

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

HUGO SANTIAGO FRANCISCO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO PADRONIZADO EM
PSORALENO E BERGAPTENO A PARTIR DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII*
TRÉCUL. USANDO OS ESTÁGIOS EMBRIO-LARVAIS DE ZEBRAFISH (*Danio
rerio*).**

Goiânia
2020

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC nº 1204/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG):

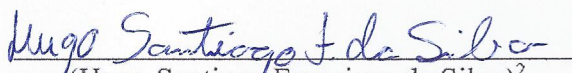
Nome completo do autor: Hugo Santiago Francisco da Silva

Título do trabalho: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO PADRONIZADO EM PSORALENO E BERGAPTENO A PARTIR DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* TRÉCUL. USANDO OS ESTÁGIOS EMBRIO-LARVAIS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*).

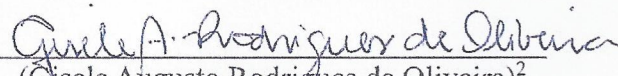
2. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF do TCCG.


(Hugo Santiago Francisco da Silva)²

Ciente e de acordo:


(Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira)²

Data: 16 / 07 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Versão janeiro de 2020

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

HUGO SANTIAGO FRANCISCO DA SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO PADRONIZADO EM PSORALENO E BERGAPTENO A PARTIR DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* TRÉCUL. USANDO OS ESTÁGIOS EMBRIO-LARVAIS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa^a Dra^a Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Goiânia
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

FRANCISCO SILVA, HUGO SANTIAGO
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO
PADRONIZADO EM PSORALENO E BERGAPTENO A PARTIR DE
BROSIMUM GAUDICHAUDII TRÉCUL. USANDO OS ESTÁGIOS
EMBRIO-LARVAIS DE ZEBRAFISH (Danio rerio). [manuscrito] /
HUGO SANTIAGO FRANCISCO SILVA. - 2020.
XXXIII, 33 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira .
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia,
2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Brosimum gaudichaudii. 2. Métodos alternativos. 3.
Mortalidade. 4. Malformações. I. Augusto Rodrigues de Oliveira , Gisele
, orient. II. Título.

CDU 615



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

HUGO SANTIAGO FRANCISCO DA SIVA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO PADRONIZADO EM
PSORALENO E BERGAPTENO A PARTIR DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII*
TRÉCUL. USANDO OS ESTÁGIOS EMBRIO-LARVAIS DE ZEBRAFISH (*Danio
rerio*).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal
de Goiás para a obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia

Data da aprovação: 16/07/2020

Membros da Banca:

Gisele A. Rodrigues de Oliveira
Profa^a Dra^a Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira
Orientadora
Universidade Federal de Goiás

Gloria Narjara Santos da Silva
Profa^a Dra^a Glória Narjara Santos da Silva
Universidade Federal de Goiás

Gessyca Gonçalves Costa
Ms. Gessyca Gonçalves Costa
Universidade Federal de Goiás

Dedico este trabalho a minha mãe Maria Aparecida Francisco da Silva e ao meu irmão Antônio Kairo Francisco da Silva, que em memória, sempre me deram forças para que eu pudesse buscar a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, em especial, a minha avó Doracina Lazara de Jesus, que não mediu esforços para me apoiar e me ajudar a realizar meus objetivos e que sempre me incentivou a buscar o conhecimento.

À Universidade Federal de Goiás, que abriu portas e me proporcionou grandes oportunidades bem como a possibilidade de realizar esse trabalho, lugar onde foi minha segunda casa durante anos.

Aos servidores da Faculdade de Farmácia, professores, técnico administrativo e de serviços gerais, pois todos desenvolvem um importante papel e fazem seu trabalho com muito carinho e dedicação e isso possibilitou o desenvolvimento do meu trabalho.

À professora Dra^a Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira, que proporcionou a oportunidade de realizar esse trabalho em seu laboratório de pesquisa e se propôs a me orientar, mesmo com todas as limitações que encontramos na época, foi sempre muito sensível as minhas necessidades e me forneceu muito apoio.

Ao professor Dr. Edemilson Cardoso da Conceição e a Dra^a Mariana Cristina de Moraes, que em parceria nos forneceram materiais para a realização desse estudo, bem como apoio e informações que foram de suma importância.

À Doutoranda Laís de Brito Rodrigues, que me ajudou e me orientou durante a realização do presente estudo, dedicou parte do seu tempo para me capacitar durante a realização dos testes e com a reprodução dos peixes.

Aos meus amigos Amanda Cardoso da Silva, Andressa Lanuce Silva Dias, Andressa Tuane Santana Paz, Bruna Rabello Hajjar, Cairo Domingos Júlio, Carlos Eduardo Félix da Silva, Danillo Luiz dos Santos, Francieudes Pereira do Nascimento, Hellen Dorneles de Deus, Jeferson Alves Lourenço, Jéssica Alves Rodrigues, Kaio Fagundes de Lima, Letícia Ribeiro Mariano, Lorraine Siqueira Chaves Bernades, Luan de Souza Bezerra, Luziano Pereira Dutra Neto, Marcos Antônio Ferreira Filho, Matheus Cirqueira Mesquita, Natália Alves Pires de Campos, Paulo Henrique Gomes de Almeida, Vitória Campos Wester Danillo Oliveira Maciel e a todos (as) que sempre estiveram ao meu lado e que me deram força e apoio, que me proporcionaram momentos incríveis, que alegravam meus dias e partilhavam conhecimentos e que sempre me deram bons conselhos e me ajudaram nas dificuldades enfrentadas diariamente, todos em suas particularidades foram importantes para que eu conseguisse realizar esse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Composto-teste:.....	14
2.1.2 Preparo das soluções:	14
2.2 Método.....	14
2.2.1 Ensaio de toxicidade aguda com embriões e larvas de zebrafish	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONCLUSÃO	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Estrutura química das furanocumarinas. A figura (1) apresenta a estrutura química do psoraleno e a figura (2) apresenta a estrutura química do bergapteno moléculas que possuem capacidade fotossensibilizantes, sendo responsáveis pelo efeito de repigmentação da pele.12

FIGURA 2. Taxa de mortalidade dos embriões e das larvas de zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato padronizado de *B. gaudichaudii* durante 96 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições e desvio padrão. 16

FIGURA 3. Malformações em embriões e larvas de zebrafish após 24, 48 e 72 horas de exposição ao extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul e seus respectivos controles negativos (CN). 1= embrião exposto ao controle negativo após 24h, 2= embrião exposto ao controle negativo após 48h, 3= larva exposta ao controle negativo após 72h, 4= larva exposta ao controle negativo após 92h, A= embrião exposto a 0,011 µg/mL do extrato após 24h, B = embrião exposto a 0,011 µg/mL do extrato após 48h, C e D = embrião exposto a 0,011 µg/mL do extrato após 72h, sem eclodir. Efeitos indicados pela seta vermelha: P = inibição pigmentação do corpo; EP = edema de pericárdio; ES = edema de saco vitelínico; C = não desprendimento da cauda.18

LISTA DE TABELAS

TABELA I. Concentração letal média (CL₅₀) e os respectivos intervalos de confiança (IC) após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição dos embriões e das larvas de zebrafish ao extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul.17

TABELA II. Concentração de efeito média (CE₅₀) e os respectivos intervalos de confiança (IC) após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição dos embriões e larvas de zebrafish ao extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul.17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALD	Dose letal aproximada
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>B.</i>	<i>Brosmium</i>
CA	Califórnia
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CL ₅₀	Concentração letal média
CN	Controle negativo
DL ₅₀	Dose letal mediana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EU	European Union
<i>FET</i>	<i>Fish Embryo Acute Toxicity</i>
FF	Faculdade de Farmácia
h	Horas
hpf	Horas de pós-fertilização
IC	Intervalos de confiança
LED	Light-emitting diode
LPD&I	Laboratório de Pesquisa Desenvolvimento e Inovação
MEL	Laser excimer e excimer monocromático
MF	Medicamentos fitoterápicos
NB-UVB	Narrow Band–Radiação ultravioleta B
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
pH	Potencial hidrogeniônico
PTF	Produtos tradicionais fitoterápicos
PUVA	Psoraleno mais radiação ultravioleta A.
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
UFG	Universidade Federal de Goiás
USA	Estados Unidos da América
UV	Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A.

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO PADRONIZADO EM PSORALENO E BERGAPTENO A PARTIR DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* TRÉCUL. USANDO OS ESTÁGIOS EMBRIO-LARVAIS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*).

Hugo Santiago Francisco da Silva^{1*}, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira², Laís de Brito Rodrigues³, Mariana Cristina de Moraes⁴, Edemilson Cardoso da Conceição⁵.

RESUMO

Brosimum gaudichaudii Trécul. é uma planta da família *Moraceae*, encontrada frequentemente nos cerrados dos estados de Goiás, São Paulo e Mato Grosso, que contém furanocumarinas, principalmente, psoraleno e bergapteno, responsáveis pela repigmentação da pele, por isso, pode ser utilizada no tratamento de doença cutânea, como o vitiligo. Os medicamentos fitoterápicos devem passar por estudos toxicológicos com o intuito de comprovar a segurança desses medicamentos. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos agudos (letais e subletais) do extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul. sobre o desenvolvimento embrio-larval de zebrafish. Para tanto, foi realizado o teste de toxicidade aguda com embriões e larvas de zebrafish - *Fish Embryo Toxicity Test* (OECD 236, 2013). Foram expostos 20 ovos em triplicata independentes, para cada concentração do extrato e do controle negativo (água do sistema de manutenção). O perfil de toxicidade do extrato foi tempo-dependente e concentração-dependente e os efeitos subletais observados foram: edema de pericárdio, edema de saco vitelínico, falta de pigmentação corporal e inibição da eclosão. Portanto, foi possível concluir que o extrato é embriotóxico para zebrafish, com efeitos letais significativos a partir da concentração 0,005 µg/mL em 72 horas de exposição, além de malformações relevantes durante todo o período de exposição.

PALAVRAS CHAVE: *Brosimum gaudichaudii*, Métodos alternativos, Mortalidade, Malformações.

*¹Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás – Rua 259, Quadra 95, Lote 06, Setor leste universitário, Goiânia, GO.hugosanttyago@gmail.com

² Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás

³ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás

⁴ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás

⁵ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO PADRONIZADO EM PSORALENO E BERGAPTENO A PARTIR DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* TRÉCUL. USANDO OS ESTÁGIOS EMBRIO-LARVAIS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*).

Hugo Santiago Francisco da Silva^{1*}, Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira², Laís de Brito Rodrigues³, Mariana Cristina de Moraes⁴, Edemilson Cardoso da Conceição⁵.

ABSTRACT

Brosimum gaudichaudii Trécul. is a plant of the *Moraceae* family, often found in the savannahs of the states of Goiás, São Paulo and Mato Grosso, which contains furanocoumarins, mainly psoralen and bergaptene, responsible for skin repigmentation, so it can be used in the treatment of skin disease, like vitiligo. Herbal medicines must undergo toxicological studies in order to prove the safety of these medicines. This study aimed to evaluate the acute toxic effects (lethal and sublethal) of the standardized extract in psoralen and bergaptene from *B. gaudichaudii* Trécul. on the embryo-larval development of zebrafish. For this purpose, the acute toxicity test was performed with embryos and zebrafish larvae - *Fish Embryo Toxicity Test* (OECD 236, 2013). Twenty independent eggs were exposed in triplicate for each concentration of the extract and negative control (water from the maintenance system). The toxicity profile of the extract was time-dependent and concentration-dependent and the sublethal effects observed were: pericardial edema, yolk sac edema, lack of body pigmentation and inhibition of hatching. Therefore, it was possible to conclude that the extract is embryotoxic for zebrafish, with significant lethal effects from the concentration 0.005 µg / mL in 72 hours of exposure, in addition to relevant malformations throughout the period of exposure.

KEYWORDS: *Brosimum gaudichaudii*, Alternative methods, Mortality, Malformations.

*¹Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás – Rua 259, Quadra 95, Lote 06, Setor leste universitário, Goiânia Go.hugosantyaogo@gmail.com

² Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás

³ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás

⁴ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás

⁵ Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais correspondem à prática terapêutica mais antiga empregada pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos, ou seja, a utilização delas na prevenção e ou na cura de doenças é um hábito que sempre existiu na história da humanidade (Moraes; Santana, 2001). Planta medicinal é toda planta que administrada ao ser humano, por qualquer via ou forma farmacêutica, pode proporcionar alguma ação terapêutica. O tratamento à base de plantas medicinais é chamado de fitoterapia, e os fitoterápicos são os medicamentos produzidos a partir dessas plantas. Dessa forma, a fitoterapia é caracterizada pelo tratamento com o uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de princípios ativos isolados (Lopes et al., 2008).

Nota-se que existe uma crescente utilização de fitoterápicos pela população brasileira. Alguns fatores podem explicar este aumento, como: os avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e com eficácia comprovada e a crescente tendência da busca, pela população, por terapias menos agressivas, com menor preço e menos efeitos adversos, destinadas ao atendimento primário à saúde (Yunes, 2001). A comprovação da ação terapêutica também favorece essa dinâmica. Além disso, registra-se a insatisfação da população perante o sistema de saúde oficial e também a necessidade de controlar seu próprio corpo e recuperar sua saúde, assumindo as práticas de saúde para si ou para sua família (Tomazzoni, *et al.*, 2006).

Com o aumento da utilização de fitoterápicos, as indústrias farmacêuticas e os laboratórios de pesquisa têm ampliado o desenvolvimento de produtos nesse seguimento, gerando uma grande preocupação quanto à garantia de qualidade e segurança desses produtos. Para que essas empresas consigam comercializar um produto de origem vegetal, é de suma importância realizar estudos que possam fornecer informações necessárias para a comprovação da sua estabilidade, eficácia e segurança, garantindo aos órgãos regulatórios, que ele não apresente perigo ao grupo de interesse para sua utilização (Migliato *et al.*, 2006).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos 20 anos. A primeira legislação que regulamentou os fitoterápicos surgiu em 1967 e após 1995 foram publicados cinco documentos que modificam o registro de fitoterápicos no Brasil, são eles: Portaria SVS/MS nº 6, de 31 de janeiro de 1995; RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000; RDC nº 48, de 16 de março de 2004; RDC nº 14, de 31 de março de 2010, e a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, atualmente em vigor (Oshiro *et al.*, 2016). A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 foi aprovada no dia 13 de maio de 2014 e dispõe sobre o registro de

medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Esta Resolução se aplica a produtos industrializados que se enquadram nas categorias de medicamentos fitoterápicos (MF) e produtos tradicionais fitoterápicos (PTF).

São considerados MF os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (Anvisa, 2014). Além disso, incluiu o acompanhamento pós-registro dos fitoterápicos, evidenciando a necessidade de notificação no sistema de farmacovigilância, regulamentado pela RDC nº 4, de 13 de maio de 2009, que trouxe em seu escopo o Guia de Farmacovigilância para Detentores de Registro de Medicamentos (Oshiro *et al.*, 2016).

Grande parte das plantas da flora brasileira com potencial terapêutico ainda permanece não estudada e, desse modo, seus princípios ativos, suas atividades farmacológicas e os dados toxicológicos mantêm-se desconhecidos. Esse fato causa grande preocupação, visto que as intoxicações são casos de saúde pública. (Bednarczuk, *et al.* 2010). Ainda hoje muitas espécies são utilizadas sem que haja estudos toxicológicos. Diante do conhecimento popular no qual a planta, por apresentar origem natural, tem-se a ideia de que não causa riscos à saúde, reforça ainda mais a necessidade de informações quanto a segurança desses produtos de origem vegetal. (Bednarczuk, *et al.*, 2010). Como várias espécies botânicas podem apresentar efeitos tóxicos, a determinação da toxicidade de medicamentos fitoterápicos faz-se necessária para garantir a segurança do usuário (Lapa *et al.*, 1983).

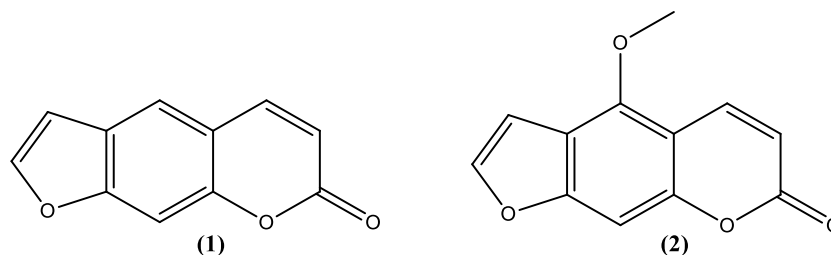
Os estudos toxicológicos apresentam como principal objetivo o prognóstico dos possíveis efeitos tóxicos, que podem se manifestar quando ocorre a exposição humana a uma determinada substância química, seja ela um medicamento, um praguicida, um agente químico um produto de origem vegetal, industrial ou outros (Stephens *et al.*, 2001).

A *Brosimum gaudichaudii* Trécul. é uma planta da família *Moraceae*, encontrada frequentemente nos cerrados dos estados de Goiás, São Paulo e Mato Grosso, conhecida popularmente por “mamica de cadela”, “mama-cadela” ou “algodão” (Steiner *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2015). Várias espécies do gênero *Brosimum* são frequentemente encontradas na região amazônica, mas também podem ser encontradas em outros tipos de vegetação. A *B. gaudichaudii* Trécul. é a única espécie do gênero, comumente encontrada na vegetação do cerrado. Essa espécie tem sido muito utilizada na pesquisa e pela indústria farmacêutica por apresentar uma alta concentração de psoralenos na raiz, podendo representar até 3% do peso total (Palhares *et al.*, 2007).

As raízes de *B. gaudichaudii* Trécul. é a parte da planta mais utilizada para extração de

compostos secundários em relação as outras partes da planta, pois nesta parte do vegetal é que está a maior concentração das furanocumarinas lineares, o psoraleno (1) e o bergapteno (2) (Pozetti, 2005). As furanocumarinas lineares pertencem a um subgrupo das cumarinas, com estrutura basicamente constituída pela condensação do anel furânico ao núcleo cumarínico e a posição onde ocorre a condensação determina se a furanocumarina é angular ou linear (Ribeiro; Kaplan, 2002). Essas furanocumarinas, principalmente, psoraleno (1) e bergapteno (2), possuem capacidade fotossensibilizante, sendo responsáveis pelo efeito da repigmentação da pele, fato que explica o seu emprego na medicina popular no combate ao vitiligo (Lourenço, 2001; Leão *et al.*, 2005).

FIGURA 1. Estrutura química das furanocumarinas. A figura (1) apresenta a estrutura química do psoraleno e a figura (2) apresenta a estrutura química do bergapteno moléculas que possuem capacidade fotossensibilizantes, sendo responsáveis pelo efeito de repigmentação da pele.



Fonte: Desenhadas no programa ChemDraw pelo próprio autor.

O vitiligo é um achado dermatológico relativamente comum, observado desde a Antiguidade. Apresenta-se como uma doença cutânea adquirida, idiopática, caracterizada por máculas branco-nacaradas de diferentes formas e tamanhos, com tendência a aumentar centrifugamente de tamanho, tornando o seu diagnóstico fundamentalmente clínico. Essa dermatose apresenta frequência variável de 0,38% a 2,9% da população mundial e se diversifica conforme a região estudada. A média de idade de início da doença é em torno do 20 até 30 anos e adultos e crianças dos dois gêneros são igualmente afetados (Nunes *et al.*, 2011).

Os principais fatores que desencadeiam o vitiligo são: deficiência nutricional, estresse emocional, trauma, drogas de abuso, infecções, exposição ao sol e a produtos químicos, seps e toxinas. Todos eles são citados na história natural da doença, mas é difícil definir precisamente qual deles têm o possível papel preponderante na sua patogênese (Nunes *et al.*, 2011).

Até o momento, não se tem a cura completa ou tratamento totalmente eficaz para as áreas onde ocorrem o desaparecimento dos melanócitos, mas alguns métodos terapêuticos têm sido utilizados para reduzir progressivamente as áreas despigmentadas, incluindo intervenções farmacológicas como, corticosteroides tópicos e imunomoduladores, além de várias formas de

fototerapia, sendo elas: ultravioleta A, ultravioleta B de banda estreita e larga (NB-UVB, BB-UVB), psoraleno e UVA (PUVA), laser excimer e excimer monocromático (MEL) e procedimentos cirúrgicos, como enxerto, transplante de melanócitos, dermoabrasão, micropigmentação (Whitton *et al.*, 2015).

Os estágios embrio-larvais do zebrafish (*Danio rerio*) têm atraído à atenção de toxicologistas como organismos modelo para estudos da segurança de substâncias químicas (Chen *et al.*, 2014), devido à similaridade genética em torno de 70% com os humanos, o que facilita a extrapolação de resultados (Howe *et al.*, 2013). Além disso, outro motivo de destaque do zebrafish nas pesquisas toxicológicas é que a atual legislação Europeia (EU Directive 2010/63/EU) sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos considera que os estágios iniciais do desenvolvimento do zebrafish não precisam de proteção, uma vez que embriões e larvas que não alcançaram a alimentação exógena, não são considerados animais e, portanto, não exigem regulamentação (Directive, 2010/63/EU; Scholz *et al.*, 2008).

A utilização dos embriões de zebrafish é uma forma alternativa ao uso dos peixes adultos em testes de toxicidade, isso proporciona o benefício de reduzir o conflito ético de causar sofrimento aos animais, além das vantagens de se utilizar um organismo que possuem respostas mais sensíveis e rápidas quando comparadas com os peixes adultos (Nagel, 2002). O zebrafish é um modelo que correlaciona as características dos testes *in vitro* com as vantagens dos testes *in vivo*, já que possui uma maior praticidade, menor custo e resultados mais rápidos, que são condizentes com os testes *in vitro*, mas com a complexidade de um organismo inteiro, que possui metabolismo próprio e correlação entre diferentes células e tecidos, sendo possível avaliar toxicidade no desenvolvimento embrionário (Truong *et al.*, 2011), tornando-o um modelo alternativo à experimentação animal.

Algumas outras características têm contribuído para a popularidade do zebrafish entre a comunidade científica internacional como modelo experimental, são elas: o tamanho pequeno, a facilidade de manutenção em laboratório e de produção de grande número de embriões, que se desenvolvem fora do útero materno; a transparência dos ovos e larvas, que possibilita acompanhar o desenvolvimento do peixe e observar a presença de malformações (Scholz *et al.*, 2008) e o genoma completamente sequenciado (Howe *et al.*, 2013). Todas essas características fornecem uma posição privilegiada do zebrafish na avaliação da eficácia e segurança de medicamentos.

Neste contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos agudos (letais e subletais) do extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul. sobre o desenvolvimento embrio-larval de zebrafish, como parte de uma triagem toxicológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os ensaios foram conduzidos com o extrato de *B. gaudichauui* como descrito a seguir.

2.1.1 Composto-teste:

O extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir da planta de *B. gaudichaudii* Trécul, seguindo a 5ª edição da farmacopeia brasileira, foi gentilmente fornecido pelo prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição do Laboratório de Pesquisa Desenvolvimento e Inovação - LPD&I da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (FF/UFG). A planta foi coletada na cidade Jussara, Goiás, Brasil. A espécie foi devidamente identificada e o seu voucher foi depositado no Herbário da UFG com o número de inscrição 45.517. O extrato foi extraído por meio de percolação das raízes de *B. gaudichauui*, que foram pulverizadas e adicionadas a uma solução hidroalcolica a 55%. O processo de percolação ocorreu repetidas vezes de maneira a esgotar todo o conteúdo de psoraleno e bergapteno existente. O produto da extração foi concentrado, utilizando ventoinhas de modo evaporar todo o solvente.

2.1.2 Preparo das soluções:

Todas as soluções estoques do extrato de *B. gaudichauui* foram preparadas com água deionizada e as soluções de uso foram preparadas com água do sistema de manutenção dos peixes adultos no momento da realização dos testes.

2.2 Método

2.2.1 Ensaio de toxicidade aguda com embriões e larvas de zebrafish

Os peixes adultos machos e fêmeas de zebrafish (comitê de ética aprovado- Protocolo UFG No. 102/14) foram mantidos em um sistema de recirculação de água *Hydrus* (Alesco, Brasil). A água que preenche os aquários é obtida por um sistema de osmose reversa e, que passa por vários níveis de filtração, desde filtros físicos, de carbono ativado (químico) até filtro biológico (bioballs e cerâmica) e, por último, é esterilizada por luz UV. Os parâmetros de qualidade da água como pH ($7,2 \pm 0,2$), condutividade ($0,8 \pm 0,2$ mS) e temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) foram regulados automaticamente pelo sistema. Os níveis de amônia e nitrito foram avaliados quinzenalmente através de kits (Labcom Test). Os peixes foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12:12h e alimentados com ração comercial (ColorBits®) e organismo vivo *Artemia salina*.

Para aquisição dos ovos, no dia anterior a desova, peixes machos e fêmeas na proporção de 2:1, foram colocados para acasalar na presença de bolas de vidro, como forma de proteção para que os peixes adultos não se alimentassem do próprio ovo. O acasalamento foi iniciado após a iluminação súbita do aquário na manhã seguinte e após 30 minutos da desova, os ovos

foram coletados e analisados em estereomicroscópio (STMPRO-T, Bel Photonics do Brasil LTDA), descartando-se os ovos não fertilizados e fazendo a seleção dos que alcançaram o estágio de blástula.

O teste de toxicidade com embriões e larvas de zebrafish foi realizado de acordo com a OECD 236 (2013) - *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test*. Em placas de 24 poços, foram distribuídos um embrião por poço, expostos a 2 mL de cada concentração do extrato padronizado e dos controles negativo (água do sistema de manutenção) por 96 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e cada réplica foi constituída por 24 embriões para o controle negativo (CN) e 20 embriões para cada concentração do extrato padronizado, com 4 embriões para o controle interno da placa. Os embriões foram expostos a 5 concentrações do extrato (0,044 µg/mL, 0,022 µg/mL, 0,011 µg/mL, 0,005 µg/mL, 0,002 µg/mL), determinadas com base no seu limite de solubilidade em água e grau de viscosidade.

A maior concentração testada foi 1000 vezes inferior à concentração usada na formulação do medicamento para o tratamento do vitiligo, que é de 44 µg/mL, em cada comprimido. As placas foram incubadas em estufa a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12:12-h claro/escuro. As análises dos parâmetros letais e subletais foram realizadas em 24, 48, 72, 96 horas de pós-fertilização (hpf) com auxílio de um estereomicroscópio (Carl Zeiss Stemi 2000-C).

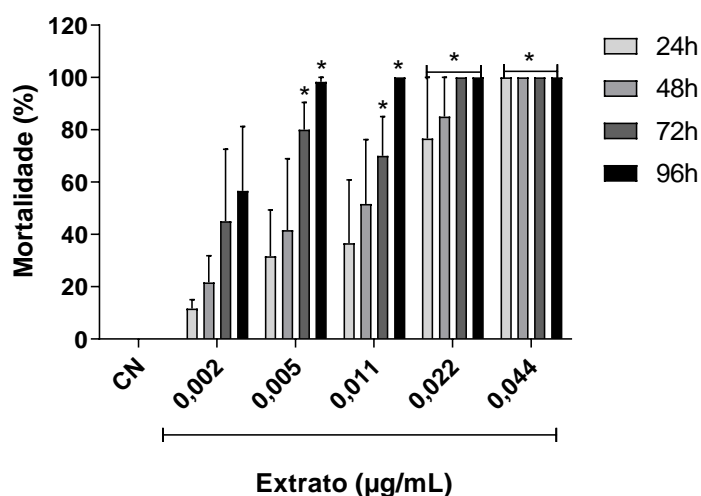
A mortalidade foi identificada por coagulação dos embriões, irregularidades na formação dos somitos, a incapacidade de eclosão e perda de batimentos cardíacos. Já os indicadores de subletalidade incluíram, as malformações de embriões e larvas definidas por alterações no saco vitelínico defeitos na inflação da bexiga natatória, edemas no pericárdico e no saco vitelino, deformações esqueléticas e irregularidade no desenvolvimento da pigmentação. Imagens dos embriões e larvas de zebrafish em diferentes tempos de pós-fertilização foram capturadas por uma câmera digital acoplada ao estereomicroscópio (Carl Zeiss Stemi 2000-C). Durante o período avaliado foi feita a distinção entre a evolução normal e anormal dos embriões e larvas como descrita por Kimmel e colaboradores (1995) e Nagel (2002).

Os resultados foram estatisticamente avaliados por ANOVA e pelo teste de Dunnett ($\alpha=0,05$), utilizando o software GraphPad Prism 5.0[®] (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os valores de concentração letal média (CL₅₀) e concentração efetiva média (CE₅₀) foram calculados utilizando o software GraphPad Prism 5.0[®] (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta os efeitos letais induzidos pelo extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul. sobre embriões e larvas de zebrafish durante 96 h de exposição.

FIGURA 2. Taxa de mortalidade dos embriões e das larvas de zebrafish expostos a diferentes concentrações do extrato padronizado de *B. gaudichaudii* durante 96 horas de exposição. Os resultados são expressos como média de três repetições e desvio padrão.



Como pode ser observado, o extrato avaliado apresentou mortalidade significativa a partir da concentração 0,005 µg/mL em 72 horas de exposição. A maior concentração testada (0,044 µg/mL) causou 100% de mortalidade dos organismos expostos, a partir de 24h de exposição. O efeito letal induzido pelo extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul. foi concentração-dependente, havendo um aumento da porcentagem da mortalidade à medida que se tem um aumento da concentração, exceto na concentração 0,011 µg/mL em 72h, já que comparado à concentração inferior (0,005 µg/mL) houve redução da mortalidade.

O efeito letal também se apresentou de forma tempo-dependente, ou seja, à medida que se aumenta o tempo de exposição ao extrato, tem-se um aumento da mortalidade significativa dos embriões e larvas de zebrafish. Além disso, é possível observar que após 96 horas de exposição não há qualquer sobrevivência dos organismos expostos a partir da 0,005 µg/mL. Este fato é confirmado com valores de CL₅₀ do extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul. durante 96 horas de exposição dos embriões e das larvas de zebrafish (Tabela I).

TABELA I. Concentração letal média (CL₅₀) e os respectivos intervalos de confiança (IC) após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição dos embriões e das larvas de zebrafish ao extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul.

Tempo de exposição	CL ₅₀ -24h (IC) µg/mL	CL ₅₀ -48h (IC) µg/mL	CL ₅₀ -72h (IC) µg/mL	CL ₅₀ -96h (IC) µg/mL
Extrato padronizado de <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul.	0,010 (0,006 - 0,017)	0,007 (0,003 - 0,015)	0,002 (0,001 - 0,005)	-

(-) Não foi possível determinar a CL₅₀-96h porque todos os embriões ou larvas estavam mortos.

A Tabela II apresenta alguns efeitos subletais (malformações) induzidos pelo extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul. sobre embriões e larvas de zebrafish durante 96 hpf.

TABELA II. Concentração de efeito média (CE₅₀) e os respectivos intervalos de confiança (IC) após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição dos embriões e larvas de zebrafish ao extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul.

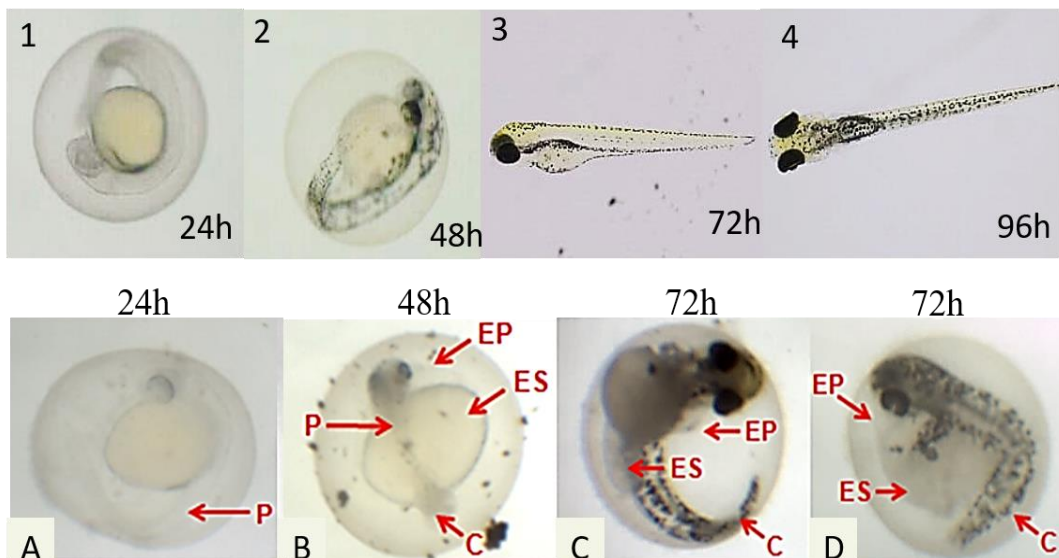
Efeitos subletais	CE ₅₀ -24h (IC) µg/mL	CE ₅₀ -48h (IC) µg/mL	CE ₅₀ -72h (IC) µg/mL	CE ₅₀ -96h (IC) µg/mL
Inibição da Eclosão	#	#	0,007 (0,001 - 0,034)	-
Edema de pericárdio	0,0006 (0,0001- 0,02)	0,0005 (0,0001- 0,03)	0,002 (0,0004 - 0,015)	-
Edema de saco vitelínico	0,0006 (0,0001- 0,02)	0,016 (0,002 - 0,10)	0,003 (0,0005 - 0,03)	-
Ausência de pigmentação do corpo	0,0004 (0,0004 - 0,04)	0,0009 (0,0004 - 0,02)	0,002 (0,0004 - 0,01)	-
Ausência de pigmentação do olho	0,27 (0,03 -2,6)	0,26 (0,03 - 2,3)	0,032 (0,006 - 0,16)	-
Acúmulo de hemácias	0,57 (0,007- 49,10)	0,57 (0,007 - 49,10)	0,02 (0,005 - 0,12)	-

(-) Não foi possível determinar a CE₅₀-96h porque todos os embriões ou larvas estavam mortos.

(#) Não há eclosões durante esse período, a menos que essas eclosões estejam adiantadas.

O extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul ocasionou efeitos subletais em embriões e larvas de zebrafish, que incluem: edema de pericárdio ($CE_{50-72h} = 0,002\mu\text{g/mL}$), edema de saco vitelínico ($CE_{50-72h} = 0,003\mu\text{g/mL}$), falta de pigmentação corporal ($CE_{50-72h} = 0,002\mu\text{g/mL}$) e inibição da taxa de eclosão com valor de CE_{50-72h} de $0,007\mu\text{g/mL}$ ($0,001 - 0,034$). A maioria dos efeitos subletais foram tempo-dependente com exceção dos edemas de pericárdio e saco vitelínico e pigmentação do corpo, que podem ter sido minimizados com o aumento do tempo de exposição (edemas) ou estar relacionado a um atraso no desenvolvimento do organismo, como no caso da pigmentação corporal. Esses efeitos podem ser observados na Figura 3.

FIGURA 3. Malformações em embriões e larvas de zebrafish após 24, 48 e 72 horas de exposição ao extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul e seus respectivos controles negativos (CN). 1= embrião exposto ao controle negativo após 24h, 2= embrião exposto ao controle negativo após 48h, 3= larva exposta ao controle negativo após 72h, 4= larva exposta ao controle negativo após 96h, A= embrião exposto a $0,011 \mu\text{g/mL}$ do extrato após 24h, B = embrião exposto a $0,011 \mu\text{g/mL}$ do extrato após 48h, C e D = embrião exposto a $0,011 \mu\text{g/mL}$ do extrato após 72h, sem eclodir. Efeitos indicados pela seta vermelha: P = inibição pigmentação do corpo; EP = edema de pericárdio; ES = edema de saco vitelínico; C = não despreendimento da cauda.



O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e o emprego de novos produtos terapêuticos originários de plantas têm alcançado estudos que englobam desde conhecimentos culturais até pesquisas científicas, com o intuito de que seja corretamente identificada e caracterizada a natureza dos princípios ativos (Migliato *et al.*, 2006).

Cunha et al., (2008), avaliaram a toxicidade aguda do extrato de raízes de *B. gaudichaudii* Trécul. em camundongos e determinaram a dose letal aproximada e a dose letal mediana. Os autores observaram que a administração oral do extrato da raiz de *B. gaudichaudii* Trécul. induziu animais à morte, proporcionalmente às doses que foram administradas. A dose letal pela exposição de via oral aproximada foi de 3750 mg/kg e, por via intraperitoneal de 2900 mg/kg. Foram determinados logaritmos e probits para cada dose, com o objetivo de calcular a dose letal mediana (DL₅₀), que resultou em 3517,54 mg/kg (IC 95% 3094,25 - 3998,74 mg/kg). Por via intraperitoneal, a DL₅₀ foi calculada pelo mesmo procedimento, produzindo um valor de 2871,76 mg/kg (IC 95% 2389,69 - 3451,07 mg/kg). As mortes ocorreram do período de 24 horas até 5 dias após a administração. As doses mais altas levaram à letalidade em um período muito menor de tempo.

Até o momento, esse é o único estudo de efeitos agudos do extrato de *B. gaudichaudii* Trécul. disponível na literatura, demonstrando sua baixa toxicidade para camundongos após exposição por via oral, visto que os valores de DL₅₀, bem como de dose letal aproximada (ALD), são superiores a 2000 mg/kg. De acordo com as regras estabelecidas pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2004), e pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 1999), valor de DL₅₀ acima de 2000 mg/kg classifica o produto como sendo de baixa toxicidade aguda e dificilmente seria terapeuticamente útil acima dessa dose.

No presente trabalho, foi avaliada a toxicidade aguda do extrato padronizado de *B. gaudichaudii* Trécul usando embriões e larvas de zebrafish expostos a uma faixa de concentração (0,002 – 0,044 µg/mL) cerca de 20.000 a 1.000 vezes inferior a concentração eficaz do extrato no tratamento da doença de pele vitiligo (44 µg/mL). Ao contrário do estudo de Cunha et al. (2008), o extrato padronizado de *B. gaudichaudii* Trécul foi muito tóxico para zebrafish, com efeitos tóxicos letais significativos a partir de 0,05 µg/mL em 72 h de exposição, ou seja, em uma concentração 880 vezes menor que a sua concentração terapêutica. Além disso, alguns efeitos subletais também foram observados nas primeiras 24h de exposição, como edema de pericárdio e saco vitelínico. E, apesar do extrato de *B. gaudichaudii* Trécul ser empregado para promover a repigmentação da pele, nesse estudo ele inibiu significativamente a pigmentação do corpo dos embriões e larvas de zebrafish a partir de 24 h de exposição com valores de CE₅₀ ≤ 0,002 µg/mL.

Os psoralenos são furocumarinas encontrados em muitas espécies de plantas. Essas substâncias quando estimuladas pela radiação ultra violeta (UV) são capazes de iniciar reações fotoquímicas na pele, pela ligação com bases pirimidínicas do DNA das células. A reação dos

psoralenos com o DNA das células começa por um processo de intercalação do composto químico entre as bases do DNA. Na ausência de luz, nenhuma ligação covalente é formada (Quintão, 2018).

Fotoquimioterapia juntamente com os componentes psoralênicos mais exposição à radiação ultravioleta a (320-400nm) é denominada de PUVA terapia. Os psoralenos por sua vez são formados pela junção de um conjunto de hidrocarbonetos tricíclicos com benzopireno (Steiner *et al.*, 2004).

Os embriões e larvas de zebrafish não foram expostos a radiação ultra violeta, as placas foram incubadas em estufa a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12:12-h claro/escuro, entretanto a estufa possuía lâmpadas de LED, que segundo Luz, *et al.*, (2015), esse tipo de lâmpadas não emitem radiação UV e raios infravermelhos.

Esses fatores podem ter influenciado na inibição da pigmentação corporal e dos olhos dos embriões e larvas de zebrafish dois efeitos subletais observados no presente estudo. Ainda não há estudos na literatura que nos permite comprovar a hipótese de que a falta da exposição à radiação UV a (320-400nm), possa ter causado esse efeito de inibição da pigmentação.

Rezende e Soccol (2015) apresenta o zebrafish como um organismo modelo para estudos de toxicidade, uma vez que a sua embriogênese já é bem descrita e definida em sete estágios bem claros: a fase de zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, farínghula, e eclosão da larva, sendo estas fases compreendidas entre as primeiras 72 horas pós-fertilização (hpf). Ao final da embriogênese, tem-se uma larva com morfogênese praticamente completa, livre nadante e que exhibe visíveis movimentos oculares, da mandíbula e nadadeiras. Como citado anteriormente, experimentos com embriões são considerados uma alternativa ao uso de animais na experimentação científica (Fleming, 2007). Ao contrário dos métodos que utilizam linhagem celular (Schirmer, 2006), o modelo de embriões oferece um sistema multicelular complexo que integra a interação de vários tecidos e processos de diferenciação (Scholz *et al.*, 2008).

Assim sendo, é extremamente importante que o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas sejam acompanhados por testes de avaliação da segurança. Baseado nisso, faz-se necessária a implementação dos estudos toxicológicos com todas as espécies vegetais (Migliato *et al.*, 2006). O estágio embrio-larval do zebrafish (*D. rerio*) pode ser utilizado como modelo experimental para análise e seleção de compostos candidatos a fármacos, devido as características vantajosas da sua utilização em ensaios de avaliação da toxicidade, já citadas nesse estudo, além da similaridade genética (homologia de 70%), do

compartilhamento elevado de neurotransmissores e das vias de estresse com seres humanos (Howe *et al.*, 2013).

A larva de zebrafish com 96 hpf já apresenta a maioria dos órgãos desenvolvidos, inclusive o sistema nervoso. Ademais, para realização dos testes com o estágio embrio-larval de zebrafish é necessária pequena quantidade de amostra, uma vez que as larvas são capazes de sobreviver em placas de 24 poços, como foi realizado esse trabalho. Essas características possibilitam a avaliação da embriotoxicidade, uma vez que é possível observar malformações durante todo o desenvolvimento do embrião exposto a substâncias químicas e não apenas avaliar a mortalidade.

O extrato padronizado em psoraleno e bergapteno obtido a partir de *B. gaudichaudii* Trécul. apresentou baixa solubilidade em água, por esse motivo fez-se necessário a determinação de uma faixa de concentração bem inferior a concentração terapêutica (uma primeira diluição de 1000 vezes da concentração inicial do extrato de 44 µg/mL) para que fosse possível realizar a exposição dos embriões de zebrafish. A forte coloração vermelha escura e viscosidade do extrato também dificultaram a observação dos efeitos subletais sobre esse modelo, uma vez que a análise das malformações é visual em virtude da transparência do córion e corpo do embrião de zebrafish. Portanto, para confirmar a toxicidade desse composto é necessário realizar outros estudos de toxicidade com base nesses resultados obtidos para o estágio embrio-larval de zebrafish.

4. CONCLUSÃO

Esses dados permitiram concluir que o extrato *B. gaudichaudii* Trécul padronizado em psoraleno e bergapteno é embriotóxico para zebrafish, com efeitos letais significativos a partir da concentração 0,005 µg/mL em 72 horas de exposição, além de malformações relevantes durante todo o período de exposição. Apesar de algumas limitações do teste relacionadas à característica do extrato padronizado em psoraleno e bergapteno a partir de *B. gaudichaudii* Trécul., a aplicação do bioensaio com embriões e larvas de zebrafish apresenta um caráter inovador na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, pela implementação de um método alternativo à experimentação animal na avaliação da toxicidade de um composto proveniente da biodiversidade brasileira.

Vale ressaltar também que os estágios iniciais de desenvolvimento do zebrafish apresentam alta correlação com o teste de toxicidade aguda com peixes adultos e semelhança genética com humanos, o que facilita a extrapolação de resultados. Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho poderão ser utilizados como base para outros estudos de toxicidade antes

da aplicação desse extrato no tratamento de doenças cutâneas com necessidade de repigmentação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ANVISA. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes *in vitro* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.11, n.2, p. 44 Jul. - Dez./2010.

BRASIL 2004. RE nº 90 de 16 de março de 2004 - Determinação da publicação do "Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos", Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CHEN, J.B., GAO, H.W.; ZHANG, Y.L.; ZHANG, Y.; ZHOU, X.F.; LI, C.Q.; GAO, H.P. Developmental toxicity of diclofenac and elucidation of gene regulation in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Rep.* v. 4, n. 4841, p. 1-7, 2014.

CUNHA, L. C, et al. Toxicidade aguda de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. extrato de raiz em camundongos: determinação de doses letais aproximadas e medianas. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 532-538, dezembro de 2008.

DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the protection of animals used for scientific purposes. **Official Journal of the European Union**, L276:33–79, September 22, 2010.

FLEMING, A. Zebrafish como um organismo modelo alternativo paramodelagem de doenças e descoberta de medicamentos: implicações para os 3Rs.NC3Rs, Iss. 10, Centro Nacional de Substituição, RefinaçãoPesquisa e Redução de Animais em pesquisa, 2007.

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

KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. (1995) Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *DevelopmentalDynamics*,203, 255-310.

KOH, M.J.; MOK, Z.R.; CHONG, W.S. Phototherapy for the treatment of vitiligo in Asian children. *Pediatr Dermatol*, v.32, n.2, p.192-197, 2015.

LAPA AJ, KARNIOL IG, CORRADO AP, RIBEIRO AB, MELITO. I Relatório da Comissão de Ensaio Pré-Clínicos e Clínicos. Relatório da Central de Medicamentos. Ribeirão Preto-SP, 1983.

LEÃO, A. R.; CUNHA, L. C.; PARENTE, L. M. L.; CASTRO, L. C. M.; CHAUL, A.; CARVALHO, H. E.; RODRIGUES, V. B.; BASTOS, M. A. Avaliação clínica toxicológica preliminar do Viticromin® em pacientes com vitiligo. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 02, n. 01, p. 5-23, 2005.

LOPES, R. C. **Folhas de Chá: Remédios Caseiros e Comercialização de Plantas Medicinais e Aromáticas**. 1. ed. Viçosa, MG. Editora UFV, 2008. p. 1-140.

LOURENÇO, M. V.; Estudo comparativo dos constituintes químicos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do medicamento “V”. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Química de Araraquara – São Paulo, 2001.

LUZ, A; SCHEFFER, C; KRZYZANIAK, P; CADORE, W, W. A evolução da iluminação: o LED. Anais da III semana das engenharias 3ª mostra científica 03 a 08 de agosto de 2015 Frederico Westphalen – RS. 2015.

MIGLIATO K. F.; BABY A. R.; ZAGUE V.; VELASCO M. V. R.; CORRÊA M. A.; SACRAMENTO L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Acta farmacéutica bonaerense* - vol. 25, nº 2, p. 312-313-ano 2006.

MORAES, M.E.A.; SANTANA, G.S.M. Aroeirado-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. *Funcap*, v. 3, p. 5-6, 2001.

NAGEL, R. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*.19 Suppl 1:38-48. 2002.

NUNES, D. H; ESSER, L. M. H. Perfil epidemiológico dos pacientes com vitiligo e sua associação com doenças da tireoide. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.86, n.2, p.241-248, Apr. 2011.

OCDE 1999. Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, Diretriz 425: Toxicidade Oral Aguda: Procedimento Modificado para Cima e para Baixo.

OECD, 2013. Organization for Economic Cooperation and Development. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (Guideline 236).

OSHIRO, M.; MIGUEL, M.; DIAS, J.; GOMES, E.; MIGUEL, O. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 116-122, 25 nov. 2016.

PALHARES, D.; PAULA, J. E.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. S. Comparative wood anatomy of stem, root and xylopodium of *Brosimum gaudichaudii* (MORACEAE). **International Association of Wood Anatomists Journal**, v. 28, n. 1, p. 83-94, 2007.

POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae): da planta ao medicamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 159, 2005.

QUINTÃO, W. S. C. Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vitro de nanoemulsões o/a a partir de extratos de *Brosimum gaudichaudii* (Mama-cadela) como alternativa para o tratamento tópico de vitiligo. 2018. XVII, 99 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. 1. ed. São Paulo BR.: Editora Edgard Blücher Ltda, 2015. p. 9-611.

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 533-538, 2002.

SCHIRMER, K. Proposta para melhorar as culturas de células vertebradas para estabelecê-los como substitutos dos testes regulatórios de produtos químicos e efluentes que utilizam peixes. **Toxicology**, 224: 163–183. 2006.

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 International*, v. 15, n.5, p.394-404, 2008.

STEINER, D. et al. Vitiligo. Anais Brasileiros de Dermatologia. Rio de Janeiro. v. 79, n. 3, p. 335-371. Maio/jun. 2004.

STEPHENS, M. L., GOLDBERG, A. M., ROWAN, A. N. The first forty years of the alternatives approach: refining, reducing, and repalcing the use of laboratory animals.In: The state of the animals 2001. Washington: Humane Society Press, 2001.

STEINER, D.; BEDINII, V.; MORAES, M.B.; VILLAS, R.T.; STEINER, T. Vitiligo. An. Bras. Dermatol., v.79, n.3, p.335-351, 2004.

TOMAZZONI, M. I; NEGRELLE, R. R. B; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto contexto - enferm.**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-121. 03/2006.

TRUONG, L.; HARPER, S.L.; TANGUAY, R.L. Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model. Methods in molecular biology, v. 691, p. 1-8, 2011.

WHITTON, M. E.; PINART, M.; BATCHELOR, J.; LEONARDI-BEE, J.; GONZÁLEZ, U.; JIYAD, Z.; ELEFThERIADOU, V.; EZZEDINE, K. Intervenções para vitiligo. Banco de Dados Cochrane de Revisões Sistemáticas. Edição 2. 2015.

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



ANEXO I

Goiânia, 08 de dezembro de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 102/14.

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Iniciação Científica (IC) e Dissertação de mestrado.

II - Identificação:

- ‖ **Título do projeto:** Avaliação ecotoxicológica e toxicogenética de contaminantes emergentes presentes em sistemas hídricos.
- ‖ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira.
- ‖ **Pesquisadores Participantes:** Aline Rangel Silva Araújo (IC) e Lara Barroso Brito (Dissertação).
- ‖ **Unidade onde será realizado:** Faculdade de Farmácia/UFG.
- ‖ **Data de apresentação a CEUA:** 06/11/2014.

III - Objetivos e justificativa do projeto: Esse trabalho propõe avaliar os impactos ambientais e para saúde humana, provocados pela presença de contaminantes emergentes (fármacos, praguicidas e corantes têxteis) em sistemas hídricos, empregando ensaios ecotoxicológicos e toxicogenéticos com células HepG2 (células derivadas de um hepatoblastoma) e embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*).

IV - Sumário do projeto:

- ‖ **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** A avaliação da toxicidade de contaminantes emergentes pode ser realizada com culturas celulares e bactérias como método alternativo à experimentação animal. Células HepG2, provenientes de hepatoblastoma humano serão utilizadas nesse projeto para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade desses contaminantes, entretanto os testes *in vitro* são limitados pelo tempo de exposição (máximo de 72 horas). Esse projeto também propõe o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella/microsoma*, que se limita a avaliação de apenas um endpoint de toxicidade, que é a mutagenicidade em bactéria *Salmonella typhimurium*. Assim, para ampliar os endpoints avaliados, ou seja, analisar os efeitos letais (mortalidade), subletais (malformações) e genotóxicos (danos ao DNA), assim como aumentar o tempo de exposição aos contaminantes simulando uma exposição subcrônica, esse projeto pretende utilizar embriões e larvas de zebrafish. O ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish é uma metodologia que permite a redução ou substituição do uso de animais adultos na avaliação da ecotoxicidade.
- ‖ **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Serão utilizados 60 animais adultos de zebrafish (*Danio rerio*), com idade entre 3 e 6 meses, que serão mantidos em 4 tanques de 15 litros com cerca de 15 peixes cada, os quais serão monitorados e mantidos em quarentena. Os peixes serão cedidos pelo Instituto de Ciências Biológicas da UnB.
- ‖ **Espécie e número total de animais utilizados:** 60 Peixes *Danio rerio* (40 machos e 20 fêmeas)



‖ **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Os peixes adultos serão alocados em 4 aquários de 15L em uma sala de manutenção e reprodução, protegida de luminosidade, correntes de ar e ruídos, vibração externa, com fotoperíodo e temperatura controlada. Os parâmetros da água como temperatura, pH, condutividade, dureza, oxigênio dissolvido e dosagem de amônia e nitrito serão monitorados periodicamente. Os peixes serão alimentados 2 vezes ao dia com ração comercial para a espécie *Danio rerio*. Na semana anterior à reprodução, os peixes receberão alimento vivo (*Artemia salina*) a fim de aumentar a viabilidade dos ovos e como forma de recompensa ao acasalamento. Para aquisição dos ovos, no dia anterior à desova, peixes na proporção de 2 machos para 1 fêmea serão colocados para acasalar na presença de plantas artificiais e bolas de vidro. Esses peixes serão distribuídos em 3 tanques de 10 litros, com 6 peixes machos e 3 fêmeas, por tanque, totalizando 9 peixes em cada aquário, com o intuito de obter pelo menos 200 ovos por reprodução. Cerca de 30 minutos após a desova os ovos serão coletados e analisados para o descarte dos ovos não fertilizados e seleção daqueles que alcançaram o estágio de blástula. Os ensaios para avaliação dos endpoints letais, subletais e genotóxicos serão realizados em triplicata para cada substância- teste (um antibiótico, um herbicida a base de glifosato e um azo corante), sendo necessários grupos de peixes distintos para cada reprodução e fêmeas com pelo menos uma semana de intervalo entre as reproduções. De acordo com a OECD, por réplica, serão expostos 168 ovos de zebrafish distribuídos em placas de 24 poços, sendo testadas cinco concentrações de cada contaminante emergente, um controle negativo, um controle interno das placas e um controle positivo, sendo necessário ao todo cerca de 2000 ovos gerados em cerca de 10 acasalamentos distintos. As placas com os ovos serão colocadas em incubadora BOD e o desenvolvimento embrionário-larval será analisado com 4, 24, 48, 72 e 96 horas de pós- fertilização, podendo se estender até 30 dias. Após finalizar a avaliação dos endpoints de subletalidade, embriões e larvas de zebrafish serão sacrificados por criolanestesia, ou seja, a anestesia por resfriamento intenso, aceita como um dos métodos para a eutanásia de zebrafish, de acordo com Guideline for Use of Zebrafish in the NIH (2009). Os ensaios toxicogenéticos *in vitro* serão realizados com células provenientes de um hepatoblastoma primário (HepG2).

‖ **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não se aplica a utilização de agente infeccioso. Os riscos do referido trabalho se referem a falhas na manipulação dos equipamentos durante o período experimental. No entanto, os pesquisadores que atuarão na criação, manutenção, reprodução e análise dos embriões serão devidamente treinados para exercerem suas atividades.

‖ **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** A metodologia está bem clara e devidamente detalhada, sendo tomadas todas as medidas mitigadoras para minimizar o sofrimento dos animais.

‖ **Método de eutanásia:** Não se aplica.

‖ **Destino do animal:** Não é descrito o destino dos animais adultos utilizados como reprodutores.

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

‖ **Quanto a documentos:** Foram apresentados todos os documentos solicitados pela CEUA.



- I **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Os procedimentos de criação, manutenção e cuidados com os animais mimetizam o ambiente natural da espécie e garantem seu bem-estar. Os riscos desta pesquisa estão relacionados a falhas na manipulação de equipamentos, sendo minimizados com treinamento apropriado de toda a equipe.

V - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas **APROVOU** o pedido de emenda de prorrogação do prazo do projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 30/03/2018.

VI - Data da reunião: 08/12/2014

Vice coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

ANEXO II

DIRETRIZ PARA AUTORES- Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas-USP

Instruções para apresentação dos trabalhos

1. Estrutura dos originais

1.1. Cabeçalho: constituído por:

- Título do trabalho: deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.

- Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrônico. Estas informações devem constar em notas de rodapé.

1.2 Resumo (em português): deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras. Os membros da Comissão poderão auxiliar autores que não são fluentes em português.

1.3 Unitermos: devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica e observando o limite máximo de 6(seis) unitermos.

1.4 Introdução: deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

1.5 Material e Métodos: a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos devem fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.

1.6 Resultados e Discussão: deverão ser acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado, devendo se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados. É facultativa a apresentação desses itens em separado.

1.7 Conclusões: Quando pertinentes, devem ser fundamentadas no texto.

1.8 Resumo em inglês (ABSTRACT): deve acompanhar o conteúdo do resumo em português.

1.9 Unitermos em inglês: devem acompanhar os unitermos em português.

1.10 Agradecimentos: devem constar de parágrafos, à parte, antecedendo as referências bibliográficas.

1.11 Referências: devem ser organizadas de acordo com as normas da ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

2. Apresentação dos originais

Os trabalhos devem ser apresentados em lauda padrão (de 30 a 36 linhas com espaço duplo). Utilizar Programa Word for Windows. Os autores devem encaminhar o trabalho acompanhado de carta assinada pelo autor de correspondência, que se responsabilizará pela transferência dos direitos à RBCF.

3. Informações adicionais

3.1 Citação bibliográfica: As citações bibliográficas devem ser apresentadas no texto pelo(s) nome(s) do(s) autor(es), com apenas a inicial em maiúsculo e seguida do ano de publicação. No caso de haver mais de três autores, citar o primeiro e acrescentar a expressão *et al.* (*em itálico*)

3.2 Ilustrações: As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias, etc) devem ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias devem ser, também, apresentados em arquivos separados e reproduzidas em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif. e/ou bmp. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em papel vegetal ou impressora a laser.

Ilustrações coloridas somente serão publicadas mediante pagamento pelos autores.

As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em algarismos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas na apresentação no texto e na citação com apenas a inicial em maiúsculo.

3.3 Nomenclatura: pesos, medidas, nomes de plantas, animais e substâncias químicas devem estar de acordo com as regras internacionais de nomenclatura. A grafia dos nomes de fármacos deve seguir, no caso de artigos nacionais, as Denominações Comuns Brasileiras (DCB) em vigor, podendo ser mencionados uma vez (entre parênteses, com inicial maiúscula) os registrados.

Os trabalhos devem ser remetidos por correio eletrônico, anexando à mensagem os arquivos correspondentes.

E-mail: rbcf@edu.usp.br

Diretriz para autores: <http://www.revistas.usp.br/rbcf/about/submissions>