

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA  
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
BACHARELADO EM MEDICINA**

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO PACARI NO DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO DE ZEBRAFISH**

**KÉSSIO JOHNES DA SILVA LINHARES**

Barreiras – BA

2025

**KÉSSIO JOHNES DA SILVA LINHARES**

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO PACARI NO DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO DE ZEBRAFISH**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal do Oeste da Bahia como  
requisito para a obtenção do título de bacharel em  
Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Izabela Barbosa Moraes

Barreiras – BA

2025

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

L735 Linhares, Késsio Johnes da Silva.

Avaliação de toxicidade do pacari no desenvolvimento embrionário de zebrafish. / Késsio Johnes da Silva Linhares. – 2025.

38f.

Orientador: Prof. Dra. Izabela Barbosa Moraes.

Monografia (Graduação) – Bacharelado em Medicina. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2025.

1. Lafoensia pacari. 2. Zebrafish. 3. Embriotoxicidade. I. Izabela Barbosa Moraes. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 610

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA  
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE MEDICINA



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE  
CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 26 dias do mês de fevereiro de 2025, às 10h, em sessão pública no Auditório 1 do Pavilhão de Aulas Um da Universidade Federal do Oeste da Bahia, na presença da Banca Examinadora presidida pela Profa. Dra. Izabela Barbosa Moraes, e composta pelos examinadores: Profa. Dra. Ana Maria Mapeli e Prof. Dr. Rafael da Conceição Simões, o estudante **KÉSSIO JOHNES DA SILVA LINHARES** apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO PACARI NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE ZEBRAFISH**. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao estudante e demais presentes e eu, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais examinadores.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** IZABELA BARBOSA MORAES  
Data: 28/03/2025 15:06:27-0300  
Verifique em <https://validar.itf.gov.br>

Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ANA MARIA MAPELI  
Data: 27/02/2025 18:48:36-0300  
Verifique em <https://validar.itf.gov.br>

Examinador 01

Rafael da  
Conceicao  
Simoes:812198  
73500

Assinado digitalmente por Rafael da  
Conceicao Simoes:81219873500  
ND: CN=Rafael da Conceicao  
Simoes:81219873500, OU=UFOB -  
Universidade Federal do Oeste da Bahia,  
O=ICPEdu, C=BR  
Razão: Eu sou o autor deste documento  
Localização:  
Data: 2025.02.27 21:43:35-03'00'  
Foxit PDF Reader Versão: 2024.4.0

Examinador 02

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à Deus, pela saúde, paciência e força que me guiou e iluminou em todos os momentos dessa jornada, principalmente nos momentos que aparentavam não ter solução.

À minha Mãe, irmã e padrasto, meu mais profundo agradecimento. Sem o apoio, a compreensão e o cuidado de cada um de vocês, nada disso seria possível. Vocês são minha base, inspiração e razão de continuar a jornada.

Aos meus familiares próximos, pelo apoio e carinho de sempre.

Aos meus amigos, agradeço os bons momentos juntos, os risos, as alegrias e até mesmo os momentos difíceis em que pude contar com cada um de vocês. A amizade de vocês, mesmo estando perto ou longe fisicamente, torna a caminhada mais leve.

À minha orientadora, gratidão pelo apoio, paciência e confiança em me guiar nesse percurso. Sua orientação, conselhos e lições foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

A banca avaliadora pela sua disponibilidade de tempo e por suas contribuições que sempre são significantes e agregam valor ao meu trabalho.

Aos inúmeros professores que fizeram parte da minha formação, e, em especial, aos docentes da UFOB que se esforçam para garantir um ensino de qualidade.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram em minha jornada.

## RESUMO

**Introdução:** *Lafoensia pacari* é uma espécie arbórea endêmica do Cerrado brasileiro, utilizada como planta medicinal na medicina tradicional. Sabe-se que além de efeitos benéficos, os compostos presentes em plantas medicinais podem apresentar toxicidade geral, podendo ter um impacto significativo na saúde devido ao desconhecimento sobre os efeitos que os metabólitos secundários podem gerar, principalmente durante o desenvolvimento embrionário. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de toxicidade do extrato etanólico da folha de *L. pacari* em embriões de Zebrafish. **Metodologia:** A análise foi feita com base no protocolo OECD 236 – Toxicidade Aguda em Embriões de Peixe (FET) com adaptações. Os ovos fertilizados de Zebrafish foram expostos a diferentes concentrações do extrato bruto etanólico das folhas de *Lafoensia pacari* (500; 400; 300; 200; 100; 50; 25 µg/mL), além dos grupos controle E3 e DMSO. As análises seguiram 24, 48, 72, 96 e 120 *hpf*. Foram analisadas as taxas de eclosão, coagulação, mortalidade, sobrevivência e alterações morfológicas. A organização, tabulação, construção dos gráficos e análise dos dados foram feitas no programa Microsoft Excel. **Resultados:** Os dados mostram que as taxas de coagulação e mortalidade aumentam de acordo com a concentração do extrato de *L. pacari*, já a eclosão está inversamente relacionada, ambos relacionados aos grupos controle após 120 *hpf*. Nas taxas de eclosão, houve um incremento de 3,3% e uma redução de 25%, 35%, 70%, 81,7% e 88,4% nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL e 500 µg/mL, nessa ordem. Nas taxas de coagulação, observou-se uma redução de 1,6% e incrementos de 16,6%, 18,3%, 50%, 66,6%, 76,6% e 83,3% nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL e 500 µg/mL, seguindo essa sequência. As taxas de mortalidade demonstraram incrementos de 16,6%, 23,3%, 60%, 83,3%, 78,3% e 86,6% nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente. Foram notadas alterações morfológicas do tipo edema de saco vitelínico e pericárdico, o primeiro teve taxas 6,7%, 3,3%, 8,3%, 23,3%, 10% e 3,3 nas concentrações de 500 µg/mL, 400 µg/mL, 300µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL, nesta ordem. O segundo apresentou taxas 6,7% nas concentrações de 200 µg/mL e 50 µg/mL, e 10% na concentração de 100 µg/mL. A CL<sub>50</sub> estimada foi de 156 µg/mL. **Conclusão:** As análises indicam toxicidade do extrato bruto etanólico das folhas de *L. pacari* em embriões de Zebrafish, além de sugerir um efeito indutor de edema de saco vitelínico.

**Palavras-chaves:** *Lafoensia pacari*; Zebrafish; Embriotoxicidade.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Lafoensia pacari* is a tree species endemic to the Brazilian Cerrado, used as a medicinal plant in traditional medicine. It is known that, in addition to beneficial effects, compounds present in medicinal plants can exhibit general toxicity, potentially having a significant impact on health due to a lack of knowledge about the effects that secondary metabolites may cause, especially during embryonic development. **Objective:** To evaluate the toxic effects of the ethanolic extract of *L. pacari* leaves on Zebrafish embryos. **Methodology:** The analysis was based on the OECD 236 protocol – Acute Fish Embryo Toxicity (FET) with adaptations. Fertilized Zebrafish eggs were exposed to different concentrations of the crude ethanolic extract of *Lafoensia pacari* leaves (500, 400, 300, 200, 100, 50, and 25 µg/mL), in addition to the control groups E3 and DMSO. The analyses were conducted at 24, 48, 72, 96, and 120 hpf. Hatching, coagulation, mortality, survival rates, and morphological alterations were assessed. Data organization, tabulation, graph construction, and analysis were performed using Microsoft Excel. **Results:** The data show that coagulation and mortality rates increase according to the concentration of *L. pacari* extract, while hatching rates are inversely related, both compared to the control groups after 120 hpf. In hatching rates, there was an increase of 3.3% and a reduction of 25%, 35%, 70%, 81.7%, and 88.4% at concentrations of 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, and 500 µg/mL, in that order. In coagulation rates, a reduction of 1.6% and increases of 16.6%, 18.3%, 50%, 66.6%, 76.6%, and 83.3% were observed at concentrations of 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, and 500 µg/mL, following this sequence. Mortality rates showed increases of 16.6%, 23.3%, 60%, 83.3%, 78.3%, and 86.6% at concentrations of 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, and 500 µg/mL, in the same order. Morphological alterations such as yolk sac and pericardial edema were observed. The first type had rates of 6.7%, 3.3%, 8.3%, 23.3%, 10%, and 3.3% at concentrations of 500 µg/mL, 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, and 50 µg/mL, in that order. The second type showed rates of 6.7% at 200 µg/mL and 50 µg/mL, and 10% at 100 µg/mL. The estimated LC50 was 156 µg/mL. **Conclusion:** The analyses indicate the toxicity of the crude ethanolic extract of *L. pacari* leaves in Zebrafish embryos and suggest an edema-inducing effect on the yolk sac.

**Keywords:** *Lafoensia pacari*; Zebrafish; Embryotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ocorrência de <i>Lafoensia pacari</i> no território brasileiro. ....	12
<b>Figura 2</b> - Morfologia das folhas e flores de <i>L. pacari</i> .....	13
<b>Figura 3</b> - Morfologia do Zebrafish evidenciando o dimorfismo sexual. ....	15
<b>Figura 4</b> - Principais pontos no desenvolvimento embrionário do Zebrafish. ....	16
<b>Figura 5</b> - Preparo do extrato bruto etanólico das folhas de <i>L. pacari</i> . ....	17
<b>Figura 6</b> - Aquário de manutenção dos animais. ....	18
<b>Figura 7</b> - Aparato para eclosão de Artêmias. ....	19
<b>Figura 8</b> - Aquário de reprodução com animais separados. ....	20
<b>Figura 9</b> - Desenho experimental. ....	21
<b>Figura 10</b> - Esquema de montagem da placa de 96 poços.....	21
<b>Figura 11</b> - Avaliação da eclosão de embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> . ....	23
<b>Figura 12</b> - Avaliação da coagulação de embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> .....	24
<b>Figura 13</b> - Avaliação da mortalidade de embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> .....	25
<b>Figura 14</b> - Avaliação da curva de sobrevivência embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> .....	27
<b>Figura 15</b> - Embrião de Zebrafish apresentando edema de saco vitelínico após exposição ao extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> . ....	28
<b>Figura 16</b> - Larva de Zebrafish apresentando edema de pericárdio após exposição ao extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> .....	30
<b>Figura 17</b> - Embrião de Zebrafish apresentando edema de saco vitelínico e pericárdico após exposição ao extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> .....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros para manutenção dos animais.....	19
<b>Tabela 2</b> - Avaliação da formação de edema de saco vitelínico em embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> . ....	29
<b>Tabela 3</b> - Avaliação da formação de edema de pericárdio em embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de <i>L. pacari</i> . ....	29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	10
<b>2.1 Plantas medicinais</b> .....	10
<b>2.2 Pacari (<i>Lafoensia pacari</i>)</b> .....	11
<b>2.3 Modelo animal - Zebrafish</b> .....	14
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	17
<b>3.2 Objetivos específicos:</b> .....	17
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
<b>4.1 Coleta do material vegetal e obtenção do extrato bruto</b> .....	17
<b>4.2 Criação e manutenção do modelo experimental</b> .....	18
<b>4.3 Desenho experimental</b> .....	19
<b>4.4 Avaliação da teratogenicidade em embriões de Zebrafish</b> .....	21
<b>4.5 Análise dos dados</b> .....	22
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>5.1 Eclosão, Coagulação e Mortalidade</b> .....	22
<b>5.2 Curva de sobrevivência e CL<sub>50</sub></b> .....	26
<b>5.3 Alterações morfológicas</b> .....	28
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32
<b>ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA-UFOB</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais fazem parte do processo evolutivo da espécie humana enquanto recurso terapêutico no tratamento de diversas enfermidades (Maciel *et al.*, 2002; Veiga Junior *et al.*, 2005), podendo ser conceituadas como qualquer planta que, quando utilizada pelo homem, apresente alguma ação farmacológica (Foglio *et al.*, 2006). O uso de plantas medicinais é uma forma de manutenção da saúde (Pinto; Amorozo; Furlan, 2006), mas também um processo cultural de obtenção de saberes sobre identificação e formas de uso das espécies vegetais para fins medicinais (Colet *et al.*, 2015). Estima-se que 80% da população de países em desenvolvimento dependem quase que em sua totalidade da medicina tradicional, na qual as plantas medicinais são o principal componente no tratamento de enfermidades (Barbosa, 2008).

A *Lafoensia pacari* é uma espécie arbórea comumente encontrada no Cerrado brasileiro, é conhecida popularmente como mangaba-brava, dedaleiro, pacari e outros (Carvalho, 2003). Se trata de uma importante planta medicina, sendo utilizada por muitas comunidades, de modo que a infusão ou a cocção de suas folhas são comumente utilizadas no tratamento de várias enfermidades (Firmo *et al.*, 2013) por apresentar capacidade anti-histamínica (Rogerio *et al.*, 2010), antiinflamatória (Guimarães *et al.*, 2010), alívio da dor (Nascimento *et al.*, 2011), antioxidante (Galano *et al.*, 2014) e microbicida (Silva Junior *et al.*, 2010), mas que ainda carece de estudos sobre possíveis efeitos tóxicos.

Desta forma, se faz importante os estudos de toxicidade *in vivo* para determinar os efeitos de toxicidade que os extratos da planta podem apresentar, visando segurança e redução de riscos do âmbito da saúde humana (Ismail *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2021). Neste contexto, o Zebrafish ou Paulistinha vem se destacando enquanto organismo modelo em estudos de biologia do desenvolvimento e farmacologia (Falcão *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2020). Se trata de uma espécie com homologia de 70% com a espécie humana (Gunnarsson *et al.*, 2008), além de possuir vantagens como fácil manejo e prole numerosa, cerca de 200 a 300 ovos e desenvolvimento rápido (Silveira *et al.*, 2012).

Por isso, este trabalho atende a uma lacuna na literatura no que tange o estudo da avaliação dos efeitos de toxicidade de extratos da folha de *L. pacari* no desenvolvimento embrionário do Zebrafish, contribuindo para consolidação de pesquisas na área de estudo. Além de contribuir para o conhecimento sobre os riscos associados ao uso de *L. pacari* enquanto planta medicinal e enriquecimento do conhecimento científico sobre espécies do Cerrado brasileiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Plantas medicinais

Planta medicinal pode ser definida como qualquer planta utilizada pelo homem, que de alguma forma apresente uma ação farmacológica (Foglio *et al.*, 2006). O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico para o tratamento e cura de enfermidades acompanha a evolução da espécie humana e, ainda, é amplamente utilizada por diversas comunidades e grupos étnicos-sociais (Maciel *et al.*, 2002; Veiga Junior *et al.*, 2005). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento depende quase que integralmente da medicina tradicional, sendo as plantas o principal componente desse tratamento (Barbosa, 2008).

No Brasil, principalmente em regiões mais vulneráveis, o uso de plantas medicinais é recorrente e até mesmo em grandes cidades elas são comercializadas em feiras livres, mercados populares e cultivadas em residências. O conhecimento sobre o uso terapêutico dessas plantas se dá por meio da observação popular e o acúmulo dessas informações durante séculos, o que pode resultar na validação de sua eficácia no âmbito da medicina tradicional (Maciel *et al.*, 2002).

Segundo Pinto *et al.* (2006), a prática do uso medicinal das plantas é uma alternativa viável para a manutenção da saúde. A população acumula informações sobre o uso das plantas para fins medicinais obtendo saberes sobre identificação e formas de uso, agregando então conhecimento ao uso popular (Colet *et al.*, 2015). Dessa forma, o conhecimento se desenvolve a partir de grupamentos culturais, permitindo o convívio com a natureza e o aproveitamento de suas potencialidades de modo sistemático e constante (Valeriano *et al.*, 2018). Em decorrência do reconhecimento e valorização desses saberes, em 2006 as plantas medicinais passaram a fazer parte das opções terapêuticas complementares instituída pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2006).

Em consonância, a literatura aponta que, nas últimas décadas, os produtos naturais vêm se tornando uma rica fonte para a descoberta de novos medicamentos, a partir de extratos e compostos derivados do metabolismo secundário das plantas (Falcão *et al.*, 2018). Além disso, estima-se que cerca de 25% dos medicamentos contêm compostos isolados de plantas. Dessa forma, essas espécies vegetais se apresentam como fontes na descoberta de novas substâncias para o tratamento de doenças diversas (Ferreira *et al.*, 2010).

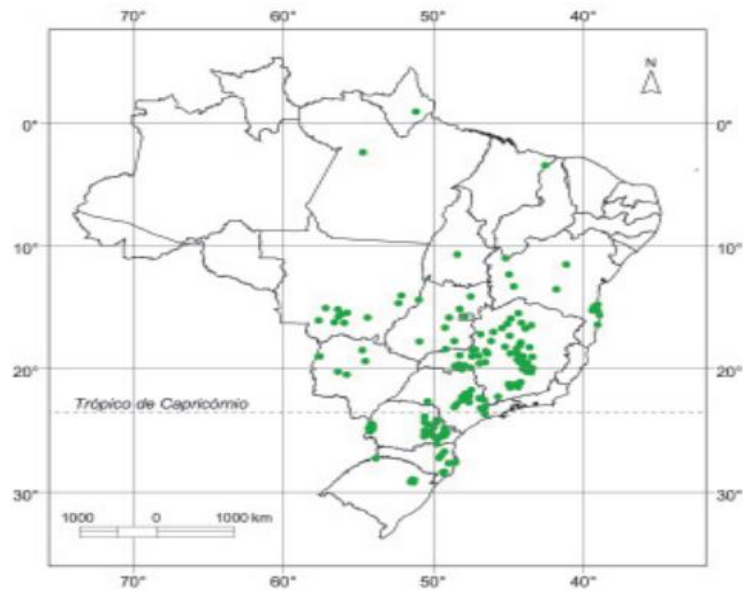
Entretanto, há um crescimento do uso indiscriminado desses extratos vegetais, uma vez que são considerados seguros pela população em geral. Em contrapartida, estudos de toxicidade vem relatando vários efeitos colaterais e/ou letais relacionados ao uso desses extratos devido à toxicidade geral, atividade pró-inflamatória e reações alérgicas em resposta aos metabólitos secundários em doses inseguras e suas possíveis interações ou sinergia (Veeran *et al.*, 2020). Em consonância, Tavares Gonçalves (2013) aponta que as atividades antioxidantes encontradas em sistemas complexos, como materiais de origem vegetal, organismos, tecidos específicos ou sistemas biológicos, podem ter sua origem em diferentes tipos de componentes, bem como em efeitos sinérgicos ou interações entre esses componentes.

Já em relação ao uso de plantas medicinais por mulheres grávidas, Rodrigues *et al.* (2011), em seu estudo sobre o potencial teratogênico e abortivo de plantas medicinais, identificou que para a grande maioria das plantas consideradas medicinais não existem dados seguros sobre seu uso durante a gravidez. Além disso, verificou-se que plantas com potencial abortivo podem causar malformações de membros, órgãos e diferentes problemas de saúde para o feto (Rodrigues *et al.*, 2011). Desta forma, se faz necessário estudos de toxicidade *in vivo* para avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade que compostos presentes em plantas usadas na medicina popular podem apresentar, visando a segurança, eficácia e a redução de riscos para saúde humana (Ismail *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2021).

## **2.2 Pacari (*Lafoensia pacari*)**

*Lafoensia pacari*, popularmente chamada de Pacari, é uma angiosperma da família Lythraceae, encontrada no Distrito Federal e nos seguintes estados brasileiros: Amapá, Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Mato Grosso, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Pará, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Tocantins (Carvalho, 2003). A Figura 1 mostra os locais de ocorrência da *L. pacari* no Brasil de acordo com o levantamento da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

**Figura 1** - Ocorrência de *Lafoensia pacari* no território brasileiro.



Fonte: (Carvalho, 2003).

Como visto, a espécie apresenta ampla distribuição no Cerrado brasileiro, sendo registrada em mais de 50% desse bioma (Ribeiro; Dias, 2007). Trata-se de uma árvore perene a semidecídua, com altura variando entre 1 a 10 metros, com o tronco podendo alcançar até 26 cm de diâmetro, de casca escamosa, acinzentada, com fissuras e cristas sinuosas e descontínuas (Lorenzi, 1998; Carvalho, 2003; Camillo *et al.*, 2016).

As folhas têm características compostas, dispostas de forma oposta, cruzada, com formas elípticas, oblongas ou obovadas, com margens inteiras e onduladas. Os ápices foliares podem ser obtusos, retusos ou acentuadamente agudos, enquanto as bases são obtusas. A lâmina foliar varia entre 5 e 15 cm de comprimento e 2 a 9 cm de largura, com coloração verde-amarelo-claro e brilhante, com nervuras salientes embaixo e nervuras secundárias marginais (Meira, 2000; Santos, 2006). A Figura 2 mostra a morfologia das folhas e flores de *L. pacari*.

As flores são grandes, com receptáculo desenvolvido de até 8 cm de diâmetro, e possuem até 16 pétalas livres, que geralmente são brancas ou amareladas (Meira, 2000; Santos, 2006). O fruto é seco, indeiscente, do tipo cápsula semilenhosa e semiglobosa, com 4 a 8 cm de comprimento e 2,3 a 5,3 cm de diâmetro, apresentando um ápice arredondado que termina em formato cônico (Santos, 2006).

**Figura 2** - Morfologia das folhas e flores de *L. pacari*.



Fonte: (Benedito, 2005).

A *L. pacari* é utilizada na medicina tradicional por diversas comunidades brasileiras e no tratamento de várias patologias (Rogério, 2002). Ainda, se destaca na farmacopéia popular do Cerrado (Dias; Laureano, 2009).

Sabe-se que as folhas da planta vêm sendo utilizadas na medicina popular para os seguintes fins etnofarmacológicos: Antidiarreico (Sampaio *et al.*, 2011), cicatrização (Rogério, 2002), diaforética (Mendonça *et al.*, 2006), gastrite e úlceras (Nascimento *et al.*, 2011) e inflamações (Rogério, 2002). O modo de preparo empregado é a infusão ou a decocção (Firmo *et al.*, 2013). Além disso, ao estudar o extrato das folhas de *L. pacari* foi verificada atividade antifúngica (Souza *et al.*, 2002). Os extratos da planta possuem propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e gastroprotetoras (Pereira *et al.*, 2018).

De acordo com a literatura, os compostos com ação farmacológica da planta estão relacionados com os produtos do seu metabolismo secundário (Santos; Salatino; Salatino, 2000). Os produtos do metabolismo secundário das plantas estão relacionados com a resposta fisiológica ao ambiente e outros fatores externos, ou seja, os metabólitos secundários garantem adaptação e defesa para as plantas (Taiz *et al.*, 2017). Nas folhas de *L. pacari* já foi relatado a presença de flavonoides e taninos (Santos; Salatino; Salatino, 2000; Sampaio *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2018). Essa classe de polifenóis é bastante relevante para a atividade biológica das plantas e tem importantes propósitos no desenvolvimento de fármacos (Monteiro *et al.*, 2005).

Ainda de acordo com Galdino (2015), ao analisar o perfil fitoquímico do extrato etanólico e frações das cascas do caule de *L. Pacari*, foi detectado a presença de saponinas, taninos, esteroides, triterpenos e traços de flavonoides, sendo apenas esteroides e triterpenos na

fração clorofórmica, saponinas, esteroides, triterpenos e traços de flavonoides na fração acetato de etila e nas frações n-butanol e aquosa apenas saponinas e taninos. O ácido elágico é o constituinte frequentemente mais isolado em ensaios biomonitorados com a *L. pacari*. Os efeitos anti-inflamatório, antioxidante e gastroprotetor dos extratos da planta estão relacionados a este composto (Galdino, 2015).

### **2.3 Modelo animal - Zebrafish**

O *Danio rerio* (Hamilton, 1822), conhecido como popularmente como Zebrafish ou Paulistinha no Brasil, é um peixe natural de água doce, possui pequeno porte com cerca de 3 a 4 cm, e alta taxa de reprodução, além de apresentar semelhança biológica em relação aos mamíferos (Silveira *et al.*, 2012). É nativo do sul da Ásia e, normalmente, é encontrado em partes rasas e calmas ou paradas do flume. A temperatura ambiente ideal varia entre 25 a 30°C, sendo que a reprodução é melhor observada aos 28°C. Sua dieta se baseia em zooplâncton, pequenos crustáceos, insetos, algas e uma diversidade de matéria orgânica. Dietas que estimulam a caça são consideradas ideais, como artêmias, paramécio e rotíferos, pois possuem alto teor de proteínas (Dammski *et al.*, 2011).

O Zebrafish possui três estágios de desenvolvimento: larval, juvenil e adulto. Podem alcançar até 5 cm de comprimento, vivendo entre 2 e 3 anos. Possui corpo esguio e alongado, cabeça curta, narina avantajada e boca inclinada e voltada para cima, sendo a mandíbula presa, o que possibilita uma maior abertura da boca e ajuda na solução de alimento. Possui uma única nadadeira dorsal e um par de nadadeiras pélvicas inseridas posteriormente, o que garante rápida aceleração durante a natação. Sua principal característica é o padrão de listras ao longo do corpo e das nadadeiras anal e caudal, em adultos apresentam cinco listras pretoazuladas alternadas com listras amarelo-prateadas. O dimorfismo sexual caracteriza os machos mais delgados e escuros enquanto as fêmeas são maiores e robustas (Dammski *et al.*, 2011). A morfologia do Zebrafish pode ser vista na Figura 3.

**Figura 3** - Morfologia do Zebrafish evidenciando o dimorfismo sexual.

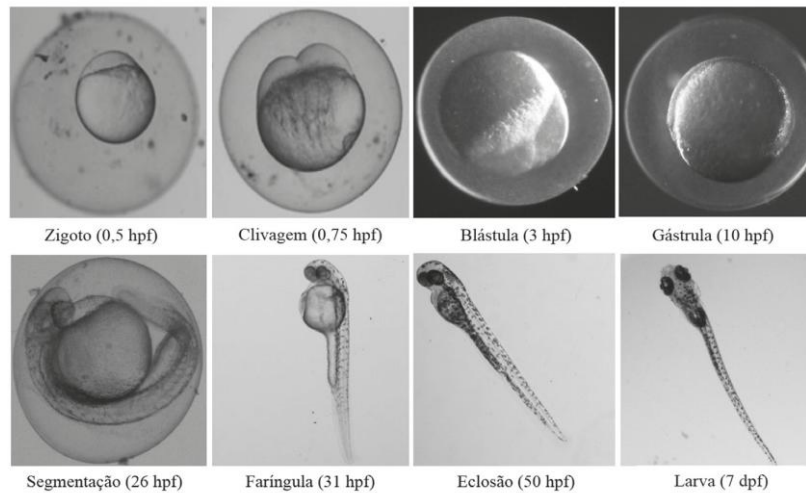


Fonte: (Cursos.unipampa, 2023).

O Zebrafish é um peixe que possui comportamento social, mas tem preferência em formar pequenos cardumes. As fêmeas apresentam comportamento de disputa por meios físicos como brigas e mordeduras, e químicos com a liberação de hormônios que inibem a liberação de feromônios de outras fêmeas durante a ovulação. A ovulação das fêmeas também pode ser induzida por hormônios liberados na água pelos machos, de forma que ocorre um aumento significativo na desova, quantidade e viabilidade dos ovos quando comparados com fêmeas isoladas (Harper; Lawrence, 2016; Lawrence, 2007). O ciclo circadiano do Zebrafish é bem estabelecido, o mais indicado é que tenha em cativeiro um ciclo de 14 horas de luz e 10 de escuridão para manter suas atividades comportamentais e biológicas funcionais (Harper; Lawrence, 2016; Lawrence, 2007).

O Zebrafish é considerado um dos mais importantes organismos-modelos de vertebrados nas áreas de estudos em genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia, biomedicina e farmacologia (Falcão *et al.*, 2018; Shen; Zuo, 2020). Isso se dá por várias características importantes do animal, como uma homologia genômica de aproximadamente 70% com os humanos e 84% dos seus genes estão associados a doenças humanas (Gunnarsson *et al.*, 2008). Além de prole numerosa - cerca de 200 a 300 ovos em até 3 dias - embriões são transparentes e apresentam um ciclo de desenvolvimento rápido (Silveira *et al.*, 2012). A fertilização é externa o que possibilita fácil monitoramento com uso de estereomicroscópio, o desenvolvimento embrionário se inicia com a fertilização e finaliza com a eclosão em cerca de 48 a 96 horas pós-fertilização (hpf) (Kimmel *et al.*, 1995). A Figura 4 apresenta os principais estágios de desenvolvimento do Zebrafish.

**Figura 4** - Principais pontos no desenvolvimento embrionário do Zebrafish.



Fonte: (Siebel e Bonan, 2015).

Além disso, Falcão *et al.* (2018), em seu trabalho, concluíram que os testes de toxicidade com extratos vegetais realizados em Zebrafish possuem resultados semelhantes aos encontrados em roedores e outros modelos animais, o que demonstra confiabilidade nos estudos de toxicidades com o modelo do Zebrafish. Ainda, os dados desses autores apontam que o *D. rerio* possui órgãos comparáveis aos humanos e fisiologia conservada.

O teste de toxicidade aguda em embriões de peixe (FET – Fish Embryo Acute Toxicity Test) foi desenvolvido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) como uma diretriz para avaliar os efeitos da embriotoxicidade de certos compostos nas primeiras 96 horas dos estágios de desenvolvimento dos embriões (OECD, 2013). Ele se baseia na avaliação morfológica e funcional do desenvolvimento embrionário em Zebrafish, observando características como: padrão de formação de somitos; ausência de formação de células embrionárias; padrão de desprendimento da cauda; formação de edemas seja ele vitelínico ou cardíaco; pigmentação; e, retardo no desenvolvimento e taxa de sobrevivência (Nguyen *et al.*, 2020).

Desta forma, a pesquisa preencherá uma lacuna na literatura ao avaliar os efeitos de toxicidade do extrato etanólico da folha de *L. pacari* no desenvolvimento embrionário do *D. rerio*. Esse estudo contribuirá para a consolidação das pesquisas na área, ampliando o conhecimento sobre os riscos associados ao uso dessa planta medicinal. Além disso, fornecerá subsídios para o consumo seguro e eficiente da planta, reduzindo potenciais riscos à saúde das comunidades que utilizam a medicina tradicional. Por fim, a pesquisa também fortalecerá o conhecimento científico e a valorização das espécies do Cerrado brasileiro.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de toxicidade do extrato etanólico da folha do Pacari em embriões de Zebrafish.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a taxa de sobrevivência de embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico da folha do Pacari;
- Avaliar alterações morfológicas no desenvolvimento de embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico da folha do Pacari;
- Estabelecer a  $CL_{50}$  do extrato etanólico do Pacari em Zebrafish.

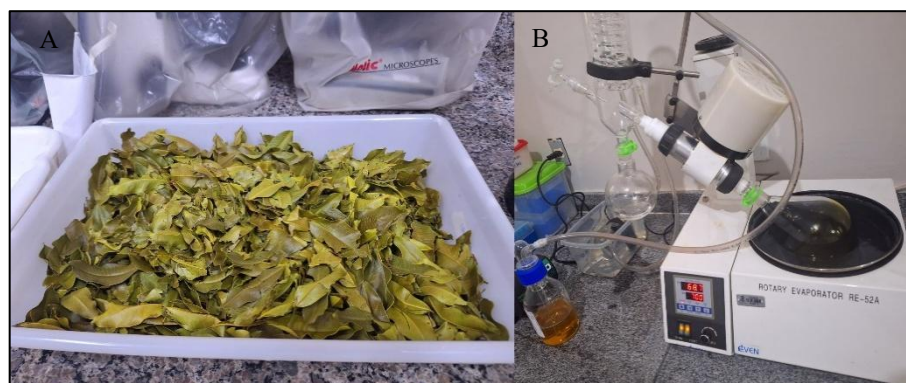
### 4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFOB), sob o número de registro 0002-2023 (Anexo I).

#### 4.1 Coleta do material vegetal e obtenção do extrato bruto

As folhas de *L. pacari* em estágio vegetativo foram coletadas em área preservada de Cerrado, numa manhã de verão no município de Barreiras-BA. Após a coleta, o material vegetal foi submetido a desidratação em estufa a quarenta graus celsius (40°C) durante vinte e quatro horas (24h). Já desidratadas, as folhas foram trituradas com auxílio de triturador, resultando em um pó que logo foi armazenado em local protegido da luminosidade e umidade. A Figura 5A mostra as folhas de *L. pacari* após 48h em desidratação.

**Figura 5** - Preparo do extrato bruto etanólico das folhas de *L. pacari*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O extrato etanólico foi preparado utilizando 100g do pó seco das folhas, que foi submetido à maceração estática em solução contendo 500mL de etanol 98% (1:5m/v) por sete dias em temperatura ambiente. O produto obtido através do processo foi filtrado com auxílio de tecido do tipo Voil, sendo o líquido da maceração transferido para tubos Falcon (15 mL) e centrifugado a 2325 RCF durante 20 minutos. O solvente restante foi removido por rotaevaporação a 40°C sob pressão reduzida. O extrato etanólico foi congelado a -20°C e, posteriormente, liofilizado, resultando no extrato bruto (Lima Júnior *et al.*, 2021). A Figura 5B apresenta o processo de rotaevaporação.

#### 4.2 Criação e manutenção do modelo experimental

Cerca de 30 indivíduos adultos de Zebrafish (*Danio rerio*) foram adquiridos em comércio local na cidade de Barreiras - Bahia. Estes foram transportados ao laboratório de pesquisa em embriotoxicidade da Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB, e alocados em 2 aquários com capacidade de 30L, 2 filtros e 2 termostatos com temperatura média da água ficando em torno de 28° C. A temperatura média do laboratório foi de 22 ° C e o fotoperíodo com 14 horas de luz e 10 horas de escuro. A oxigenação da água foi realizada pelo próprio filtro externo, como pode ser observado na Figura 6.

**Figura 6** - Aquário de manutenção dos animais.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A alimentação foi realizada com ração floculada (Alcon Basic 60% proteína e 15% gordura) 2 vezes ao dia, e uma vez com artêmias, na segunda alimentação do dia.

**Figura 7** - Aparato para eclosão de Artêmias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

As artêmias foram adquiridas comercialmente na forma de cistos. Sua eclosão foi realizada em água salgada, seguindo as instruções do fornecedor. Para isso, utilizou-se 25 g de sal grosso marinho distribuídos em 1 L de água destilada, com aeração, e luminosidade. Para garantir essas condições, foi necessário montar um aparato ilustrado na Figura 7. Após 24 a 48h, as artêmias foram coletadas, filtradas com água doce para retirar a salinidade, armazenadas em tubo Falcon com água destilada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todos os dias um tubo era descongelado para alimentação dos peixes adultos.

O acúmulo de matéria orgânica resultante da excreção fisiológica dos animais somado aos restos alimentares que se depositam no fundo do aquário levam à proliferação bacteriana, altos níveis de compostos nitrogenados e tóxicos aos peixes, para evitar isso, uma rotina de cuidados foi mantida e verificada semanalmente, como pode ser visualizada na Tabela 1.

**Tabela 1** - Parâmetros para manutenção dos animais.

<b>Parâmetro</b>	<b>Frequência</b>
Alimentação com ração	2 vezes ao dia de segunda a sábado
Alimentação com artêmias	1 vez ao dia de segunda a sábado
Sifonagem	1 vez ao dia de segunda a sábado
Higienização completa dos aquários	Semanalmente
Teste de pH	Semanalmente
Verificação da temperatura	Diariamente
Eclosão de artêmias	Quinzenalmente

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

### 4.3 Desenho experimental

Antes da reprodução, preparou-se soluções de extrato bruto etanólico (EB) de *L. pacari* nas concentrações de 500; 400; 300; 200; 100; 50; 25  $\mu\text{g/mL}$ . Utilizando 0,015g de extrato bruto

para 30 mL de solvente contendo o meio E3 (sol.  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) e DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,05%. O DMSO precisou ser utilizado visto que em testes anteriores o extrato bruto de *L. pacari* demonstrou ser hidrofóbico.

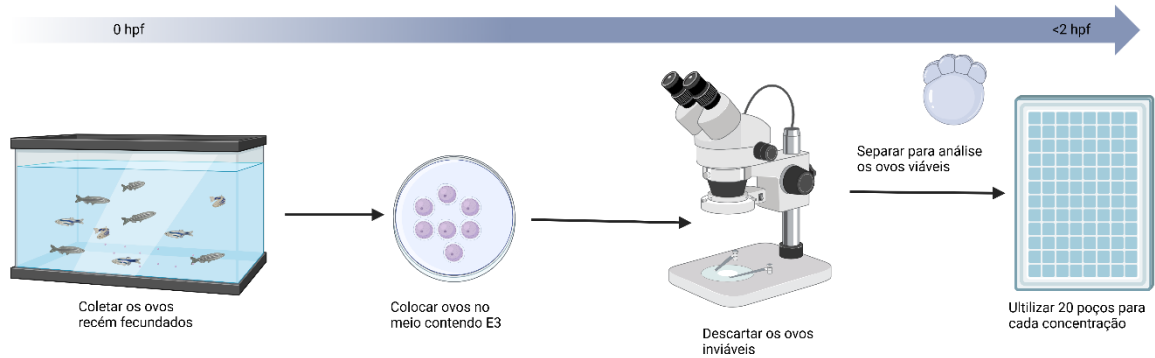
Os animais utilizados para reprodução foram separados em aquário de reprodução em 2 grupos compostos por 5 fêmeas e 5 machos, na proporção 1/1, separados por uma divisória de acrílico semi oclusiva, o que permite a circulação de água e feromônios de acasalamento. Após 12h separados, a divisória foi retirada permitindo o acasalamento, após 40 minutos os ovos foram coletados. A Figura 8 mostra o aquário de reprodução com os animais separados.

**Figura 8** - Aquário de reprodução com animais separados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Após a coleta dos ovos, eles foram transferidos para uma placa de petri e selecionados os fecundados com até 2 *hpf* com auxílio de uma lupa estereoscópica. Estes foram transferidos para um microplaca de 96 poços, sendo 1 ovo por poço e 20 poços para cada concentração do extrato em um volume de  $100\mu\text{L}$ . As microplacas foram transferidas para uma estufa mantida a  $28^\circ\text{C}$  e, após 24h, foi feita a primeira análise, seguida de 48, 72, 96 até 120 *hpf*. A Figura 9 ilustra o desenho experimental. Todas as análises foram feitas em triplicata, com reprodução em dias diferentes para melhor avaliação da reprodutibilidade dos resultados.

**Figura 9 - Desenho experimental.**

Fonte: (Adaptado de OECD, 2013).

No primeiro bloco, foram analisadas as concentrações de 300, 200, 100 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , além do grupo controle contendo solução E3. No segundo bloco, foram avaliadas as concentrações de 500, 300 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , juntamente com os grupos controle DMSO e E3. Cada bloco continha 20 poços para as concentrações testadas, com três repetições para cada condição. Além disso, todas as repetições incluíam um grupo E3 para controle da placa. A Figura 10 esquematiza a distribuição de concentrações por poços.

**Figura 10 - Esquema de montagem da placa de 96 poços.**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bloco 1	A	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	E3	E3
	B	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	E3	E3
	C	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	E3	E3
	D	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	E3	E3
	E	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	E3	E3
	F	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	E3	E3
	G	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	E3	E3
	H	400 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	200 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$	E3	E3
Bloco 2	A	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	DMSO	DMSO	E3	E3
	B	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	DMSO	DMSO	E3	E3
	C	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	DMSO	DMSO	E3	E3
	D	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	DMSO	DMSO	E3	E3
	E	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	DMSO	DMSO	DMSO	E3	E3
	F	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	DMSO	DMSO	DMSO	E3	E3
	G	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	DMSO	DMSO	DMSO	E3	E3
	H	500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	DMSO	DMSO	DMSO	E3	E3

Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Esquema demonstra como as análises foram estruturadas na placa de 96 poços, cada concentração foi testada em tríplica. E3: Solução nutritiva.

#### 4.4 Avaliação da teratogenicidade em embriões de Zebrafish

Os testes de teratogenicidade em Zebrafish seguiram o protocolo estabelecido pela OCDE 236 (OECD, 2013), com adaptações. A análise foi baseada na observação de alterações no desenvolvimento embrionário do peixe-zebra, sendo utilizados para análise os seguintes parâmetros: coagulação, mortalidade, extensão do saco vitelino e pericárdico, eclosão e sobrevivência.

Alguns marcos importantes no desenvolvimento do peixe-zebra foram utilizados para cada *hpf*, sendo que em 24 *hpf* foram avaliados a coagulação, o descolamento da cauda, o desenvolvimento de somitos, a movimentação do embrião, e o início da pigmentação. Em 48 *hpf*, o batimento cardíaco, circulação sanguínea e pigmentação da cauda. Em 72 *hpf*, o batimento cardíaco, o início de extensão do saco vitelínico, presença de listras de pigmentação dorsal e ventral se encontrando na cauda, vasos sanguíneos segmentares detectáveis, o desenvolvimento do trato digestivo anterior e presença de neuromastos, além da presença de edema e desenvolvimento normal e morte.

#### **4.5 Análise dos dados**

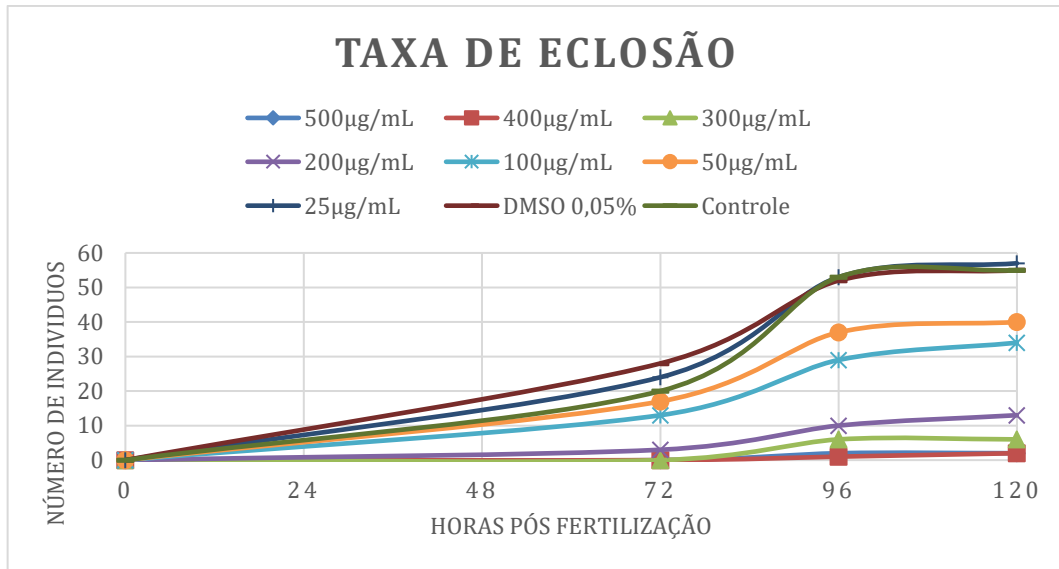
Foi realizada uma análise descritiva dos dados com frequência relativa e absoluta. A tabulação e organização dos dados e montagem dos gráficos foram feitas utilizando o programa Microsoft Excel. Foram analisados os dados de taxas de sobrevivência, eclosão, coagulação e mortalidade até 120 *hpf*. Para a determinação da  $CL_{50}$  foi utilizada a curva de sobrevivência e equação da reta.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Eclosão, Coagulação e Mortalidade**

As eclosões iniciaram nas concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$  e nos dois controles a partir das 72 *hpf* até 120 *hpf*. A taxa de eclosão foi maior entre os grupos com menor concentração do extrato bruto de *L. pacari*. A taxa de eclosão nos dois grupos controle foi de 91,7%, desta forma, houve um incremento de 3,3% em comparação com a concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , por outro lado, houve uma redução de 25%, 35%, 70% nas concentrações de 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  e 200  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Nas demais concentrações as eclosões começaram apenas em 96 *hpf* indo até 120 *hpf*, causando uma redução de 81,7%, na concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$  e 88,4% nas concentrações de 400  $\mu\text{g/mL}$  e 500  $\mu\text{g/mL}$ . A Figura 11 mostra o gráfico de linhas com os números absolutos de coagulação até 120 *hpf*.

**Figura 11** - Avaliação da eclosão de embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: O gráfico da Figura 11 apresenta as tendências de eclosão em linhas por concentração do extrato bruto de *L. pacari* utilizadas, além dos grupos controles DMSO e E3 (controle). No eixo Y estão os números absolutos de indivíduos de 0 a 60 e no eixo X o intervalo de avaliação.

Nota-se que nas quatro concentrações mais altas as taxas de eclosão foram baixas, esse resultado está relacionado ao efeito agudo do extrato, uma vez que quando analisadas as taxas de coagulação percebe-se que nestas concentrações a maior parte dos embriões já não estão viáveis após 24 *hpf*. Além disso, as três concentrações mais altas iniciaram a eclosão 24 horas após o início dos demais grupos, indicando atraso no desenvolvimento. Outra questão analisada foi que na concentração de 25 µg/mL a taxa de eclosão em 120 *hpf* se relaciona com as taxas dos grupos controle, acima de 90%, indicando que nesta concentração o extrato não causa embriotoxicidade ao Zebrafish.

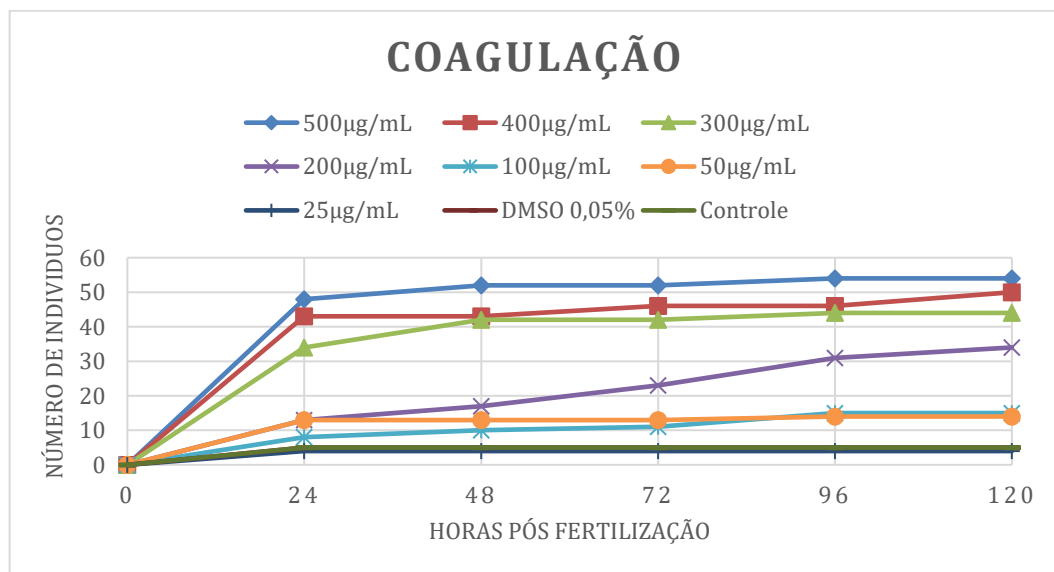
Ao analisar as taxas de coagulação, nota-se que, na maior concentração utilizada (500 µg/mL) os percentuais variaram entre 80% em 24 *hpf* e 90% em 120 *hpf*. Na concentração de 400 µg/mL obteve-se 71,7% em 24 *hpf* e 83,3% em 120 *hpf*. Em 300 µg/mL variou entre 53,7% em 24 *hpf* e 73,3% em 120 *hpf*. Os dados de coagulação nas três maiores concentrações demonstram que a *L. pacari* apresenta toxicidade. A variação ao longo do tempo demonstra um efeito agudo e outro subagudo capaz de gerar coagulação.

Na concentração de 200 µg/mL a coagulação em 24 *hpf* foi de 21,7%, já em 120 *hpf* foi de 56,7%, sendo está a concentração com maior variância ao longo do tempo, alcançando uma diferença de 35,6%. Com 100 µg/mL do extrato bruto a coagulação foi de 13,3% em 24 *hpf* e 25% em 120 *hpf*. Na concentração de 50 µg/mL as taxas variaram de 21,7% em 24 *hpf* e 23,3% em 120 *hpf*. Diferentemente das demais concentrações, a de 25 µg/mL manteve a mesma taxa

de coagulação ao longo do tempo em 6,7%, já os grupos controles DMSO e E3 registraram 8,3% em 24 *hpf* também sem apresentar variação.

Desta forma, nota-se um incremento de 16,6%, 18,3%, 50%, 66,6%, 76,6% e 83,3% na taxa de coagulação das concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente em relação aos grupos controle. Por outro lado, houve uma redução de 1,6% na concentração de 25 µg/mL. A Figura 12 apresenta o gráfico de linhas com os números absolutos de coagulação até 120 *hpf*.

**Figura 12** - Avaliação da coagulação de embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.

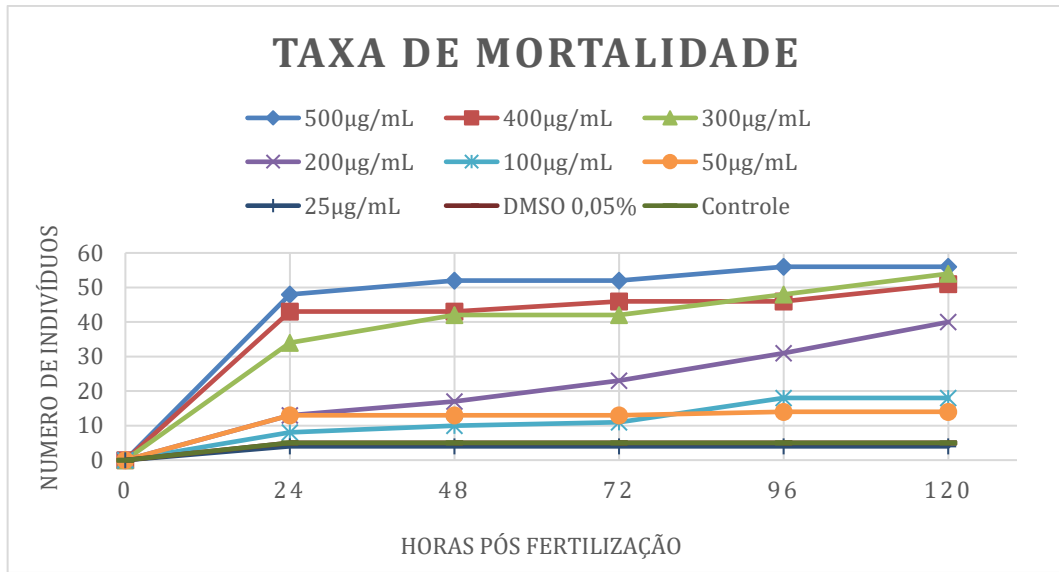


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A mortalidade foi avaliada levando em consideração a coagulação dos embriões e a mortalidade das larvas pós eclosão em até 120 *hpf*, desta forma as taxas de mortalidade chegaram em 93,3%, 85%, 90%, 66,7%, 30% e 23,3%, nas concentrações de 500 µg/mL, 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL em 120 *hpf* respectivamente. Já na concentração de 25 µg/mL e os dois grupos controle, não houveram mudanças na taxa de mortalidade em relação à taxa de coagulação.

Com isso, as taxas de mortalidade demonstraram incrementos de 16,6%, 23,3%, 60%, 83,3%, 78,3 e 86,6% em relação aos grupos controle nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente. A Figura 13 apresenta o gráfico de linhas com os números absolutos de mortalidade até 120 *hpf*.

**Figura 13** - Avaliação da mortalidade de embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nota-se que os dois grupos controles DMSO 0,05% e E3 apresentaram taxas de mortalidade de 8,3% em até 120 *hpf* respeitando o estabelecido pelo protocolo da OECD que determina uma mortalidade de até 10% no grupo controle. Na concentração de 25 µg/mL houve uma mortalidade de 6,7%. Além disso, a foi a única que não houve diferença entre as taxas de coagulação e mortalidade, demonstrando que possivelmente essa dose do extrato bruto de *L. pacari* não apresenta toxicidade.

Neste estudo identificou-se um efeito de toxicidade do extrato etanólico das folhas de *L. pacari*, sendo que na concentração de 500 µg/mL após 120 *hpf* foi alcançado 93,3% de mortalidade. Os estudos de toxicidade sobre *L. pacari* são escassos (Ávila *et al.*, 2019), mas alguns autores como Malheiros *et al.* (2014), ao estudar a atividade alelopática de *L. pacari* constataram a capacidade do extrato etanólico foliar de inibir o crescimento de plântulas de monocotiledôneas e relacionou esse desfecho com a atividade dos compostos fenólicos advindos do metabolismo secundário da planta, indicando algum grau de toxicidade.

Ainda neste sentido, Marcondes *et al.* (2014), ao avaliar os efeitos do extrato metanólico bruto das cascas do caule de *L. pacari* em linhagens celulares tumorais determinou alta toxicidade medida pelos níveis de lactato desidrogenase e uma queda significativa no índice de proliferação celular após a exposição ao extrato da planta. Além disso, foram identificadas alterações morfológicas, e expressão de anexina V, sugerindo indução de apoptose, esta última confirmada pela parada do ciclo celular G0/G1, ou seja, o ciclo celular não avança para fase de replicação do DNA.

Em contrapartida, Ávila *et al.* (2019), ao realizar testes de toxicidade aguda em camundongos com o extrato hidroalcolico da casca do caule de *L. pacari* não identificou potencial de toxicidade na dose oral única de 2000 mg/kg. Todavia, ao analisar os efeitos com dose oral diária de 400 e 1000 mg/kg, notou-se indução de alterações nos parâmetros bioquímicos dos animais, principalmente nos níveis de transaminases, parâmetros hematológicos e no peso do fígado, concluindo que, desta forma, por não haver conhecimento científico consolidado sobre o potencial toxicológico da planta é necessária cautela em seu uso medicinal, principalmente no uso prolongado e em combinação com outros medicamentos.

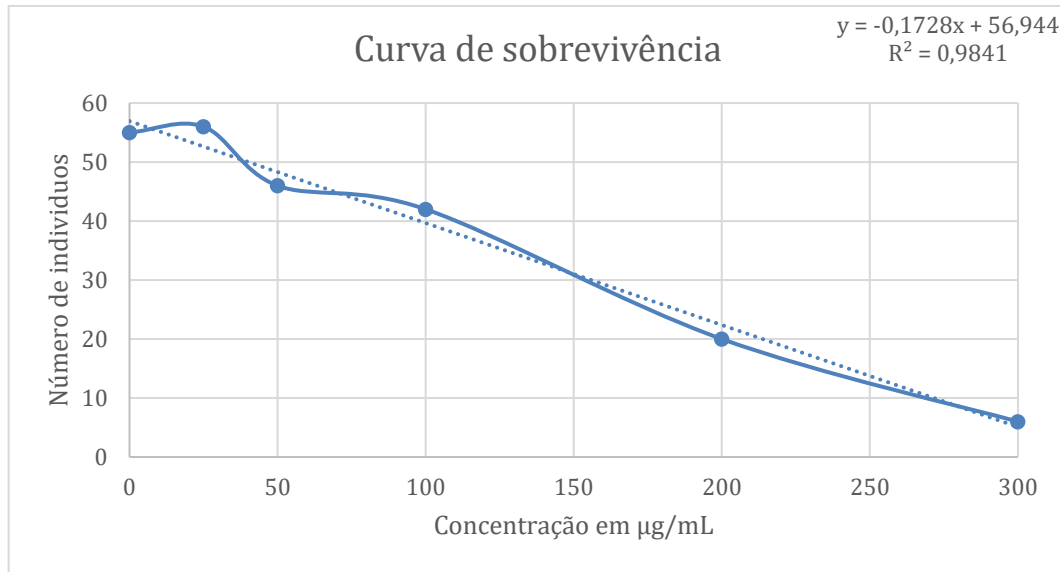
Cabe ressaltar que no gênero *Lafoensia*, os compostos ácidos foram identificados em maior quantidade, e por isso representam o principal fator de atividade biológica da espécie (Firmo *et al.*, 2015). Destacando ainda que, o componente mais citado na literatura é o ácido elágico, sendo relacionado com as principais propriedades da planta, inclusive os efeitos no tratamento de tumores (Nascimento *et al.*, 2011).

## 5.2 Curva de sobrevivência e CL<sub>50</sub>

A curva de sobrevivência foi elaborada utilizando as concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL e 300 µg/mL do extrato bruto de *L. pacari*, além dos grupos controles representados como 0 no eixo X das concentrações. Em números percentuais as taxas de sobrevivência foram de 10%, 33,3%, 70%, 76,7% e 93,3% nas concentrações de 300 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, e 50 µg/mL respectivamente, enquanto nos grupos controles DMSO e E3 ficou em 91,7% até 120 *hpf*.

Desta forma, as concentrações 300 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL causaram uma redução na taxa de sobrevivência de 81,7%, 58,4 %, 21,7% e 15%, respectivamente, comparado aos controles, já 25 µg/mL promoveu incrementos de 1,6% em relação aos controles. Os resultados indicam que quanto maior a concentração do extrato bruto menor é a taxa de sobrevivência. A figura 14 mostra o gráfico de sobrevivência em 120 *hpf*.

**Figura 14** - Avaliação da curva de sobrevivência embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A  $CL_{50}$  é definida por Queiroz (2015), como a concentração de um produto químico no ar ou na água que leva à morte de 50% dos indivíduos num tempo pré-estabelecido, podendo ser estimada aplicando a equação da reta sobre a curva de sobrevivência, dada por:

$$y = ax + b$$

Onde  $y$  é a metade do número de indivíduos testados na análise, ou seja 30, o valor de  $a$  foi dado pela distribuição da curva em 0,1728 e  $b = 56,944$ . Ao isolarmos o  $x$  chegamos na concentração 156 µg/mL sendo está a dose mínima do extrato etanólico bruto de *L. pacari* capaz de provocar uma mortalidade de 50% em embriões de Zebrafish em até 120 hpf.

A determinação da  $CL_{50}$  do extrato etanólico das folhas de *L. pacari* não foi encontrada na literatura, entretanto existe um relato de Ávila *et al.* (2019), que sugere que a DL50 do extrato hidroalcolólico da casca do caule de *L. pacari*, utilizando camundongos como modelo animal estaria entre algo maior que 2000 - 5000 mg/kg. Cabe ressaltar que a diferença da  $CL_{50}$  estimada neste trabalho com o que foi encontrado na literatura pode estar relacionada com o modelo animal, utilizado nos estudos, visto que células embrionárias são mais vulneráveis a perturbações (Paget, 2008), inclusive a toxicidade de substâncias, quando comparada a organismos adultos, os quais já possuem mecanismos de defesa especializados contra substâncias tóxicas.

Desta forma, a determinação da  $CL_{50}$  do extrato etanólico das folhas de *L. pacari* utilizando o modelo de Zebrafish é algo novo na literatura e indica um grande potencial para estudos no desenvolvimento de drogas antitumorais.

### 5.3 Alterações morfológicas

Dentre as alterações morfológicas observadas em Zebrafish, a formação de edema tem sido umas das relatadas em testes de toxicidade, sendo o edema de pericárdio e de saco vitelínico os mais comumente observados como indicador de malformação de desenvolvimento embrionário (Wiegand *et al.*, 2023). Neste trabalho foram observadas alterações como edema de saco vitelínico e edema de pericárdio, sendo que nos grupos controle DMSO e E3 não foram observadas alterações morfológicas nos embriões ou larvas. O edema é uma condição patológica conceituada pelo acúmulo anormal de fluidos no organismo, ocorrendo por uma instabilidade nas barreiras corporais e/ou depuração de fluidos (Cabrera, 2022 apud Wang *et al.*, 2024). A Figura 15 mostra um edema de saco vitelínico.

**Figura 15** - Embrião de Zebrafish apresentando edema de saco vitelínico após exposição ao extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024). A seta azul indica a região com edema de saco.

Em números absolutos foram testados 60 indivíduos para cada concentração, destes 6,7% apresentaram edema de saco na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ , 3,3% em 400  $\mu\text{g/mL}$ , 8,3% em 300  $\mu\text{g/mL}$ , 23,3% em 200  $\mu\text{g/mL}$ , 10% em 100  $\mu\text{g/mL}$  e 3,3 em 50  $\mu\text{g/mL}$  em 120 *hpf*. Nota-se que a alta taxa de mortalidade nas concentrações mais altas faz com que as alterações morfológicas pouco apareçam, diferente de concentrações mais próximas da  $CL_{50}$ , entre 200  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  nas quais é notável um padrão de malformação do saco vitelínico,

chegando a uma taxa de 23,3% e 10% de indivíduos acometidos, respectivamente. A Tabela 2 mostra o número de indivíduos que apresentaram edema durante o desenvolvimento.

**Tabela 2** - Avaliação da formação de edema de saco vitelínico em embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.

<i>hpf</i>	500 µg/mL	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL
24	0	0	2	1	0	0
48	4	0	5	3	1	2
72	4	1	5	13	5	2
96	4	1	5	13	6	2
120	4	2	5	14	6	2

Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: Os dados expressam o total de indivíduos acometidos em uma amostragem total de 60 para cada concentração.

O edema de pericárdio foi observado nas concentrações de 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL apenas, seguindo a mesma tendência de alterações próximas a CL<sub>50</sub> como observado no edema de saco. Em percentuais, foram 6,7% de indivíduos com edema de pericárdio nas concentrações de 200 µg/mL e 50 µg/mL, e 10% na concentração de 100 µg/mL. A Tabela 3 mostra o número de indivíduos que apresentaram edema de pericárdio durante o desenvolvimento.

**Tabela 3** - Avaliação da formação de edema de pericárdio em embriões de Zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.

<i>hpf</i>	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL
48	0	2	4
72	4	2	4
96	4	6	4
120	4	6	4

Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: Os dados expressam o total de indivíduos acometidos em uma amostragem total de 60 para cada concentração.

Na Figura 16 podemos ver o edema de pericárdio presente em uma larva, enquanto na Figura 17 podemos notar a presença de edema de saco e pericárdio no mesmo indivíduo.

**Figura 16** - Larva de Zebrafish apresentando edema de pericárdio após exposição ao extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024). A seta preta indica a região de edema do saco pericárdico.

**Figura 17** - Embrião de Zebrafish apresentando edema de saco vitelínico e pericárdico após exposição ao extrato etanólico de folhas de *L. pacari*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024). Seta azul indica a região com edema de saco e a seta preta região com edema de pericárdio.

Além disso, sabe-se que o edema pode ser uma resposta ligada ao estresse sem nenhum outro mecanismo de base e, dependendo da gravidade, pode se reverter espontaneamente (Brotzmann *et al.*, 2022). O edema de saco e de pericárdico são os dois fenótipos mais documentados devido à capacidade e facilidade com que ambos podem ser medidos e analisados usando microscopia simples. Porém, esses fenótipos frequentemente são considerados inespecíficos, devido à falta de conhecimento sobre como e o que causa suas formações (Narumanchi *et al.*, 2021), podendo estar relacionado à insuficiência renal, insuficiência circulatória, desequilíbrio iônico ou defeitos de permeabilidade (Hill *et al.*, 2004).

Ressalta-se que a ocorrência nos números de indivíduos com edema de saco vitelínico na concentração de 200 µg/mL, pode estar ligada ao potencial do extrato etanólico bruto de *L. pacari*, porém não se sabe os mecanismos que levam a sua formação. Além disso, nas

contrações de 200 µg/mL e 100 µg/mL houve um aumento no número de indivíduos com edema de saco entre 48 e 72 *hpf*, sugerindo que pode existir um efeito acumulativo do extrato que leva a algum mecanismo envolvido na formação do edema.

## **6 CONCLUSÃO**

Conclui-se que, como base nas análises, o extrato bruto etanólico das folhas de *L. pacari* apresenta toxicidade aos embriões de Zebrafish, podendo gerar efeitos de coagulação, alterar a sobrevivência e causar alterações morfológicas como o edema de saco vitelínico. A toxicidade do extrato se mostra como um caminho promissor para os estudos de drogas antitumorais, como já vem sendo relatado em novos estudos utilizando os extratos das cascas do caule de *L. pacari*. Todavia, são necessários novos estudos para determinação fitoquímica das substâncias que estão relacionadas com os efeitos de toxicidade da planta e a continuidade de pesquisas e testes experimentais para melhor entendimento dos efeitos farmacológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, R. I. DE; FERREIRA, C. C.; ALVARENGA, C. B. M.; VIEIRA, M. S.; CORTEZ, A. P.; BATISTA, A. C.; COSTA, E. A.; VALADARES, M. C. Toxicological evaluation of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) stem bark extract: Acute and subchronic studies in mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000217289>. Acesso em: 5 fev. 2025.
- BARBOSA, Daniela Beraldo. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. - Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.
- BROTZMANN, Catarina; ESCHER, Sylvia E.; WALKER, Paul; BRAUNBECK, Thomas. Potential of the Zebrafish (*Danio rerio*) embryo test to discriminate between chemicals of similar molecular structure—a study with valproic acid and 14 of its analogues. **Archives of Toxicology**, v. 96, n. 11, p. 3033–3051, 3 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03340-z>. Acesso em: 5 fev. 2025.
- CAMILLO, Julcélia; BARA, Maria Teresa Freitas; SAMPAIO, Bruno Leite; PAULA, José Realino. *Lafoensia Pacari*: Pacari. In: VIEIRA, Roberto Fontes (ed.); CAMILLO, Julcélia (ed.); CORADIN, Lidio (ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2016, p. 825-834.
- CARNEIRO, Cristiene Costa; SANTOS, Suzana da Costa; LINO JR., Ruy de Souza; BARA, Maria Teresa Freitas; CHAIBUB, Beatriz Abdallah; REIS, Paulo Roberto de Melo; CHAVES, Dwight Assis; SILVA, Antônio Jorge Ribeiro da; SILVA, Luana Santos; SILVA, Daniela de Melo e; CHEN-CHEN, Lee. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 310, p. 1-8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.08.015>. Acesso em: 5 fev. 2025.
- CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. Dedaleiro: *Lafoensia Pacari*. In: CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. v. 1, p. 441-448.
- COLET, C. F.; DAL MOLIN, G. T.; CAVINATTO, A. W.; BAIOTTO, C. S.; OLIVEIRA, K. R. Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 17, n. 2, p. 331-339, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_027](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_027). Acesso em: 15 nov. 2023.
- DAMMSKI, Ana Paula. MULLER, Bruno Roberto; GAYA, Carolina; REGONATO, Daiane. **Zebrafish: Manual de Criação em Biotério**. 1 ed., Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011. 106 p.
- DIAS, Jaqueline Evangelista; LAUREANO, Lourdes Cardozo. **Farmacopeia Popular do Cerrado**. 1 ed., Goiás: Articulação Pacari (Associação Pacari), 2009. 352 p.
- FALCÃO, Maria Alice Pimentel; SOUZA, Lucas Santos de; DOLABELLA, Silvio Santana; GUIMARÃES, Adriana Gibara; WALKER, Cristiani Isabel Banderó. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 35, p. 35015–35026, 24 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3399-7>. Acesso em: 5 fev. 2025.
- FERREIRA, Roberta Costa Santos; RIFFEL, Alessandro; SANT'ANA, Antônio Euzébio Goulart. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1743-1755, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000800023>. Acesso em: 18 jan. 2025.
- FIRMO, Wellyson da Cunha Araújo; MIRANDA, Milena Valadar; OLEA, Roberto Sigfrido Gallegos. Caracterização do “estado da arte” de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae). **Natureza Online**, v. 14, n. 1, p. 13–22, 2016. Disponível em: <https://www.naturezaonline.com.br/revista/article/view/107>. Acesso em: 25 jan. 2025.

FOGLIO, Mary Ann; QUEIROGA, Carmen Lucia; SOUSA, Ilza Maria de Oliveira; RODRIGUES, Rodney Alexandre Ferreira. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar, Divisão de Fitoquímica. **CPOBA/UNICAMP: MultiCiência**, v. 7, p.1-8, 2006.

GALANO, A.; FRANCISCO MARQUEZ, M.; PÉREZ-GONZÁLEZ, A. Ellagic Acid: An Unusually Versatile Protector against Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 5, p. 904–918, 19 maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/tx500065y>. Acesso em: 5 fev. 2025.

GALDINO, Pablinny Moreira. **Lafoensia Pacari A. St. Hil**: Identificação de constituintes ativos e avaliação da atividade antidepressiva. 2015. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

GUIMARÃES, Heloisa Alves; NASCIMENTO, Marcus Vinícius M.; TAVARES, Adriano; GALDINO, Pablinny Moreira; PAULA, José Realino de; COSTA, Elson Alves. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (pacari), in pain and inflammation models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 328–333, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300007>. Acesso em: 3 fev. 2025.

GUNNARSSON, Lina; JAUHAINEN, Alexandra; KRISTIANSSON, Erik; NERMAN, Olle; LARSSON, Joakim. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 15, p. 5807–5813, 1 ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es8005173>. Acesso em: 5 fev. 2025.

HARPER, C.; LAWRENCE, C. The Laboratory Zebrafish. 1 ed. Boca Raton: **CRC Press**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/b13588>. Acesso em: 5 fev. 2025.

HILL, A. J. Water Permeability and TCDD-Induced Edema in Zebrafish Early-Life Stages. **Toxicological Sciences**, v. 78, n. 1, p. 78–87, 21 jan. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh056>. Acesso em: 5 fev. 2025.

ISMAIL, Hassan Fahmi; HASHIM, Zanaria; WONG, Tet Em Breve; RAHMAN, Nur Syukriah Ab; ZAINUDIN, Ain Nabihah; MAJID, Fadzilah Adibah Abdul. Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and Zebrafish embryo. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 4, p. 452–465, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.006>. Acesso em: 15 nov. 2023.

KIMMEL, Charles B.; BALLARD, William W.; KIMMEL, Seth R.; ULLMANN, Bonnie; SCHILLING, Thomas F. Stages of embryonic development of the Zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>. Acesso em: 3 jan. 2025.

LAWRENCE, C. The husbandry of Zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, set. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>. Acesso em: 5 fev. 2025.

LIMA JÚNIOR, Joed Pires de; FRANCO, Rodrigo Rodrigues; SARAIVA, André Lopes; MORAES, Izabela Barbosa; ESPINDOLA, Foued Salmen. *Anacardium humile* St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and  $\alpha$ -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, p. 113667, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113667>. Acesso em: 5 fev. 2025.

LORENZI, Harri. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. 352p.

MACIEL, Maria Aparecida M.; PINTO, Angelo C.; VEIGA Jr., Valdir F.; GRYNBERG, Noema F.; ECHEVARRIA, Aurea. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438. 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/tgsYhzfzBs3pDLQ5MtTnw9c/>. Acesso em: 122 nov. 2023.

MALHEIROS, Rafael Soares Pozzi; SANTANA, Farley Silva; LINHARES NETO, Manoel Viana; MAPELI, Ana Maria; MACHADO, Luciana Lucas. Atividade alelopática de extratos de *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL. sobre *Lactuca sativa* L. e *Zea mays* L. em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Agroecologia**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 185–194, 2014. Disponível em: <https://periodicos.unb.br/index.php/rbagroecologia/article/view/49689>. Acesso em: 1 fev. 2025.

- MARCONDES, Daniela Beck da Silva; REICHERT, Cristiane Loiva; ANDRADE, Lucas Ferrari de; SANTOS, Cid Aimbiré de Moraes; WEFFORT-SANTOS, Almerane Maria. Cytotoxicity and apoptogenic effects of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 243–250, nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.018>. Acesso em: 5 fev. 2025.
- MEIRA, Rita Maria Strozi Alves. **Anatomia foliar e estudos morfológicos em espécies de *Lafoensia Vand. (Lythraceae)* nativas do Brasil**. 2000. 259 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- MENDONÇA, E. A. F.; COELHO, M. F. B.; LUCHESE, M. Teste de tetrazólio em sementes de mangaba-brava (*Lafoensia pacari* St. Hil. - *Lythraceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 33-38, 2006. Disponível em < [https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiradePlantasMediciniais/artigo6\\_v8\\_n2.pdf](https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiradePlantasMediciniais/artigo6_v8_n2.pdf) >. acessos em 06 fev. 2025.
- MONTEIRO, Julio Marcelino; ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino de; ARAÚJO, Elcida de Lima; AMORIM, Elba Lúcia Cavalcanti de. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896. 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/YJDjDfvLBpkkbFXML3GPjdt/?lang=pt>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- NARUMANCHI, Suneeta; WANG, Hong; PERTTUNEN, Sanni; TIKKANEN, Ilkka; LAKKISTO, Päivi; PAAVOLA, Jere. Zebrafish heart failure models. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 20 maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662583>. Acesso em: 5 fev. 2025.
- NASCIMENTO, Marcus Vinícius Mariano; GALDINO, Pablinny Moreira; FLORENTINO, Iziara Ferreira; SAMPAIO, Bruno Leite; VANDERLINDE, Frederico Argollo; PAULA, José Realino de; COSTA, Elson Alves. Antinociceptive effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. independent of anti-inflammatory activity of ellagic acid. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3–4, p. 448–454, 22 jul. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11418-011-0517-y>. Acesso em: 6 fev. 2025.
- NGUYEN, Thu Hang; NGUYEN, Phuc-Dam; QUETIN-LECLERCQ, Joëlle; MULLER, Marc; HUONG, Duong Thi Ly; PHAM, Hai O; KESTEMONT, Patrick. Developmental toxicity of *Clerodendrum cyrtophyllum* turcz ethanol extract in Zebrafish embryo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113538, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113538>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- OECD. (2013) Test No. 236: **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing.
- PAGET, James. Anomalias anatômicas congênitas ou defeitos congênitos humanos. In: MOORE, Keith L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, Mark G. **Embriologia clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.467 - 497.
- PEREIRA, Lucas Olivo Martins; VILEGAS, Wagner; TANGERINA, Marcelo Marucci Pereira; ARUNACHALAM, Karuppusamy; BALOGUN, Sikiru Olaitan; ORLANDI-MATTOS, Paulo Eduardo; COLODEL, Edson Moleta; MARTINS, Domingos Tabajara de Oliveira. *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.: Wound healing activity and mechanism of action of standardized hydroethanolic leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 219, p. 337–350, jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.038>. Acesso em: 5 fev. 2025.
- PINTO, E. DE P. P.; AMOROZO, M. C. DE M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 751–762, dez. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000400001>. Acesso em: 5 fev. 2025.
- QUEIROZ, S. **Tratado de toxicologia ocupacional**. 2. ed. Rio de Janeiro: Biblioteca 24 Horas, 2015. 554 p.
- RIBEIRO, José Felipe; DIAS, Terezinha. Diversidade e conservação da vegetação e da flora. In: RIBEIRO, José Felipe; DIAS, Terezinha. **Biodiversidade do Cerrado e Pantanal: áreas e ações prioritárias para conservação da biodiversidade**. 2ª ed. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2007. p. 21-138.
- RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T. S.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 3, p. 359–366, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000300016> . Acesso em: 5 fev. 2025.

ROGERIO, A. P.; SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L. H. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 4, p. 298–307, out. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.04.005>. Acesso em: 2 fev. 2025.

ROGERIO, Alexandre de Paula. **Estudo da atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Lafoensia Pacari Jaume St. Hilaire (Lythraceae)***. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SAMPAIO, Bruno Leite; BARA, Maria Teresa F.; FERRI, Pedro Henrique; SANTOS, Suzana da Costa; PAULA, José Realino de. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1127–1137, dez. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000177>. Acesso em: 5 fev. 2025.

SANTOS, C. D. Y. A.; SALATINO, L. F. M.; SALATINO, A. Foliar flavonoids of *Lafoensia* (Lythraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 5, p. 487–488, jun. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00087-3](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00087-3). Acesso em: 5 fev. 2025.

SANTOS, Laércio Wanderley dos. **Estudos ecológicos e agrônômicos de *Lafoensia Pacari St. Hil. (Lythraceae)* na região de Barra do Garças-MT**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso; 2006.

SHEN, C.; ZUO, Z. Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 35, p. 43599–43614, 24 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10800-5>. Acesso em: 5 fev. 2025.

SILVA JUNIOR, Iberê F.; RAIMONDI, Marcela; ZACCHINO, Susana; CECHINEL FILHO, Valdir; NOLDIN, Vânia F.; RAO, Vietla S.; LIMA, Joaquim C. S.; MARTINS, Domingos T. O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari A. St.-Hil.*, Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 422–428, jul. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300021>. Acesso em: 5 fev. 2025.

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000200002>. Acesso em: 15 nov. 2023.

SOUZA, Lúcia Kioko Hasimoto e; OLIVEIRA, Cecília Maria Alves de; FERRI, Pedro Henrique; SANTOS, Suzana Costa; OLIVEIRA JÚNIOR, Juldásio Galdino de; MIRANDA, André Thiago Borges; LIÃO, Luciano Moraes; SILVA, Maria do Rosário Rodrigues. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 247-249, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000300012>. Acesso em: 7 nov. 2024.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo; MØLLER, Ian Max; MURPHY, Angus. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 857 p.

TAVARES GONÇALVES, Nylza Maria; CARVALHO VILA, Marta Maria Duarte; GERENUTTI, Marli; CHAVES, Douglas Siqueira de Almeida. Políticas de saúde para a fitoterapia no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, Ciudad de la Habana, v. 18, n. 4, p. 632-637, dez. 2013. Disponível em: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962013000400014&lng=pt&nrm=ison](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400014&lng=pt&nrm=ison). Acesso em: 6 fev. 2025.

VALERIANO, Filipe Rodrigues Valeriano; SAVANI, Fabiana Ramos; SILVA, Maria Rejane Valeriano da. O uso de plantas medicinais e o interesse pelo cultivo comunitário por moradores do bairro São Francisco, município de Pitangui, MG. **Interações**, v. 20, n.3, p. 891-905. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20435/inter.v0i0.1846>. Acesso em: 15 nov. 2023.

VEEREN, Bryan; GHADDAR, Batoul; BRINGART, Matthieu; KHAZAAL, Shaymaa; GONTHIER, Maria Paula; MEILHAC, Olivier; DIOTEL, Nicolas; BASCANDS, Jean-Loup. Phenolic profile of herbal infusion and polyphenol-rich extract from leaves of the medicinal plant *Antirhea borbonica*: toxicity assay determination in Zebrafish embryos and larvae. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25194482>. Acesso em: 10 nov. 2023.

VEIGA JÚNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-28, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>. Acesso em: 15 nov. 2023.

WANG, Luanjin; LIANG, Cixin; ZHENG, Naying; YANG, Chunyan; YAN, Sen; WANG, Xiang; ZUO, Zhenghong; HE, Chengyong. Kidney injury contributes to edema of Zebrafish larvae caused by quantum dots. **Science of The Total Environment**, v. 908, p. 168420, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168420>. Acesso em: 5 fev. 2025.

WIEGAND, Jenna; ÁVILA-BARNARD, Sarah; NEMARUGOMMULA, Charvita; LYONS, David; ZHANG, Sharon; STAPLETON, Heather M.; VOLZ, David C. Triphenyl phosphate-induced pericardial edema in Zebrafish embryos is dependent on the ionic strength of exposure media. **Environment International**, v. 172, p. 107757, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107757>. Acesso em: 5 fev. 2025.

## ANEXO I – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA-UFOB



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA  
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação dos efeitos de teratogenicidade e toxicidade de extratos vegetais no desenvolvimento embrionário do *Danio rerio* (zebrafish)**”, protocolado sob o CEUA nº **0002-2023-1**, sob responsabilidade de **Izabela Barbosa Moraes** e equipe, para fins de pesquisa científica ou ensino, está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste da Bahia (CEUA/UFOB) na reunião de 01/08/2024.

We certify that the proposal entitled “**Evaluation of the effects of teratogenicity and toxicity of plant extracts on the embryonic development of *Danio rerio* (zebrafish)**”, protocol number CEUA No. **0002-2023-1** under the responsibility of **Izabela Barbosa Moraes** and team, for scientific research purposes or teaching, is in accordance with Law 11,794 of October 8, 2008. Decree 6,899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of West Bahia (CEUA/UFOB) in the meeting of 08/01/2023.

**Finalidade da Proposta:** Pesquisa (Acadêmica)

**Vigência da Proposta:** 08/2024 a 07/2026      **Área:** Ciências Biológicas/Morfologia/Embriologia

**Origem:** Animais adultos provenientes de criatórios comerciais do tipo Pet Shop

**Idade:** Adultos entre quatro a 6 meses) embriões de 0 a 96 horas após a fertilização

**Espécie:** *Danio rerio*

**Peso:** 0,400 a 0,600g

**Linhagem:** -

**N:** 80 animais adultos e 9680 embriões

**Sexo:** Animais adultos (40 machos e 40 fêmeas)

**Local do experimento:** Os experimentos serão realizados no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Oeste da Bahia.

**Telefone:** (77) 9 91769199

Barreiras – BA, 05 de Agosto de 2024.

Carolina Carvalho de Souza

**Vice coordenadora da CEUA/UFOB**

Tarcísio Macedo Silva

**Coordenador da CEUA/UFOB**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA  
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E  
CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

---

**CERTIFICADO Nº 20/2024 - CEUA (11.01.10.13)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 14/08/2024 10:28 )*

**CAROLINA CARVALHO DE SOUZA**  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
CCBS (11.01.19.02)  
Matrícula: ###300#3

*(Assinado digitalmente em 12/08/2024 11:31 )*

**TARCISIO MACEDO SILVA**  
MEDICO VETERINARIO  
CCBS (11.01.19.02)  
Matrícula: ###840#3

Visualize o documento original em <https://sig.ufob.edu.br/documentos/> informando seu número: 20, ano: 2024, tipo: **CERTIFICADO**, data de emissão: 12/08/2024 e o código de verificação: **ebc8b076b6**