
Edema	I
Necrose	III
Presença de parasitas	I

O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna. Baseado em Carvalho et al., (2017).

Tabela 7. Alterações histopatológicas consideradas na análise do cérebro de *D. rerio* expostos às diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm).

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS	ESTÁGIO
dilatação dos vasos	I
cromatólise central	II
astrócitos gemistocíticos	II
células granulo-adiposas	II
atrofia neuronal	II
necrose do neurônio	III

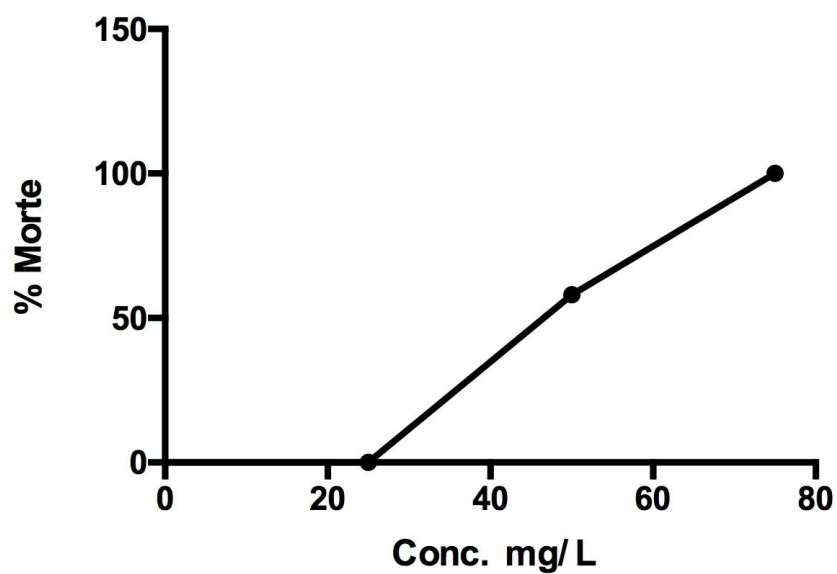


Figura 1. Efeito da administração das diferentes concentrações do EHEFSm (25, 50 e 75 mg/L) sobre *Danio rerio* (zebrafish), n= 12/grupo, CL₅₀= 49,86 mg/L.

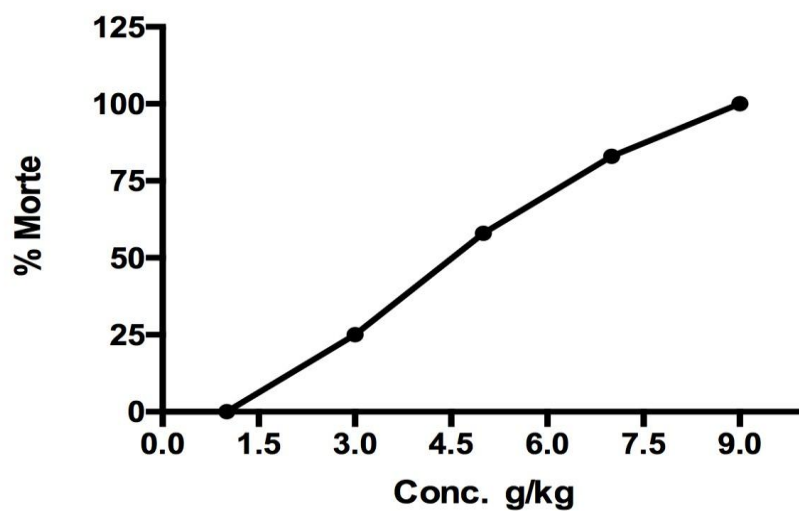


Figura 2. Efeito da administração das diferentes doses do EHEFSm (1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 g/kg) sobre *Danio rerio* (zebrafish), n= 12/grupo, DL₅₀= 4,515g/kg.

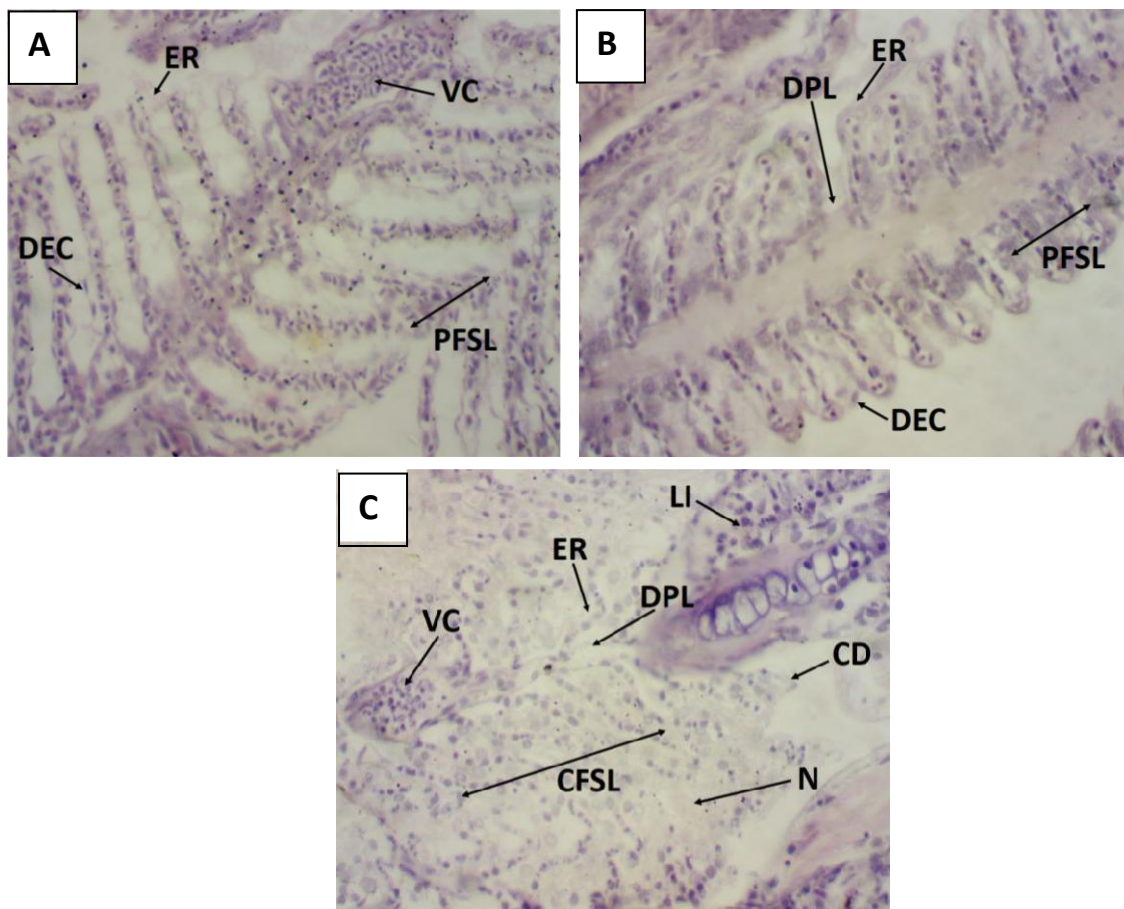


Figura 3. **A:** 25 mg/l, apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; VC: Congestão dos vasos I; PFSL: fusão parcial das lamelas I. **B:** 50 mg/l apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; DPL: distanciamento da lamela primária II; PFSL: fusão parcial das lamelas I. **C:** 75 mg/l ER: ruptura epitelial II; DPL: distanciamento da lamela primária II; CFSL: fusão completa das lamelas II; VC: congestão nos vasos I; LI: infiltração de leucócitos I; CD: degeneração celular II; N: Necrose: III.

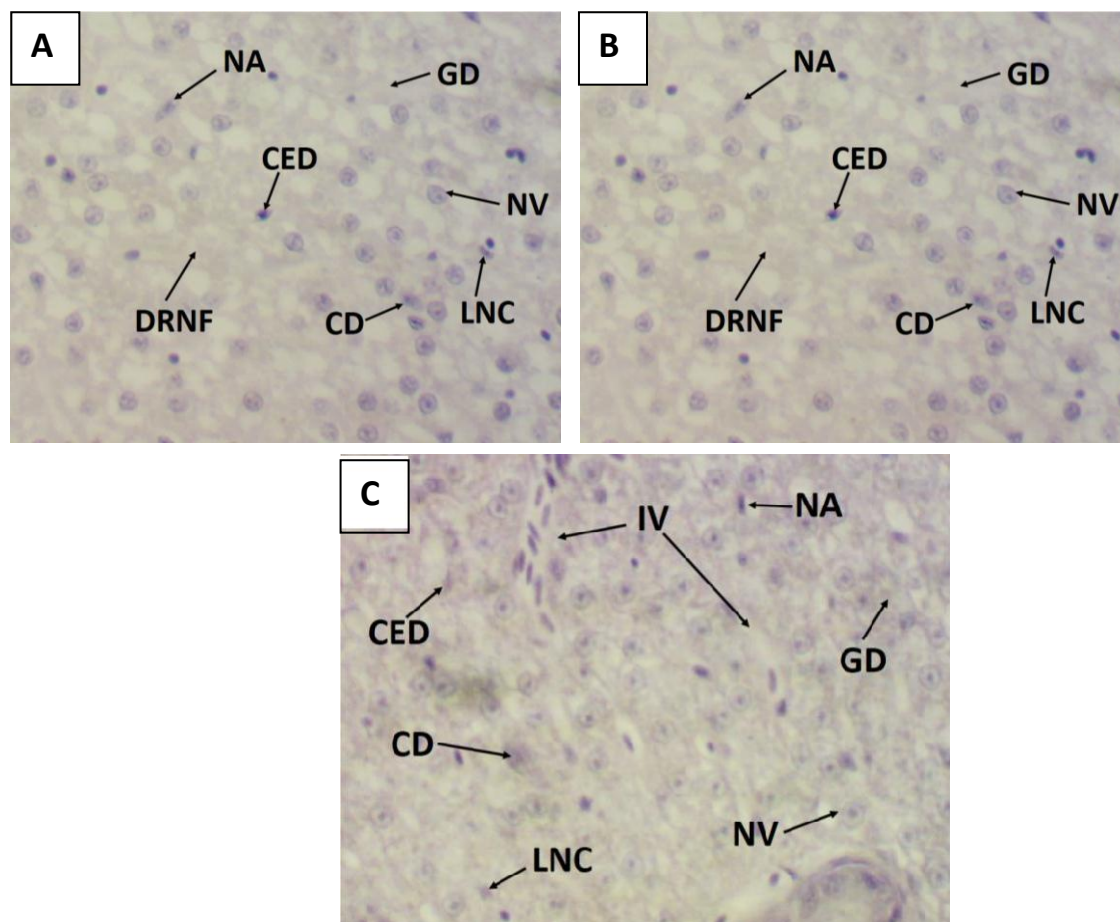


Figura 4. **A:** 25mg/l apresentando CED: degeneração celular II; NV: vacuolização nuclear II; NA: atrofia nuclear II; IVV: aumento do volume dos vasos I; CV: vacuolização citoplasmática I. **B:** 50mg/l apresentando CED: degeneração celular II; NV: vacuolização nuclear II; NA: atrofia nuclear II; LNC: perda do contorno nuclear I; CD: degeneração citoplasmática II; DRNF: diminuição da frequência relativa de núcleos I; GD: diminuição de glicogênio I. **C:** 75mg/l apresentação CED: degeneração celular II; NV: vacuolização nuclear II; NA: atrofia nuclear; LNC: perda do contorno nuclear I; IV: aumento da frequência de vasos I; GD: diminuição de glicogênio I; CD: degeneração citoplasmática II.

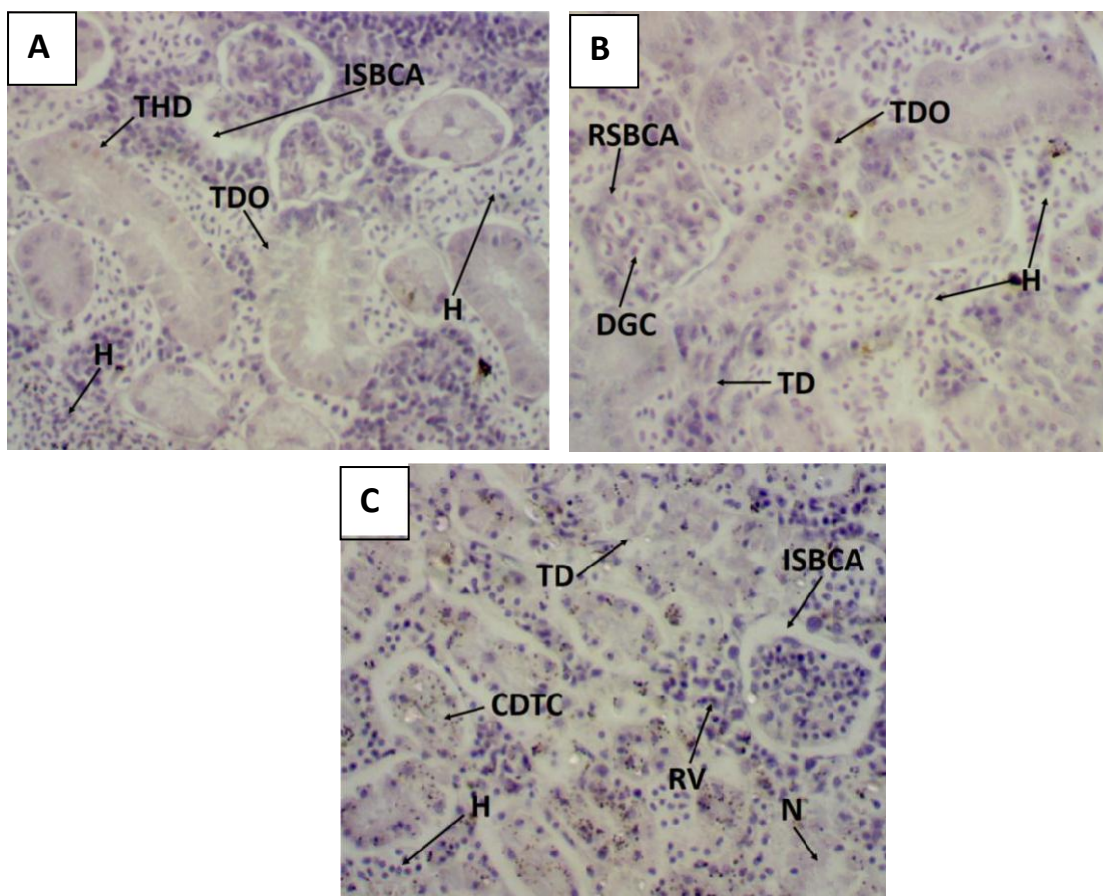


Figura 5. A: 25mg/l apresentando THD: degeneração hialina tubular I; TDO: desorganização tubular I; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I. **B:** 50mg/l apresentando TD: degeneração hialina tubular II; TDO: desorganização tubular I; H: hiperemia II; RSBGA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; DGC: dilatação dos capilares glomerulares I. **C:** 75mg/l apresentando TD: degeneração hialina tubular II; TDO: desorganização tubular I; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; N: necrose III.

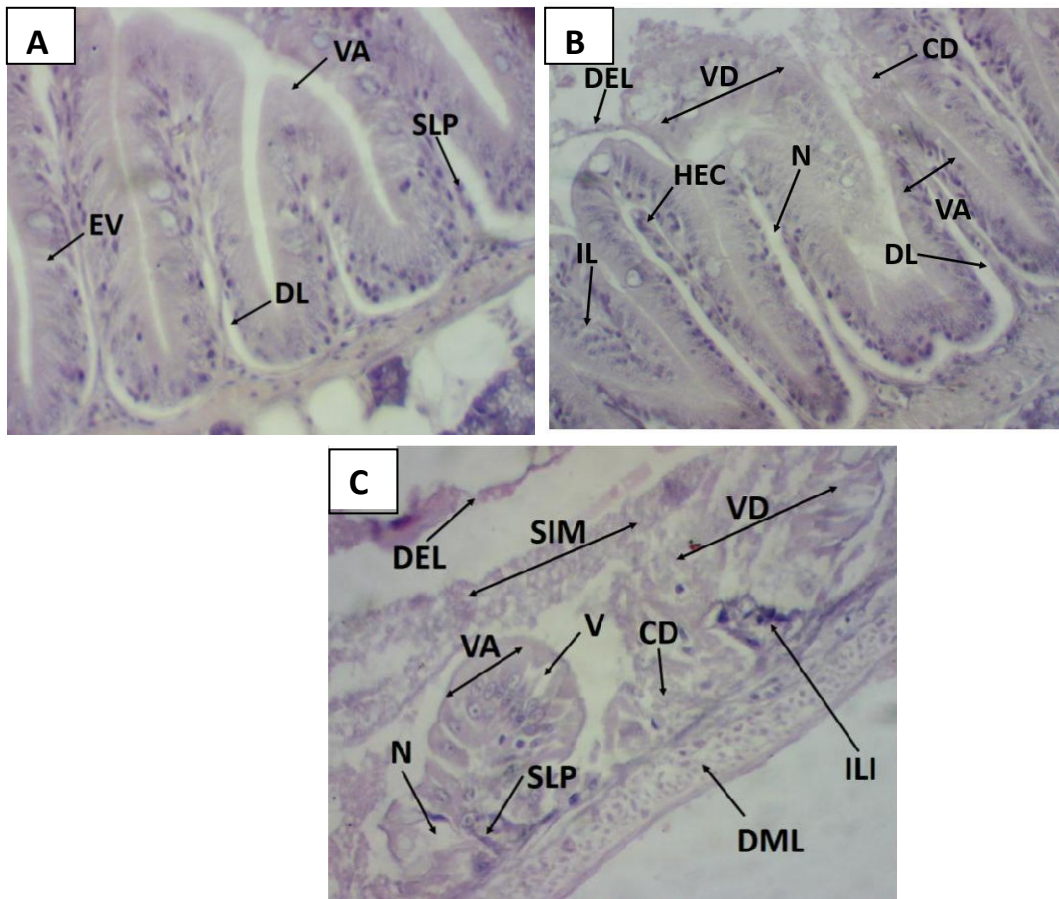


Figura 6. **A:** 25mg/l apresentando VA: atrofia dos vilos I; EV: vacuolização dos enterócitos I; DL: distanciamento da lâmina própria II; SLP: encurtamento da lâmina própria I. **B** 50mg/l apresentando VA: atrofia dos vilos I; DEL - Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal I; DL: distanciamento da lâmina própria II; ILI: infiltração de leucócitos I; HEC: hipertrofia das células epiteliais I; VD: degeneração do vilo II; N: necrose III; CD: degeneração das células I. **C:** 75mg/l apresentando VA: atrofia dos vilos I; DEL - Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilo intestinal I; ILI: infiltração de leucócitos I; VD: degeneração do vilo II; N: necrose III; CD: degeneração das células I; SLP: encurtamento da lâmina própria I; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; V: vacuolização dos enterócitos I.

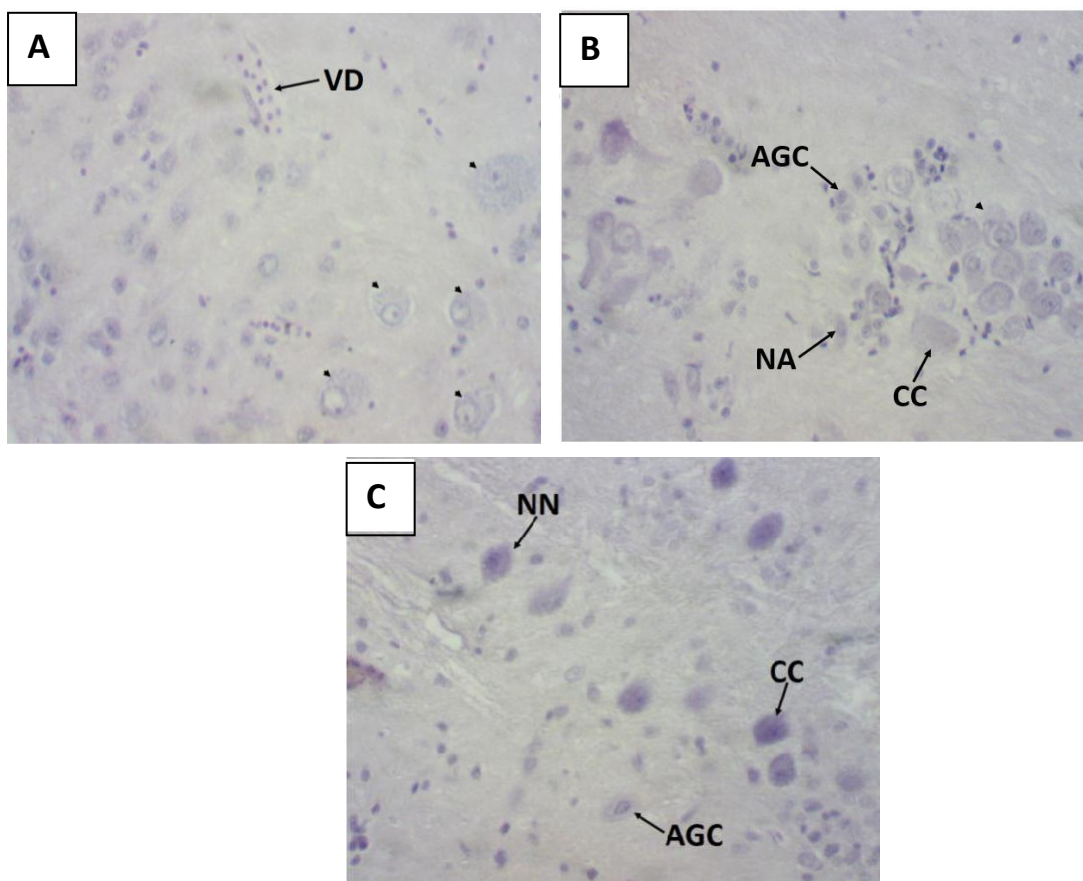


Figura 7. **A:** 25mg/l apresentando VD: dilatação dos vasos I; Cabeças de setas indicam neurônios normais. **B:** 50mg/l apresentando AN: neurônio atrofiado II; CC: cromatólise central (quando o neurônio sofre lesão de seu axônio e pode apresentar dissolução dos corpúsculos de Nissl e deslocamento do núcleo para a periferia) II; AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; **C:** 75mg/l apresentando CC: cromatólise central (quando o neurônio sofre lesão de seu axônio e pode apresentar dissolução dos corpúsculos de Nissl e deslocamento do núcleo para a periferia) II; AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III.

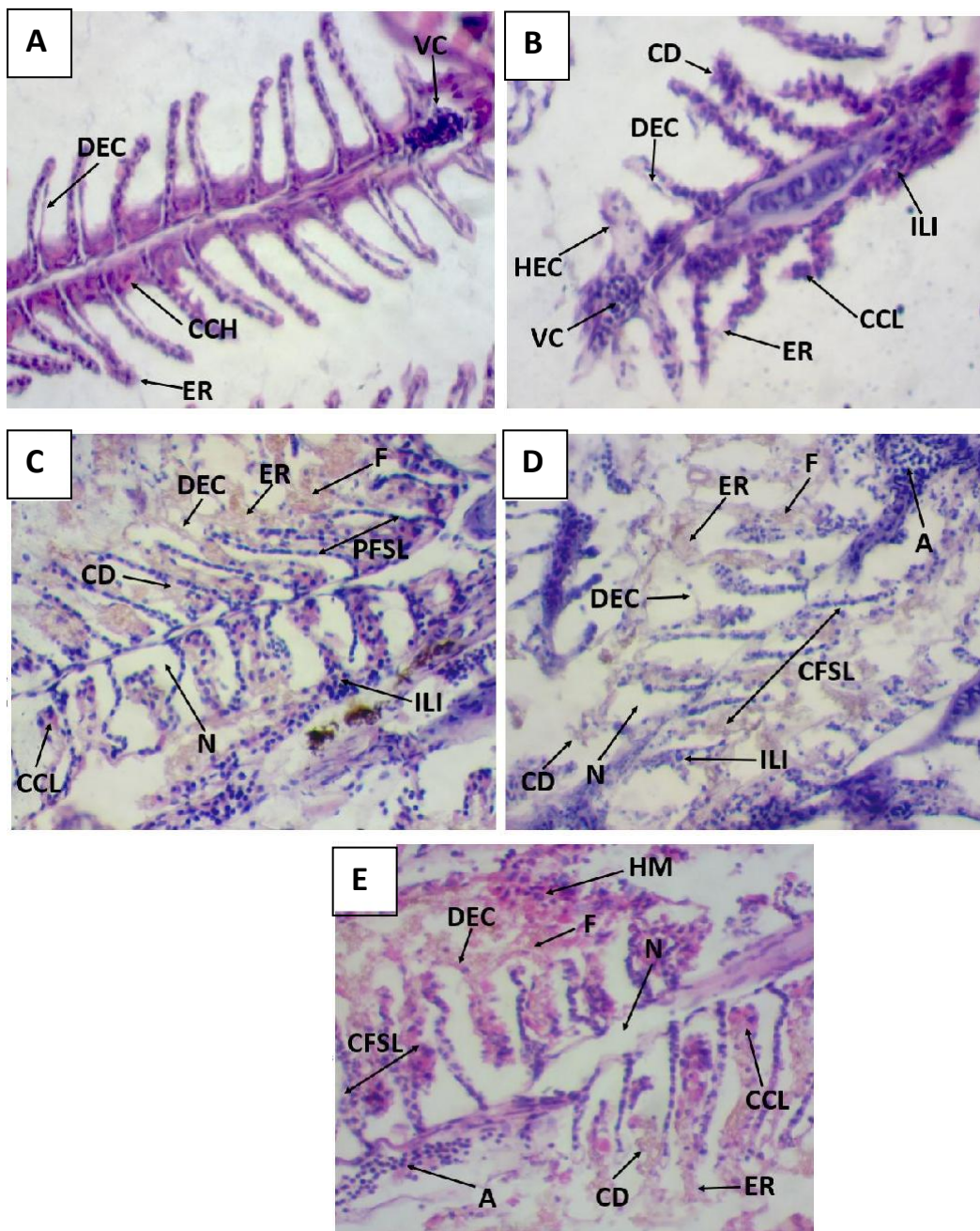


Figura 8. **A:** 1g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; VC: Congestão dos vasos I; CCH: hiperplasia das células de cloreto I. **B:** 3g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; VC: Congestão dos vasos I; CCL: presença das células de cloreto na lamela I; ILI: infiltração de leucócitos I; HEC: Hiperplasia das células epiteliais I; CD: degeneração celular II. **C:** 5g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; CCL: presença das células de cloreto na lamela I; ILI: infiltração de leucócitos I; CD: degeneração celular II; PFSL fusão parcial das lamelas I; N necrose III; Fibrose III. **D:** 7g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; ILI: infiltração de leucócitos I; CD: degeneração celular II; CSFL: fusão completa das lamelas I; Necrose III; Aneurisma II; Fibrose III. **E:** 9g/kg apresentando ER: ruptura epitelial II; DEC: afastamento das células epiteliais I; HM: hemorragia II; A: aneurisma II; CCL: presença das células de cloreto na lamela I; CSFL: fusão completa das lamelas I; CD: degeneração celular II; N necrose III; Fibrose III.

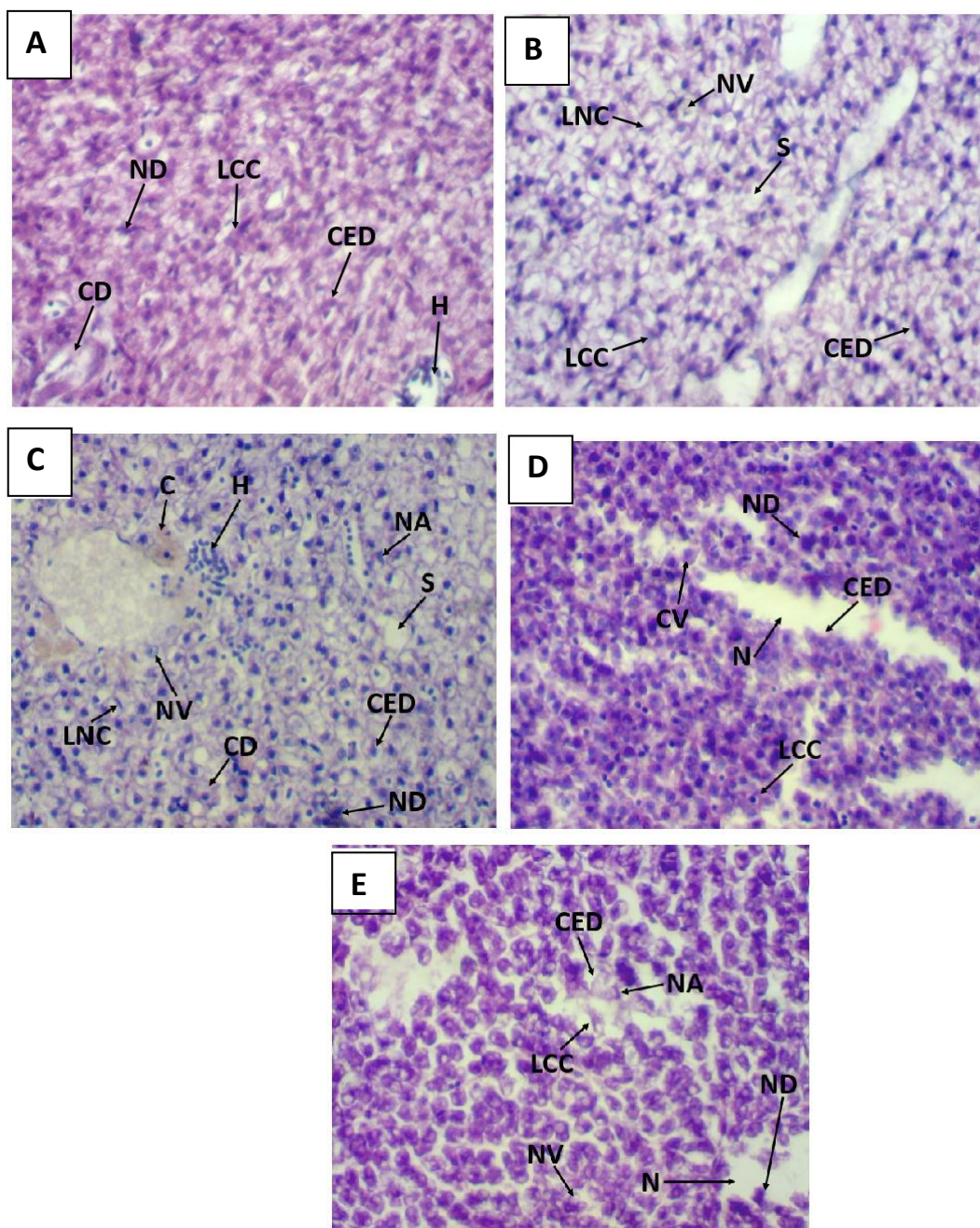


Figura 9. **A:** 1g/kg apresentando LCC: perda do contorno celular I; ND: degeneração nuclear II; CD: degeneração citoplasmática II; CED: ruptura celular II; H: Hiperemia II; **B:** 3g/kg apresentando LCC: perda do contorno celular I; LNC: perda do contorno nuclear I; CED: ruptura celular II; NV: vacuolização nuclear II; S: esteatose II. **C:** 5g/kg apresentando ND: degeneração nuclear II; CD: degeneração citoplasmática II; CED: ruptura celular II; H: hiperemia II; C: colestase II; S: esteatose II; NA: atrofia nuclear II; LNC: perda do contorno nuclear I; NV: vacuolização nuclear II. **D:** 7g/kg apresentando LCC: perda do contorno celular I; ND: degeneração nuclear II; N: necrose III; CV: vacuolização citoplasmática I; CED: ruptura celular II. **E:** 9g/kg apresentando LCC: perda do contorno celular I; ND: degeneração nuclear II; N: necrose III; NA: atrofia nuclear II; CED: ruptura celular II; NV: vacuolização nuclear II.

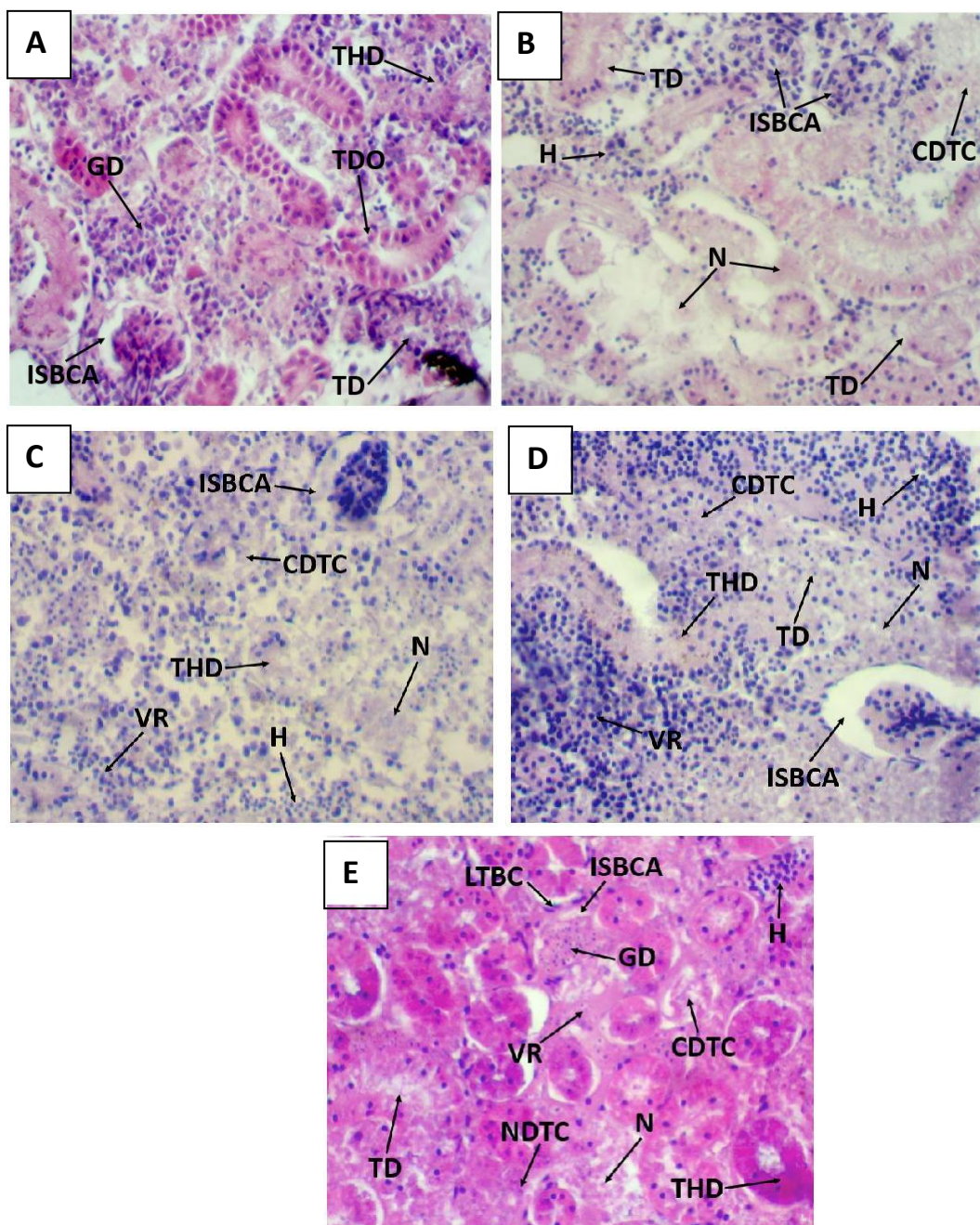


Figura 10. **A:** 1g/kg apresentando TD: degeneração hialina tubular II; TDO: desorganização tubular I; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; GD: degeneração glomerular II. **B:** 3g/kg apresentando TD: degeneração hialina tubular II; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; N: necrose III; **C:** 5g/kg apresentando TD: degeneração hialina tubular II; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; N: necrose III; VR: ruptura de vasos II. **D:** 7g/kg apresentando TD: degeneração tubular II; THD: degeneração hialina tubular I; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; N: necrose III; VR: ruptura de vasos II; **E:** 9g/kg apresentando TD: degeneração tubular II; THD: degeneração hialina tubular I; H: hiperemia II; ISBCA: aumento do espaço da cápsula de Bowman I; CDTC: degeneração citoplasmática das células tubulares II; NDTC: degeneração nuclear das células tubulares II; N: necrose III; VR: ruptura de vasos II; GD: degeneração glomerular II; LTBC: tecido linfóide na cápsula de Bowman II.

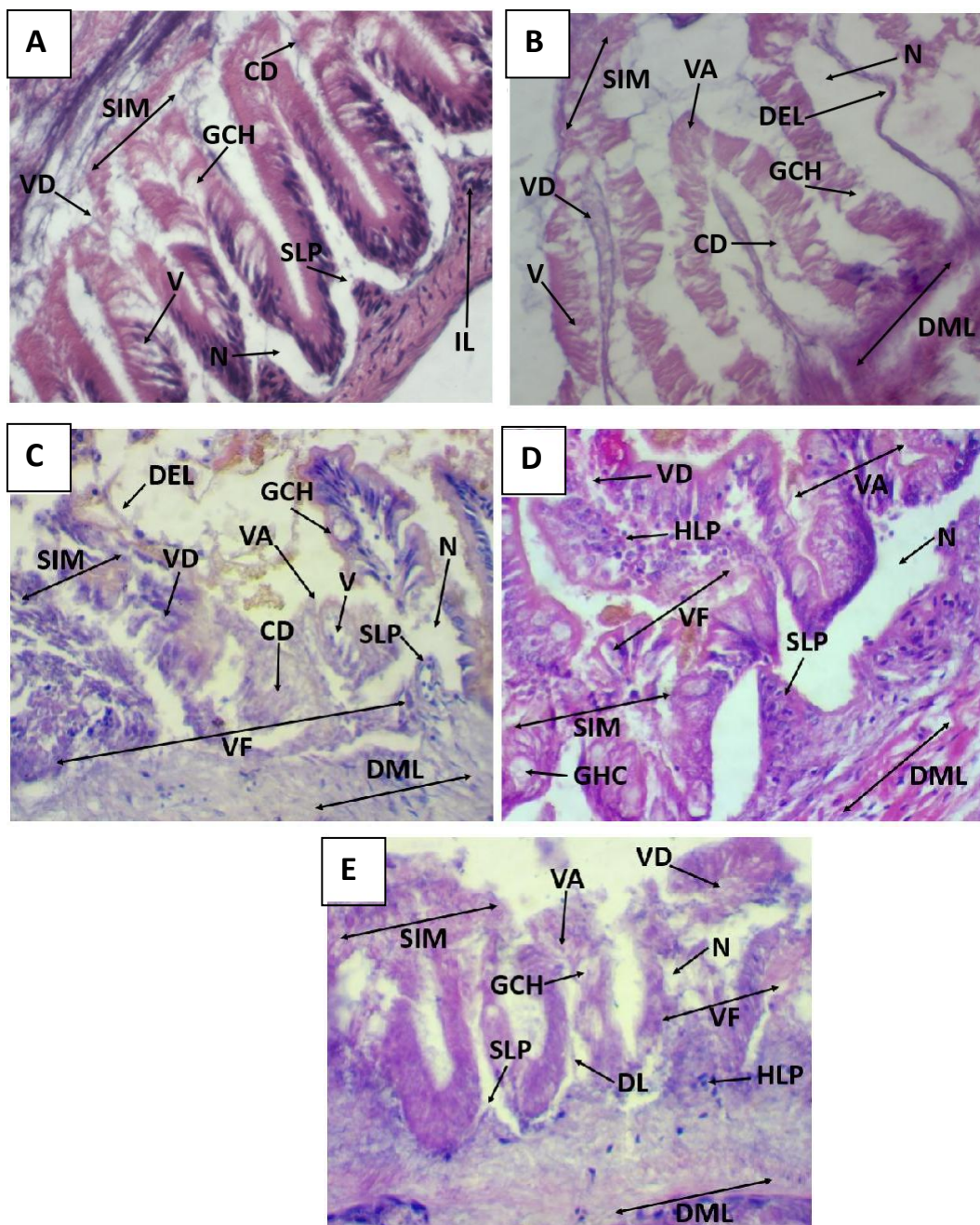


Figura 11. **A:** 1g/kg apresentando ILI: infiltração de leucócitos I; VD: degeneração do vilão II; N: necrose III; CD: degeneração das células I; SLP: encurtamento da lâmina própria I; SIM: destruição da mucosa intestinal II; V: vacuolização dos enterócitos I; GCH: hiperplasia das células caliciformes I. **B:** 3g/kg apresentando VA: atrofia dos vilos I; DEL - Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilão intestinal I; VD: degeneração do vilão II; N: necrose III; CD: degeneração das células I; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; V: vacuolização dos enterócitos I; GCH: hiperplasia das células caliciformes I. **C:** 5g/kg apresentando VA: atrofia dos vilos I; DEL - Distanciamento do revestimento epitelial do ápice do vilão intestinal I; VD: degeneração do vilão II; N: necrose III; CD: degeneração das células I; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; V: vacuolização dos enterócitos I; GCH: hiperplasia das células caliciformes I; SLP: encurtamento da lâmina própria I; VF: fusão dos vilos II. **D:** 7g/kg apresentando VA: atrofia dos vilos I; VD: degeneração do vilão II; N: necrose III; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; GCH: hiperplasia das células caliciformes I; SLP: encurtamento da lâmina própria I; VF: fusão dos vilos II; HLP: hemorragia na lâmina própria II. **E:** 9g/kg apresentando VA: atrofia dos vilos I; VD: degeneração do vilão II; N: necrose III; SIM: destruição da mucosa intestinal II; DML: degeneração da camada muscular I; GCH: hiperplasia das células caliciformes I; SLP

encurtamento da lâmina própria I; VF: fusão dos vilos II; HLP: hemorragia na lâmina própria II; DL: distanciamento da lâmina própria II.

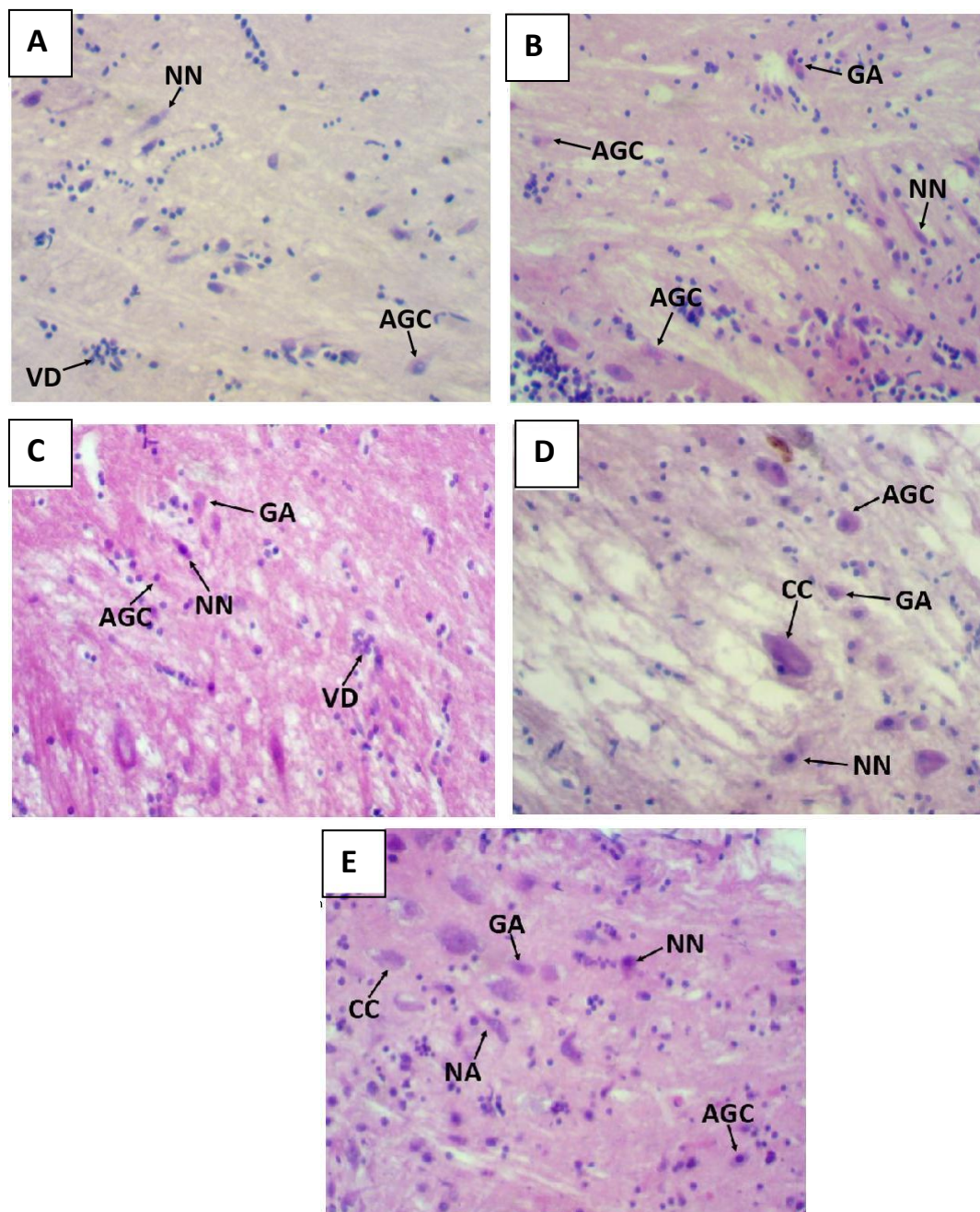


Figura 12. **A:** 1g/kg apresentando AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III; VD: dilatação dos vasos I. **B:** 3g/kg apresentando AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III; GA: astrócitos gemistocíticos II. **C:** 5g/kg apresentando AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III; GA: astrócitos gemistocíticos II; VD: dilatação dos vasos I. **D:** 7g/kg apresentando CC: cromatólise central (quando o neurônio sofre lesão de seu axônio e pode apresentar dissolução dos corpúsculos de Nissl e deslocamento do núcleo para a periferia) II; AGC: células grânulo-adiposas (em alterações do tecido nervoso a micróglia perde as ramificações e torna-se macrófago com capacidade fagocitária) II; NN: necrose do neurônio III; GA:

astrócitos gemistocíticos II. **E:** 9g/kg apresentando CC: cromatólise central (quando o neurônio sofre lesão de seu axônio e pode apresentar dissolução dos corpúsculos de Nissl e deslocamento do núcleo para a periferia) II; GA astrócitos gemistocíticos II; AGC: células granulo-adiposas II; NN: necrose do neurônio III; NA: atrofia neuronal II.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O uso de plantas medicinais faz parte da prática da medicina popular, constituindo um conjunto de saberes internalizados nos diversos usuários, especialmente pela tradição oral. O uso de plantas medicinais é uma terapia alternativa no tratamento de diversas doenças. A OMS afirma que 85% das pessoas do mundo utilizam plantas medicinais para tratar da saúde, 80% das pessoas dos países em desenvolvimento dependem da medicina tradicional e/ou complementar para suas necessidades básicas de saúde, e que cerca de 85% da medicina tradicional envolvem o uso de extratos de plantas. Acredita-se, ainda, que aproximadamente 60% da população mundial recorrem quase exclusivamente às plantas medicinais como recurso terapêutico.

Dados da OMS informam também que a ansiedade e a depressão são problemas de saúde pública que afetam e prejudicam a vida de milhões de pessoas e muitas dessas, buscam por tratamento com plantas. Entre as plantas medicinais utilizadas pela população para o tratamento de transtornos psiquiátricos se encontra *Spondias mombin*, que apesar de seus antecedentes etnomédicos ainda possui poucas pesquisas que avaliem sua segurança para uso terapêutico e toxicidade.

Este estudo concluiu que em relação as atividades ansiolítica e antidepressiva, os resultados do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* (EHEFSm) foram semelhantes à de medicamentos de efeito terapêutico conhecidos. Os resultados mostraram que as doses utilizadas nos testes de ansiedade e depressão não eram tóxicas, não apresentando alterações histopatológicas.

Dessa forma destaca-se a extrema importância que esses estudos continuem sendo realizados, para que seja possível a descoberta de novos fármacos que possam ser aplicados para o tratamento de ansiedade e depressão, pois é comprovado que os ansiolíticos e antidepressivos sintéticos comercializados atualmente podem causar efeitos colaterais e até dependência.

Há grande necessidade de se ter um conhecimento atualizado sobre a segurança da utilização de plantas e seus efeitos para que se torne uma terapia segura disponível. Tornando-se uma ferramenta útil para melhorar a qualidade de vida da população cujas ações devem ser estabelecidas na conquista desta meta.

- ABO, K. A.; OGUNLEYE, V. O.; ASHIDI, J. S. **Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea***. *Phytotherapy Research*, 1999. 13 v., 494-497 p.
- ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. **Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: studies *in vitro* and *in vivo***. *Tropical Animal Health and Production*, 2005. 37 v., 223-235 p.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2007. 17 v., 114-140 p.
- AGUILAR-ORTIGOZA, C. J.; SOSA, V. **The evolution of toxic phenolic compounds in a group of Anacardiaceae genera**. *Taxon*, 2004. 53 v., 2 n., 357-364 p.
- AIRY SHAW, H. K.; FORMAN, L. L. **The genus *Spondias* L. (Anacardiaceae) in tropical Asia**. *Kew Bulletin*, London, UK, 1967. 21 v., 1 n., 1-20 p.
- AJAO, A. O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. **Antibacterial Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Spondias mombin*, and *Alchornea cordifolia* - Two Local Antimicrobial Remedies**. *Pharmaceutical Biology*, 1995. 23 v., 2 n., 67-72 p.
- AJAO, A. O.; SHONUKAN, O.; FEMI-ONADEKO, B. **Antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts of *S. mobin* and *Alchornea cordifolia***. *Fitoterapia*, Nigeria, 1984. 55 v., 6 n., 337-339 p.
- AKINMOLADUN, A. C.; OBUOTOR, E. M.; FAROMBI, E. O. **Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some Nigerian indigenous medicinal plants**. *Journal of Medicinal Food*, 2010. 13 v., 444-451 p.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS, E. M. F. N.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. **Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach**. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007. 144 v., 325-354 p.
- ALMEIDA, C. F.; RAMOS, M. A.; AMORIM, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. **A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil**. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010. 127 v., 674-84 p.
- ALVES, R. E.; FILGUIERAS, H. A. C.; MOURA, C. F. H. (Org.). **Caracterização de frutas nativas da América Latina**. Jaboticabal: UNESP/SBF, 2000.

AMALI, A. A.; REKHA, R. D.; LIN, C. J. F.; WANG, W. L.; GONG, H. Y.; HER, G. M.; WU, J. L. **Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis**. Journal of biomedical science, 2006. 13 v., 2 n., 225-232 p.

AMATRUDA, J. F.; SHEPARD, J. L.; STERN, H. M.; ZON, L. I. **Zebrafish as a cancer model system**. Cancer cell, 2002. 1 v., 3 n., 229-231 p.

ANDRADE, L. H. S. G.; GORENSTEIN, C. **Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade**. Revista Psiquiatria Clínica, 1998. 25 v., 6 n., 285-290 p.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE R. O.; IWALEWA E. O.; AKANMU M. A.; UKPONMWAN O. E. **Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats**. Journal of Ethnopharmacology, 2006. 103 v., 2 n., 166 – 175 p.

AYOKA, A. O.; AKOMOLAFE, R. O.; IWALEWA, E. O.; UKPONMWAN, O. E. **Studies on the anxiolytic effect of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) extracts**. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2005. 2 v., 153-165 p.

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

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

BALLS, M. **Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing**. Lab. Animals, 1994. 28 v., 193-211 p.

BALLS, M.; VAN ZELLER, A. M.; HALDER, M. **Three Rs Declaration of Bologna. eds. Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation**. Amsterdam: Elsevier, 2000. 15 p.

BANSODE, R. R.; LEUNG, T.; RANDOLPH, P.; WILLIAMS, L. L.; AHMEDNA, M. **Cinnamon extract inhibits angiogenesis in zebrafish and human endothelial cells by suppressing VEGFR1, VEGFR2, and PKC-mediated MAP kinase**. Food Science & Nutrition, 2013. 1 v., 1 n., 74–82 p.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. **Avaliação da toxicidade**. In: Oga, S; Camargo, M.M.A; Batistuzzo, L.A. Fundamentos da toxicologia. São Paulo, 2008. Ateneu, 59-70 p.

BEHRA, M.; COUSIN, X.; BERTRAND, C.; VONESCH, J. L.; BIELLMANN, D.; CHATONNET, A.; STRÄHLE, U. **Acetylcholinesterase is required for neuronal**

and muscular development in the zebrafish embryo. Nature Neuroscience, 2002. 5 v., 111-118 p.

BENNEH, C. K.; BINEY, R. P.; MANTE, P. K.; TANDOH, A.; ADONGO, D. W.; WOODE, E. **Maerua angolensis stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish-Involvement of GABAergic and 5-HT systems.** Journal of Ethnopharmacology, 2017. 207 v., 129–145 p.

BERNARDI, M. M.; DIAS, S. G.; BARBOSA, V. E. **Neurotoxicity of neem commercial formulation (*Azadirachta indica* A. Juss) in adult zebrafish (*Danio rerio*).** Environmental toxicology and pharmacology, 2013. 36 v., 3 n., 1276- 1282 p.

BERNTSEN, M. H. G.; AATLAND, A.; HANDY, R. D. **Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr.** Aquatic Toxicology, 2003. 65 v., 55-72 p.

BERTOLETTI, E. **Ensaios biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição.** São Paulo: Cetesb, 1990.

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

BLUMENTHAL, J. A.; BABYAK, M. A.; DORAISWAMY, P. M.; WATKINS, L.; HOFFMAN, B. M.; BARBOUR, K. A.; HERMAN, S.; CRAIGHEAD, W. E.; BROSSE, A. L.; WAUGH, R.; HINDERLITER, A.; SHERWOOD, A. **Exercise and pharmacotherapy in the treatment of major depressive disorder.** Psychosom Med, 2007. 69 v., 7 n., 587-596 p.

BOEHMLER, W.; OBRECHT-PFLUMIO, S.; CANFIELD, V.; THISSE, C.; THISSE, B.; LEVENSON, R. **Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish.** Developmental Dynamics, 2004. 230 v., 3 n., 481-493 p.

BORLONGAN, I.G. **Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*.** Aquaculture, 1990. 89 v., 315-325 p.

BOSCO, J.; SOARES, K. T.; AGUIAR FILHO, S. P.; BARROS, R. V. **A cultura da cajazeira.** João Pessoa: EMEPA, 2000. 29 p.

BRAGA, J. E. F.; PORDEUS, L. C.; SILVA, A. T. M. C.; PIMENTA, F. C. F.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. **Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde, 2010. 14 v., 2 n., 93-100 p.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** 4. ed. Fortaleza: Ed. Universitária, UFRN, 1960. 540 p.

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

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

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

BUNNEY, W. E.; DAVIS, J. M. **Norepinephrine in depressive reactions. A review.** Archives of General Psychiatry, 1965. 13 v., 6 n., 483-494 p.

CABRAL, B.; SIQUEIRA, E. M. S.; BITENCOURT, M. A. O.; LIMA, M. C. J. S.; LIMA, A. K.; ORTMANN, C. F.; CHAVES, V. C.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; ROCHA, H. A. O.; SCORTECCI, K. C.; REGINATTO, F. H.; GIORDANI, R. B.; ZUCOLOTO, S. M. **Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves.** Revista Brasileira de Farmacognosia, 2016. 26 v., 304-311 p.

CAILLIET, G. M.; LOVE, M. S.; EBELING, A. W. **Fishes: A Field and Laboratory Manual on Their Structure, Identification, and Natural History.** Wadsworth, Publishing Belmont, California, 1986.

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

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

CARPENTER, K. M.; HASIN, D. S.; ALLISON, D. B.; FAITH, M. F. **Relationships Between Obesity and DSM-IV Major Depressive Disorder, Suicide Ideation, and Suicide Attempts: Results From a General Population Study.** American Journal of Public Health, 2000. 90 v., 2 n., 251-257 p.

CARVALHO, J. C. T.; KEITA, H.; SANTANA, G. R.; SOUSA, 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.** Inflammopharmacology, 2017. 26 v., 1 n., 273-284 p.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia.** 3. ed. Belém: INPA, 1976. 166 p.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. **Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2004. 40 v., 3 n., 289-299 p.

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

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. **Metabólitos Secundários de Espécies de Anacardiaceae**. Química Nova, 2006. 29 v., 6 n., 1287-1300 p.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; GEERTS, S.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. **Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin***. Planta Med, 1994. 60 v., 5 n., 460-463 p.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L.; CLAEYS, M.; GEERTS, S.; VANDEN-BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. **Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin***. Phytochemistry, 1991. 30 v., 4 n., 1129-30 p.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN-BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. **Antiviral caffeoyl: esters from *Spondias mombin***. Phytochemistry, 1992. 31 v., 79-81 p.

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

CRAWFORD, A. D.; LIEKENS, S.; KAMUHABWA, A. R.; MAES, J.; MUNCK, S.; BUSSON, R.; ROZENSKI, J.; ESGUERRA, C. V.; WITTE, P. A. M. **Zebrafish Bioassay-Guided Natural Product Discovery: Isolation of Angiogenesis Inhibitors from East African Medicinal Plants**. PLoS One, 2011. 6 v., 2 n., e14694 p.

DARLAND, T.; DOWLING, J.E. **Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. 98 v., 20 n., 11691-11696 p.

DIBY, S. B.; KONÉ, M.; YAPO, A. **Potentiel pharmacologique des écorces de tige de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) sur la motricité in vitro du duodénum de lapin; une plantemédicinale utilisée dans le traitement traditionnel des troubles digestifs**. Phytothérapie, 2012. 10 v., 306-312 p.

DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. **Acute toxicity and eye irritancy**. In: Hayes, A. W. Principles and methods of toxicology. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. 18 v., 853-916 p.

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

DREW, A.; MYERS, S. P. **Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions**. The Medical Journal of Australia, 1997. 166 v., 538-541 p.

DUTTA, S. P. S. **Food and feeding habits of *Danio rerio* (Ham. Buch) inhabiting Gadigarh stream, Jammu.** Journal of Freshwater Biology, 1993. 5 v., 165–168 p.

EDWARDS, J. G.; MICHEL, W. C. **Odor-Stimulated Glutamatergic Neurotransmission in the Zebrafish Olfactory Bulb.** Journal of Comparative Neurology, 2002. 454 v., 3 n., 294–309 p.

EHLERS, C. L.; FRANK, E.; KUPFER, D. J. **Social Zeitgebers and Biological Rhythms: A Unified Approach to Understanding the Etiology of Depression.** Archives of General Psychiatry, 1988. 45 v., 10 n., 948-52 p.

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

FANGE, R.; GROVE, D. **Digestion.** In Hoar WS, Randall DJ, Brett JR. Fish Physiology, 1979. 162-260 p.

FERGUSON, H. W. **Systemic pathology of fish, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts.** Ames: Iowa State University Press, 1989.

FRED-JAIYESIMI, A.; KIO, A.; RICHARD, W. **α -amylase inhibitory effect of 3 β -urs-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf.** Food chemistry, 2009. 116 v., 285-288 p.

FREIFELD, L.; ODSITCIL, I.; FÖRSTER, D.; RAMIREZ, A.; GAGNON, J.A.; RANDLETT, O.; COSTA, E.K.; ASANO, S.; CELIKER, O.T.; GAO, R.; MARTIN-ALARCON, D.A.; REGINATO, P.; DICK, C.; CHEN, L.; SCHOPPIK, D.; ENGERT, F.; BAIER, H.; BOYDEN, E.S. **Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. 114 v., 50 n., E10799-E10808 p.

FREITAS, R. A.; CORREIA, K. D. M.; TAVARES, M. G. O.; OLIVEIRA, G. M. C.; CINTRA, A.; RICIOLE, H.; NUNES, I.; FAGUNDES, J.; ANTONIOSI FILHO, N. R. **Avaliação das brânquias de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de gasolina e diesel.** Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 2013. 23 p.

FURLANETO, L.; MARINS, V. D.; ENDO, R. **Qualidade microbiológica de drogas vegetais comercializadas nas ruas da cidade de Londrina/PR e de seus Infusos.** Saúde Revista, 2003. 5 v., 10 n., 49-52 p.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTHAL, A. **Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 2000. 67 v., 4 n., 773-782 p.

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

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

GISBERT, E.; SARASQUETE, M. C.; WILLIOT, P.; CASTELLO-ORVAY, F. **Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny**. Journal of Fish Biology, 1999. 55 v., 596-616 p.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. 2^a Edição. Atheneu, 2005.

GRAY, J. A. **The Neuropsychology of Anxiety**. In: Pawlik K. (eds), Fortschritte der Experimentalpsychologie. Lehr-und Forschungstexte Psychologie, Springer, Berlin, Heidelberg, 1984. 5 v., 52-71 p.

GRIFFITT, R. J.; LAVELLE, C. M.; KANE, A. S.; DENSLOW, N. D.; BARBER, D. S. **Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish**. Aquatic toxicology, 2013. 130 v., 192-200 p.

GRIFFITT, R. J.; HYNDMAN, K.; DENSLOW, N. D.; BARBER, D. S. **Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles**. Toxicological Sciences, 2009. 107 v., 2 n., 404-415 p.

HALL, C. F.; GIL, A. S. B. **Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Anacardiaceae Flora of the cangas of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Anacardiaceae**. Rodriguésia, 2017. 68 v., 3 n., 911-916 p.

HAMANO, P. S.; MERCADANTE, A. Z. **Composition of Carotenoids from commercial products of caja (*Spondias lutea*)**. Journal of food composition and analysis, 2001. 14 v., 335-343 p.

HAMENOO, N. A. **Hepatoprotective and toxicological assessment of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in rodents**. Department of Pharmacology, Kwame Nkrumah University of Science and Technology, 2010.

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

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

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

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

HELFMAN, G. S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E. **The diversity of fishes**. Maiden, MA: Blackwell Science, 1997.

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

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

HOLDEN, J. A.; LAYFIELD, L. L.; MATTHEWS, J. L. **The Zebrafish: Atlas of Macroscopic and Microscopic Anatomy**. Cambridge University Press, 2012.

HONORATO, C.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D. J.; MACHADO, M. R. F. **Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo silagem de peixe**. Brazilian Journal of Veterinary. Research and Animal Science, 2011. 48 v., 4 n., 281-288 p.

HORN, M. H. **Feeding and Digestion**. In Evans, E.H. The Physiology of Fishes, 1998. 2 ed, 43-64 p.

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

HUANG, S. Y.; FENG, C. W.; HUNG, H. C.; CHAKRABORTY, C.; CHEN, C. H.; CHEN, W. F.; JEAN, Y. H.; WANG, H. M.; SUNG, C. S.; SUN, Y. M.; WU, C. Y.; LIU, W.; HSIAO, C. D.; WEN, Z. H. **A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema**. PLoS One, 2014. 9 v., 8 n., 04414 p.

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

IGWE, C. U.; ONWULIRI, V. A.; ONYEZE, G. O. C.; OSUAGWU, C. G. **Spasmogenic activity of ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* Linn on isolated uterine muscle strips of rat: possible hormonal mechanism of action**. Research Journal of agriculture and biological sciences, 2011. 7 v., 228-233 p.

IKETANI, T.; KIRIIKE, N.; STEIN, M. B.; NAGAO, K.; NAGATA, T.; MINAMIKAWA, N.; SHIDAO, A.; FUKUHARA, H. **Personality disorder comorbidity in panic disorder patients with or without current major depression**. Depression and Anxiety, 2002. 15 v., 176-182 p.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Editora Nacional, 2002. 777 p.

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

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

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

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. **Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders**. Trends Pharmacological Sciences, 2014. 35 v., 2 n., 63-75 p.

KENNEDY, S. H. **Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment**. Dialogues in Clinical Neuroscience, 2008. 10 v., 3 n., 271-277 p.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K. R.; RUSH, A. J.; WALTERS, E. E.; WANG, P. S. **The epidemiology of major**. Journal of the American Medical Association, 2003. 289 v., 23 n., 3095-3105 p.

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

KIKUCHI, Y.; VERKADE, H.; REITER, J. F.; KIM, C. H.; CHITNIS, A. B.; KUROIWA, A.; STAINIER, D. Y. **Notch signaling can regulate endoderm formation in zebrafish**. Developmental Dynamics, 2004. 229 v., 4 n., 756-762 p.

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

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

KUCENAS, S.; LI, Z.; COX, J. A.; EGAN, T. M.; VOIGT, M. M. **Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family**. Neuroscience, 2003. 121 v., 935-945 p.

LAGLER, K. F.; BARDACH, J. E.; MILLER, R. R.; PASSINO, D. R. M. **Ichthyology**. 2ª edição. Ed. John Wiley & Sons Inc, 1977. USA. 95-97 p.

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

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

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

LEVIN, E. D.; CHEN, E. **Nicotinic involvement in memory function in zebrafish.** Neurotoxicology and Teratology, 2004. 26 v., 731-735 p.

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

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

LOMBARDI, J. V. **Fundamentos de toxicologia aquática.** In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. Sanidade de organismos aquáticos, 2004. São Paulo: Varela, 263-272 p.

LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. **Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae).** Revista Brasileira Farmacognosia, 2003. 13 v., 24-27 p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa. Plantarum, 1992. 370 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas.** São Paulo: Nova Odessa, 2008. 544 p.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish.** Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998. 267p.

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

LUCENA, R. F.; MEDEIROS, P. M.; ARAÚJO, E. L.; ALVES, A. G.; ALBUQUERQUE, U. P. **The ecological apparency hypothesis and the importance of useful plants in rural communities from Northeastern Brazil: Na assessment based on use value.** Journal of Environmental Management, 2012. 96 v., 106-15 p.

MACKENZIE, J. W. **Daycase anaesthesia and anxiety A study of anxiety profiles amongst patients attending a day bed unit.** Anaesthesia, 1989. 44 v., 5 n., 437-440 p.

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

MCDONALD, W. M.; RICHARD, I. H.; DELONG, M. R. **Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease.** Biological Psychiatry, 2003. 54 v., 3 n., 363-375 p.

MCGRATH, P.; LI, C. Q. **Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity.** Drug Discov Today, 2008. 13 v., 9-10 n., 394-401 p.

MENKE, A. L.; SPITSBERGEN, J. M.; WOLTERBEEK, A. P. M.; WOUTERSEN, R. A. **Normal anatomy and histology of the adult zebrafish.** Toxicologic Pathology, 2011. 39 v., 5 n., 759-775 p.

MITCHELL, J. D.; DALY, D. C. **The “tortoise’s cajá” – A new species of *Spondias* (Anacardiaceae) from southwestern Amazonia.** Brittonia, 1998. 50 v., 4 n., 447-451 p.

MOCHIZUKI, E.; FUKUTA, K.; TADA, T.; HARADA, T.; WATANABE, N.; MATSUO, S.; HASHIMOTO, H.; OZATO, K.; WAKAMATSU, Y. **Fish mesonephric model of polycystic kidney disease in medaka (*Oryzias latipes*) pc mutant.** Kidney international, 2005. 68 v., 1 n., 23-34 p.

MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; ANDRADE, N. J.; ISMAIL, F. M. D.; BARBOSA, M. C. A. **Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells.** Molecules, 2012. 17 v., 8 n., 9728-9740 p.

MORINA, N.; AJDUKOVIC, D.; BOGIC, M.; FRANCISKOVIC, T.; KUCUKALIC, A.; LECIC-TOSEVSKI, D.; MORINA, L.; POPOVSKI, M.; PRIEBE, S. **Co-Occurrence of Major Depressive Episode and Posttraumatic Stress Disorder Among Survivors of War: How Is It Different From Either Condition Alone?.** J Clin Psychiatry, 2013. 74 v., 3 n., 212-218 p.

MOYLE, P. B.; CECH, J.J. **Fishes: An introduction to ichthyology.** New Jersey: Prentice Hall, 2000. 4 v., 612 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requeriments of Fishes and Shrimp.** Washington: DC. National Academies Press, 2011.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. **Neurobiology of Depression.** Neuron, 2002. 34 v., 13–25 p.

NINKOVIC, J.; BALLY-CUIF, L. **The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse**. *Methods*, 2006. 39 v., 3 n., 262-274 p.

NJOKU, P. C.; AKUMEFULA, M. I. **Phytochemical and Nutrient Evaluation of *Spondias mombin* leaves**. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2007. 6 v., 13-615 p.

NORTH, T. E.; GOESSLING, W.; WALKLEY, C. R.; LINGERKE, C.; KOPANI, K. R.; LORD, A. M.; WEBER, G. J.; BOWMAN, T. V.; JANG, I. H.; GROSSER, T.; FITZGERALD, G. A.; DALEY, G. Q.; ORKIN, S. H.; ZON, L. I. **Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis**. *Nature*, 2007. 447 v., 7147 n., 1007-1011 p.

NORTH, T. E.; BABU, I. R.; VEDDER, L. M.; LORD, A. M.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R.; ZON, L. I.; GOESSLING, W. **PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury**. *PNAS*, 2010. 107 v., 40 n., 17315-17320 p.

NUNES, I.J. **Nutrição animal básica** – 2 ed Belo Horizonte. FEP – MVZ, 1998. 388 p.

NWORU, C. S.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B.; TOUKAM, D. K.; UDEH, J.; ESIMONE, C. O. **The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- α and nitric oxide (NO)**. *Journal of Immunotoxicology*, 2011. 8 v., 10-16 p.

OFFIAH, V. N.; ANYANWU, I. I. **Abortifacient activity of an aqueous extract of *Spondias mombin* leaves**. *Journal of Ethnopharmacology*, 1989. 26 v., 317-320 p.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2003.

OLIVEIRA, C. J.; ARAÚJO, T. L. **Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial**. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, 2007. 9 v., 93-105 p.

OLOYE, A. A.; OYEYEMI, M. O.; OLA-DAVIES, O. E.; OLURODE, S. A.; AJAYI, A. R. **Hormonal variation in gravid does after oral treatment with crude ethanol extract of *Spondias mombin***. *Journal of Natural Products*, 2013. 6 v., 56-60 p.

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

PALOMBO, E. A. **Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. 1-15 p.

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

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

PAULINO, R. C.; HENRIQUES, G. P. S. A.; MOURA, O. N. S.; COELHO, M. F. B.; AZEVEDO, R. A. B. **Medicinal plants at the Sítio do Gois, Apodi, Rio Grande do Norte State, Brazil**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2012. 22 v., 1 n., 29-39 p.

PELL, S. K.; MITCHELL, J. D.; MILLER, A. J.; LOBOVA, T. A. **Anacardiaceae**, In Kubitzki K (ed.) The families and genera of vascular plants. Flowering plants Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales. Springer, 2011. 7-50 p.

PERHARIC, L.; SHAW, D.; MURRAY, V. **Toxic effects of herbal medicines and food supplements**. Lancet, 1993. 342 v., 180-181 p.

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

PETERSON, R. T.; MACRRAE, C. A. 2012. **Systematic approaches to toxicology in the zebrafish**. , 2012. 52 v., 433-53 p.

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

PICKEL, D. B. J. **Flora do Nordeste do Brasil segundo Piso e Marcgrave no século XVII**. Almeida, A.V. (ed.). EDUFRPE, Recife, 2008. 312 p.

PIRANI, J. R. **Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Anacardiaceae**. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, 1987. 9 v., 199-209 p.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. **Árvores de Manaus**. Manaus: INPA, 1975. 312 p.

PRECHTL, J. C.; EMDE, G.; WOLFART, J.; KARAMÜRSEL, S.; AKOEV, G. N.; ANDRIANOV, Y. N.; BULLOCK, T. H. **Sensory processing in the pallium of a mormyrid fish**. The Journal of Neuroscience, 1998. 18 v., 18 n., 7381-7393 p.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications**. United States: Hemisphere Publishing, New York, NY, 1985.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REGIER, D. A.; FARMER, M. E.; RAE, D. S.; LOCKE, B. Z.; KEITH, S. J.; JUDD, L. L.; GOODWIN, F. K. **Comorbidity of Mental Disorders With Alcohol and Other Drug Abuse**. Journal of the American Medical Association, 1990. 264 v., 19 n., 2511-2518 p.

REGIER, D. A.; RAE, D. S.; NARROW, W. E.; KAELEBER, C. T.; SCHATZBERG, A. F. **Prevalence of anxiety disorders and their comorbidity with mood and addictive disorders**. Journal of psychiatry, 1998. 173 v., 34 n., 24-28 p.

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

RICO, E. P.; SENGER, M. R.; FAUTH, M. G.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. **ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*)**. Life Sciences, 2003. 73 v., 2071-2082 p.

RINK, E.; GUO, S. **The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain**. Neuroscience, 2004. 127 v., 1 n., 147-154 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **Carotenóides e valor de vitamina A em cajá (*Spondias lutea*)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1989. 9(2) v., 148-162 p.

SACRAMENTO, C. K.; SOUZA, F. X. **Cajá (*Spondias mombin* L.)**. Jaboticabal: Funep. (Série Frutas Nativas, 4), 2000. 42 p.

SAIME, A.; OBI, C. L.; BESSONG, P. O.; NAMRITA, L. **Activity profiles of fourteen selected medicinal plants from Rural Venda communities in South Africa against fifteen clinical bacterial species**. African Journal of Biotechnology, 2005. 4 v., 12 n., 1443-1451 p.

SANTOS, H. B.; VIEIRA, L.; ALVES, S. N.; THOMÉ, R. G. **Análise do intestino delgado de *Danio rerio* exposto a organofosforado e detergente: um estudo histológico e morfométrico**. Revista Conexão Ciência, 2016. 11 v., 2 n.

SCHILDRAUT, J. J. **The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence**. The american journal of psychiatry, 1965. 122 v., 5 n., 509-22 p.

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

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

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; LIMA, D. M.; SANTOS, S. C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. **Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus**. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2011. 17 v., 406-413 p.

SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M. M.; MARQUES, M. M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. **Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil**. *Pharmaceutical Biology*, 2012. 50 v., 6 n., 740-746 p.

SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. **Anacardiaceae**. In R.C. Forzza et. al. (org.) *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 1 v., 599- 602 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5° ed. Editora da UFRGS, 1999. Rio Grande do Sul. Brasil.

SMITH, L. S. **Digestive function in teleost fishes**. *Fish Nutrition*. Academic press, San Diego, CA, USA, 1989. 2-29 p.

SOUZA, F. X.; SOUSA, F. H. L.; FREITAS, J. B. S.; ROSSETTI, A. G. **Aspectos morfológicos da unidade de dispersão de cajazeira**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, 2000. 35 v., 1 n., 215-220 p.

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*)**. *Journal of Nanomedicine Research*, 2016. 4 v., 4 n., 00093 p.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; REICHAR, M.; HUQ, K. A.; WAHAB, M. A.; AHMED, Z. F.; SMITH, C. **The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh**. *Journal of Fish Biology*, 2006. 69 v., 1435–1448 p.

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

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

STEWART, A. M.; BRAUBACH, O.; SPITSBERGEN, J.; GERLAI, R.; KALUEFF, A. V. **Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside**. *Trends Neurosci*, 2014. 37 v., 5 n., 264-278 p.

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

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

TABASSUM, N.; TAI, H.; JUNG, D.; WILLIAMS, D. R. **Fishing for Nature's Hits: Establishment of the Zebrafish as a Model for Screening Antidiabetic Natural Products**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015. 16 p.

THOMAS, B. C. **A reconsideration of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae)**. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1974. 61 v., 2 n., 483-490 p.

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

TIANLU, M.; BARFOD, A. **Anacardiaceae**. In: Wu ZY, Raven PH & Hong DY (eds.) Flora of China. Science Press and Missouri Botanical Garden Press, 2008. 11 v., 335-357 p.

Tropicos Global Plants. **Entry for *Spondias mombin* Linn [family ANACARDIACEAE]**.; 2013. Disponível em: <http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.upwta.1_210>. Acesso em: 15 de dezembro de 2017.

TUNNARD, C.; RANE, L. J.; WOODERSON, S. C.; MARKOPOULOU, K.; POON, L.; FEKADU, A.; JURUENA, M.; CLEARE, A. J. **The impact of childhood adversity on suicidality and clinical course in treatment-resistant depression**. Journal of Affective Disorders, 2014. 152-154 v., 122-130 p.

UCHENDU, N. C.; ISEK, T. **Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats**. African Health Sciences, 2008. 8 v., 163-167 p.

VALLE-MOJICA, L. M.; ORTÍZ, J. G. 2012. **Anxiolytic properties of *Valeriana officinalis* in the zebrafish: a possible role for metabotropic glutamate receptors**. Planta Med, 2012. 78 v., 16 n., 1719-24 p.

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

VAN PRAAG, H. M.; KORF, J. **Endogenous depressions with and without disturbances in the 5-hydroxytryptamine metabolism: A biochemical classification?**. Psychopharmacologia, 1970. 19 v., 2 n., 148-52 p.

VEIGA JR., V. F.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. **Plantas medicinais: cura segura?**. Quim. Nova, 2005. 28 v., 519-528 p.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **The natural products and the modern medicinal chemistry**. Química Nova, 2006. 29 v., 2 n., 326-337 p.

VILLEGAS, L. F.; FERNANDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALA, A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. **Evaluation of the wound-healing activity**

of selected traditional medicinal plants from Peru. Journal of Ethnopharmacology, 1997. 55 v., 3 n., 193- 200 p.

WANG, Z.; DU, J.; LAM, S. H.; MATHAVAM, S.; MATSUDAIRA, P.; ZHIYUAM G. **Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine.** BMC Genomics, 2010. 11 v., 2 n., 392-406 p.

WEINSTEIN, D. A; BIRK, E. M. **The effects of chemicals on the structure of terrestrial ecosystems: mechanisms and patterns of change.** 181-209 p. In: Levin, S.A.; Harwell, M.A.; Kelly, J.R.; Kimball, K.D, 1989. Ecotoxicology: problems and approaches. Springer-Verlag, New York. 547 p.

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

WILLNER, P. **Animal models of depression: an overview.** Pharmacology and Therapeutics, 1990. 45 v., 425-255 p.

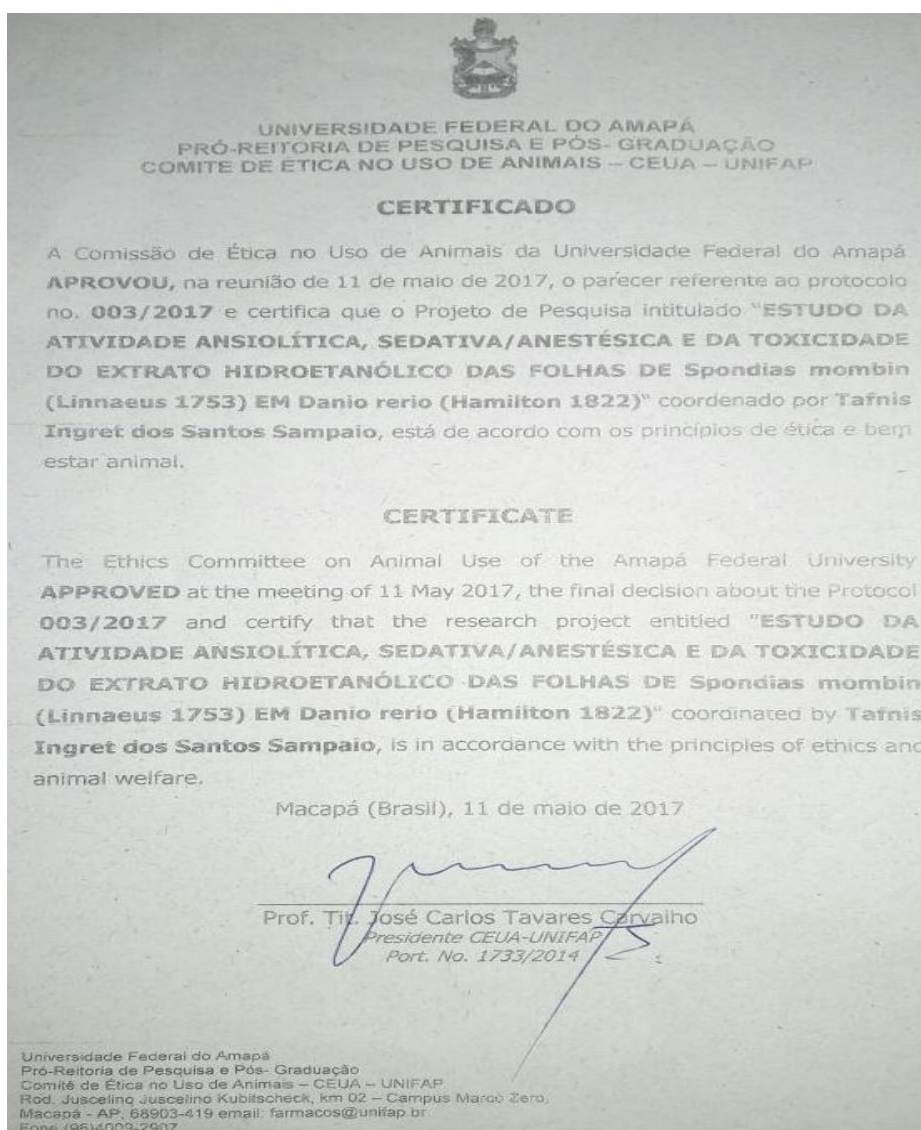
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates.** Geneva: WHO/MSD/MER, 2017, 22p. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>>. Acesso: 15 de novembro de 2017.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C; CECHINEL F. V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Química nova, 2011. 24 v., 1 n., 147-152 p.

ZHANG, J. L.; LAURENCE S. C.; DENSLOW, N. D.; MARTYNIUK, C. J. **Quercetin, a natural product supplement, impairs mitochondrial bioenergetics and locomotor behavior in larval zebrafish (*Danio rerio*).** Toxicol Appl Pharmacol, 2017. 327 v., 30-38 p.

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

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



Anexo 2 – Comprovante de submissão



José Carlos Tavares <jctcarvalho@gmail.com>

Submission JEP_2017_3985 received by Journal of Ethnopharmacology

1 mensagem

Journal of Ethnopharmacology <Evisupport@elsevier.com>
Responder a: ethnopharmacology@elsevier.com
Para: farmacos@unifap.br

16 de dezembro de 2017 16:57

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: JEP_2017_3985

Title: Leaves of Spondias mombin L. a traditional anxiolytic: Pharmacological analysis on Danio rerio (zebrafish) scototaxis

Journal: Journal of Ethnopharmacology

Dear Dr. Tavares Carvalho,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Ethnopharmacology. Your submission was received in good order.

What happens next: Your paper will undergo a screening process by the managing editors of the journal. During this stage the manuscript is rigorously checked for alignment with aims and scope of the journal, plagiarism, checking the completeness of the general submission, adherence to authors guidelines etc. Due to the high influx of papers, please allow 2-3 weeks for this process to be completed. Once the pre-screen is completed the paper will either be returned to you or be assigned to an Associate Editor.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evis.com/evis/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=JEP and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Anexo 3 – Normas de publicação do periódico

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords ([here](#)). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Short Communications - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the

papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.

7. Conference announcements and news.

Submission checklist

Please click [here](#) to download the Submission **Checklist**. This is a mandatory file during submission. Upload the completed checklist and choose the file type as "Checklist".

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Author contributions

For each author the contribution to the publication should be mentioned.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If

excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public

access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more.](#)

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., et al. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.

Matteucci, E., Giampietro, O. (2008) Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 163-172.

Froede, T.S.A. and Y.S. Medeiros, Y.S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 173-183. Gertsch J. (2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 177-183.

Chan K., et al. (2012) Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese Materia Medica. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 469-475.

Heinrich, M., Edwards, S., Moerman, D.E., and Leonti, M. (2009), Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol*, 124: 1-17.

PREPARATION

and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is

article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-ethnopharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the headings **Ethnopharmacological relevance, Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions.**

Click [here](#) to see an example.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found [here](#).

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Plant names

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with <http://www.theplantlist.org> mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>