



KRISNANDA KELLY CASTRO LIMA

**ANÁLISE GENÉTICA, COMPOSIÇÃO FENÓLICA E
DAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTES *IN VITRO*, E
EMBRIOTÓXICAS E MELANOGÊNICA EM ZEBRAFISH DE
EXTRATOS DE *Sonchus oleraceus***

**LAVRAS-MG
2020**

KRISNANDA KELLY CASTRO LIMA

**ANÁLISE GENÉTICA, COMPOSIÇÃO FENÓLICA E DAS CAPACIDADES
ANTIOXIDANTES *IN VITRO*, E EMBRIOTÓXICAS E MELANOGÊNICA EM
ZEBRAFISH DE EXTRATOS DE *Sonchus oleraceus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Doutor.

Prof(a). Dr(a). Luciane Vilela Resende
Orientador(a)

Prof(a). Dr(a). Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Co-orientadora

**LAVRAS-MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Lima, Krisnanda Kelly Castro.

Análise genética, composição fenólica e das capacidades antioxidantes *in vitro*, e embriotóxicas e melanogênica em zebrafish de extratos de *Sonchus oleraceus* / Krisnanda Kelly Castro Lima. - 2020.

107 p. : il.

Orientador(a): Luciane Vilela Resende.

Co-orientadora(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Antioxidantes. 2. Capacidade melanogênica. 3. Danio rerio.
I. Resende, Luciane Vilela. II. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. III.
Título.

KRISNANDA KELLY CASTRO LIMA

**ANÁLISE GENÉTICA, COMPOSIÇÃO FENÓLICA E DAS CAPACIDADES
ANTIOXIDANTES *IN VITRO*, E EMBRIOTÓXICAS E MELANOGÊNICA EM
ZEBRAFISH DE EXTRATOS DE *Sonchus oleraceus***

**GENETIC ANALYSIS, PHENOLIC COMPOSITION AND ANTIOXIDANT
CAPACITIES IN VITRO, EMBRYOTOXIC AND MELANOGENIC IN ZEBRAFISH
OF *Sonchus oleraceus* EXTRACTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Mediciniais, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 02 de abril de 2020.

Dr(a). Luciane Vilela Resende UFLA

Dr. Wanderley José Mantovani Bittencourt UNILAVRAS

Dr. Luís David Solis Murgas UFLA

Dr.(a) Suzan Kelly Vilela Bertolucci UFLA

Dr(a). Ana Paula Peconick

Prof(a). Dr(a). Luciane Vilela Resende
Orientador(a)

Prof(a). Dr(a). Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Co-orientadora

**LAVRAS-MG
2020**

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele eu nada posso fazer e ao meu pai,
que sempre lutou e luta por mim, não importa o quanto isso custe a ele.

Com todo o meu coração e profunda gratidão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

No final de mais uma etapa da minha vida, agradeço a Deus, pois Ele me viu e me conheceu antes mesmo de eu nascer e pra mim só tem tido planos de bem e de paz para me dar um fim muito maior do que imagino.

Todo o meu amor e minha gratidão ao meu pai José Alexandrino e a minha maninha Krisane. Vocês são o motivo do meu empenho e dedicação! Quando comecei os meus estudos, desde a graduação, eu não tinha dúvidas de que eu queria alcançar tudo isso para vocês, para dedicar a vocês dois.

Ao meu amado esposo e amigo Rodrigo, a minha infinita gratidão, pois tem se dedicado muito para me ajudar, sem esperar recompensas, sem medir esforços, sempre me fazendo crescer e crer que eu posso ir além. Obrigada pela sua paciência e amor.

À minha orientadora e amiga, Dra. Luciane Vilela Resende, não só pela competente orientação, mas pela sinceridade, paciência, confiança e por estar sempre ao meu lado acreditando no meu potencial. Levarei-te comigo para sempre!

Agradeço o professor Murgas e sua equipe que abriram as portas para a realização dos trabalhos no Biotério!

À UFLA, esta instituição tão imponente eu agradeço pelo ambiente propício à evolução e crescimento.

Agradeço à professora Suzan, ao programa de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares e ao Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais da UFLA.

Agradeço imensamente ao Josemar, Stefany, Luizinho, Dico, Paulinho, Ana Paula, Giulia e Érica que estiveram sempre prontos a me ajudar em todos os momentos em que precisei.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) ou Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Por trás deste trabalho está o apoio de muita gente, sem o qual nada disto teria sido possível.

MUITO OBRIGADA!

“E, tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o coração, como para o Senhor e não para os homens, sabendo que recebereis do Senhor a recompensa da herança, porque a Cristo, o Senhor, servis”.

Colossenses 3. 23-24

RESUMO

Sonchus oleraceus L. é uma espécie que possui ampla diversidade genética e distribuição geográfica por todo o mundo. É utilizada na alimentação e na medicina popular como antioxidante e no tratamento de discromias cutâneas, como o vitiligo. Todavia, trata-se de uma espécie que não consta estudos científicos acerca de sua toxicidade e atividade melanogênica, até o presente momento. Com base na quantificação de compostos fenólicos totais, atividades antioxidantes e caracterização genética por repetições de sequência inter simples (ISSR), objetivou-se avaliar a similaridade entre 8 acessos de *S. oleraceus* e avaliar a embriotoxicidade e capacidade melanogênica de extratos de *S. oleraceus* em zebrafish (*Danio rerio*). Foram realizadas quantificação de fenóis totais e flavonóides; ensaios antioxidantes e avaliação do polimorfismo genético utilizando 17 marcadores ISSR da série UBC por caracterização molecular e citometria de fluxo, em extratos hidroalcoólicos 70% obtidos por sistema de refluxo, de folhas frescas de 8 acessos de *S. oleraceus*. Também foram realizados análises cromatográficas, ensaios de embriotoxicidade e capacidade melanogênica em *D. rerio*, de extratos aquosos, hidroetanólicos 70% e metanólicos 50% de plantas de crescimento espontâneo em áreas de cultivo orgânico e convencional de hortaliças. Na quantificação de compostos fenólicos, os fenóis totais variaram de 94.53 a 99.66 mg EAG g⁻¹ e os flavonóides variaram de 2.40 a 7.13 mg EQ g⁻¹. Todos os acessos apresentaram valores de IC₅₀ nos ensaios antioxidantes de CAT, DPPH, ABTS e poder redutor. Os iniciadores UBC 864 e UBC 878 proporcionaram maior polimorfismo. Observou-se maior similaridade (77,14%) entre os acessos Itumirim ZR₂ e UNICENTRO PR e maior dissimilaridade no acesso 2 (Itumirim ZR₁) com 77%. O conteúdo de DNA variou de 1,59 no acesso 2 (Itumirim ZR₁) a 1,96 no acesso 5 (Pouso Alegre). Na cromatografia foi caracterizado ácido clorogênico nas folhas e raízes de *S. oleraceus*. Nas folhas também foi quantificado ácido chicórico, contendo 1,52 a 4,11 mg g⁻¹ de folha, sendo identificado como o composto majoritário da planta. A embriotoxicidade dos extratos de *S. oleraceus* em embriões de zebrafish depende da concentração de extrato utilizado, sendo a LC₅₀ mais elevada no extrato aquoso de raiz 0,08 mg mL⁻¹ e a menor no extrato metanólico de raiz 2,90 mg mL⁻¹. Doses acima de 5 mg mL⁻¹ em qualquer dos extratos, foram letais em 24h de incubação e doses abaixo de 0,0025 mg mL⁻¹ não foram embriotóxicas. O efeito teratogênico dos extratos nos embriões ocorreu a partir da concentração de 0,005 mg mL⁻¹ até 2,5 mg mL⁻¹. Nos ensaios de capacidade melanogênica, extratos de folhas e raízes, na concentração de 0,625 mg mL⁻¹, foram capazes de estimular a pigmentação nas larvas de zebrafish e seus resultados variaram de 0,00055 a 0,00084 pixels μm². Conclui-se que *S. oleraceus* possui composição fenólica, capacidade antioxidante e diversidade genética entre os 8 acessos da coleção e que essa diversidade influenciou nos resultados antioxidantes. Os resultados também demonstraram que os extratos de *S. oleraceus* causaram toxicidade nos embriões de zebrafish, em uma faixa de concentração específica, todavia também possuem capacidade de pigmentação nas larvas destes mesmos animais.

Palavras-chave: Serralha. Fenóis totais. Marcadores ISSR. *Danio rerio*. Pigmentação. Ácido chicórico.

ABSTRACT

Sonchus oleraceus L. is a species that has a wide genetic diversity and geographic distribution throughout the world. It is used in food and folk medicine as an antioxidant and in the treatment of skin disorders such as vitiligo. However, it is a species that does not have scientific studies about its toxicity and melanogenic activity, until now. Based on the quantification of total phenolic compounds, antioxidant activities and genetic characterization by inter simple sequence repetitions (ISSR), the objective was to evaluate the similarity between 8 accessions of *S. oleraceus* and to evaluate the embryotoxicity and melanogenic capacity of extracts of *S. oleraceus* in zebrafish (*Danio rerio*). Quantification of total phenols and flavonoids were performed; antioxidant tests and evaluation of the genetic polymorphism using 17 ISSR markers of the UBC series by molecular characterization and flow cytometry, in 70% hydroalcoholic extracts obtained by reflux system, from fresh leaves of 8 accessions of *S. oleraceus*. Chromatographic analyzes, embryotoxicity and melanogenic capacity tests were also performed in *D. rerio*, aqueous extracts, hydroethanolic 70% and methanol 50% of spontaneous growth plants in areas of organic and conventional vegetable cultivation. In the quantification of phenolic compounds, total phenols ranged from 94.53 to 99.66 mg EAG g⁻¹ and flavonoids ranged from 2.40 to 7.13 mg EQ g⁻¹. All accessions showed IC₅₀ values in the antioxidant tests of CAT, DPPH, ABTS and reducing power. The UBC 864 and UBC 878 primers provided greater polymorphism. There was a greater similarity (77.14%) between the accessions Itumirim ZR₂ and UNICENTRO PR and a greater dissimilarity in access 2 (Itumirim ZR₁) with 77%. The DNA content varied from 1.59 in access 2 (Itumirim ZR₁) to 1.96 in access 5 (Pouso Alegre). In the chromatography, chlorogenic acid was characterized in the leaves and roots of *S. oleraceus*. Chicoric acid was also quantified in the leaves, containing 1.52 to 4.11 mg g⁻¹ of leaf, being identified as the major compound of the plant. The embryotoxicity of *S. oleraceus* extracts in zebrafish embryos depends on the extract concentration used, with the highest LC₅₀ in the aqueous root extract 0.08 mg mL⁻¹ and the lowest in the methanol extract of root 2.90 mg mL⁻¹. Doses above 5 mg mL⁻¹ in any of the extracts were lethal within 24 hours of incubation and doses below 0.0025 mg mL⁻¹ were not embryotoxic. The teratogenic effect of the extracts on the embryos occurred from the concentration of 0.005 mg mL⁻¹ to 2.5 mg mL⁻¹. In the tests of melanogenic capacity, extracts of leaves and roots, in the concentration of 0.625 mg mL⁻¹, were able to stimulate the pigmentation in the zebrafish larvae and their results ranged from 0.00055 to 0.00084 μm² pixels. It is concluded that *S. oleraceus* has phenolic composition, antioxidant capacity and genetic diversity among the 8 accessions of the collection and that this diversity influenced the antioxidant results. The results also demonstrated that the extracts of *S. oleraceus* caused toxicity in the zebrafish embryos, in a specific concentration range, however they also have pigmentation capacity in the larvae of these same animals.

Keywords: Serralha. Total phenols. ISSR markers. *Danio rerio*. Pigmentation. Chicoric acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Sonchus oleraceus</i> em campo. (a) Planta jovem. (b) Frutos com semente.....	13
Figura 2 - Aspectos gerais de <i>Sonchus oleraceus</i>	14
Figura 3 - Embrião e larva de <i>D. rerio</i> com desenvolvimento normal.....	19
Figura 4 - Vitiligo nas mãos e pulsos.	23
Figura 5 - Poder redutor dos acessos 1 a 8 de <i>S. oleraceus</i>	44
Figura 6 - Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis fenóis totais, flavonoides, poder redutor e DPPH	45
Figura 7 - Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis Fenóis, Flavonoides, Poder Redutor e ABTS.....	46
Figura 8 - Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis fenóis, flavonoides, poder redutor e CAT.....	47
Figura 9 - Dendrograma de dissimilaridade genética entre 8 acessos de <i>Sonchus oleraceus</i> , com base na matriz de dissimilaridade com dados quantitativos.	50
Figura 10 - Embriões com desenvolvimento normal.	67
Figura 11 - Procedimento do teste de toxicidade aguda do embrião de zebrafish.	67
Figura 12 - Perfis cromatográficos representativos por CLAE-DAD a 320 nm em folhas e 210 nm em raízes de preparações de <i>Sonchus oleraceus</i> e de amostra autêntica de ácido clorogênico. 73	
Figura 13 - Perfis cromatográficos representativos por CLAE-DAD a 320 nm em folhas de preparações de <i>Sonchus oleraceus</i> e de amostra autêntica de ácido chicórico.....	74
Figura 14 - Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD para o ácido chicórico, em dois dias consecutivos.....	76
Figura 15 - Letalidade dos extratos de <i>S. oleraceus</i> em zebrafish.	78
Figura 16 - Características morfológicas avaliadas como medida da embriotoxicidade e teratogenicidade dos extratos de <i>S. oleraceus</i> em diferentes pontos do tempo.....	80
Figura 17 - Larvas de <i>D. rerio</i> submetidos aos extratos de <i>S. oleraceus</i> no ensaio 1.	84
Figura 18 - Larvas de <i>D. rerio</i> submetidas a extratos de <i>S. oleraceus</i> no ensaio 2.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pesquisas biológicas recentes com plantas medicinais, utilizando o modelo experimental zebrafish.....	21
Tabela 2 - Localização de 8 ambientes de ocorrência natural de <i>S. oleraceus</i> L.....	34
Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos presentes nas folhas de <i>Sonchus oleraceus</i> . UFLA. Lavras, MG, 2019.....	40
Tabela 4 - Atividade antioxidante de folhas de 8 acessos de <i>Sonchus oleraceus</i>	42
Tabela 5 - Identificação, temperatura de anelamento e polimorfismo de <i>Sonchus oleraceus</i> com iniciadores ISSR. (continua).....	48
Tabela 6 - Conteúdo de DNA de 8 acessos de <i>S. oleraceus</i>	51
Tabela 7 - Extratos de <i>S. oleraceus</i> utilizados na condução dos ensaios em zebrafish.....	62
Tabela 8 - Gradiente de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD de amostras de raízes.	63
Tabela 9 - Gradiente de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD de amostras de folhas.	64
Tabela 10 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção das curvas analíticas de ácido chicórico.....	65
Tabela 11 - Características morfológicas avaliadas como medidas para o potencial embriotóxico e teratogênico de <i>S. oleraceus</i> ao longo de 120 horas.....	69
Tabela 12 - Esquema da metodologia de exposição de embriões e larvas de zebrafish à feniltiourea (PTU) e extratos.	71
Tabela 13 - Parâmetros de adequação do sistema determinados para as análises de marcador químico em folhas de <i>Sonchus oleraceus</i>	75
Tabela 14 - Massa injetada, áreas médias (n=3) e desvio padrão relativo das curvas analíticas de ácido chicórico em 2 dias de análise.	76
Tabela 15 - Resultados da regressão linear para curvas analíticas de ácido chicórico em 2 dias consecutivos de análise.....	76
Tabela 16 - Concentração de ácido chicórico nos extratos de folhas de <i>Sonchus oleraceus</i>	77
Tabela 17 - Letalidade, teratogênese e índice teratogênico dos extratos de <i>S. oleraceus</i> em zebrafish, analisados às 120 hpf.....	79
Tabela 18 - Concentrações responsáveis pelo retardo no crescimento dos embriões de zebrafish.....	81
Tabela 19 - Densidade (pixel μm^2) referente à melanogênese de zebrafish em 144 hpf, promovido pelos extratos de <i>S. oleraceus</i> em diferentes concentrações, no ensaio 2.	85

SUMÁRIO

	RESUMO.....	15
1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral.....	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	<i>Sonchus oleraceus</i> : de planta invasora à hortaliça não convencional	12
3.2	Propriedades medicinais	14
3.3	Potencial antioxidante	16
3.4	Zebrafish	18
3.5	Síntese de melanina	22
	REFERÊNCIAS	25
	CAPÍTULO 1 – ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Sonchus oleraceus</i>	30
	RESUMO.....	30
1	INTRODUÇÃO	32
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1	Material vegetal	34
2.2	Obtenção dos extratos vegetais.....	34
2.3	Teor de compostos fenólicos	35
2.4	Atividades antioxidantes	35
2.4.1	Atividade de sequestro do radical DPPH	35
2.4.2	Atividade de sequestro do radical ABTS.....	36
2.4.3	Capacidade antioxidante total.....	36
2.4.4	Poder redutor	36
2.4.5	Poder quelante	37
2.5	Extração de DNA.....	37
2.6	Análises moleculares	38
2.7	Conteúdo de DNA.....	38
2.8	Análise dos dados.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1	Compostos fenólicos e atividades antioxidantes	40

3.1.2	Capacidade antioxidante total.....	41
3.1.3	DPPH e ABTS	42
3.1.4	Poder redutor e quelante	44
3.2	Análise dos resultados sob Escalonamento Multidimensional	45
3.3	Polimorfismo demonstrado pelo ISSR-PCR.....	48
3.4	Diversidade genética e conteúdo de DNA.....	49
4	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE E CAPACIDADE MELANOGÊNICA DOS EXTRATOS DE <i>Sonchus oleraceus</i> EM ZEBRAFISH		
	RESUMO.....	57
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1	Material vegetal	61
2.2	Obtenção e extração de <i>Sonchus oleraceus</i>	61
2.3	Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	62
2.3.1	Preparo das amostras.....	62
2.3.2	Análises qualitativas de perfis cromatográficos	63
2.3.3	Quantificação do ácido chicórico nos extratos de folhas de <i>Sonchus oleraceus</i> ...	64
2.4	Manejo das matrizes zebrafish e instalações.....	66
2.5	Obtenção dos embriões	66
2.6	Preparação dos extratos para os ensaios	68
2.7	Teste de embriotoxicidade aguda em embriões	68
2.8	Avaliações do Índice Teratogênico (IT).....	69
2.9	Análise de concentração-resposta	70
2.10	Ensaio da capacidade melanogênica dos extratos de <i>S. oleraceus</i> em <i>Danio rerio</i>	70
3	RESULTADOS	72
3.1	Análise qualitativa dos perfis cromatográficos.....	72
3.2	Quantificação de ácido chicórico	74
3.3	Avaliação da embriotoxicidade dos extratos de <i>S. oleraceus</i> em zebrafish.....	77
3.4	Teratogenicidade dos extratos de <i>S. oleraceus</i> em zebrafish.....	79
3.4.1	Efeitos das concentrações dos extratos de <i>S. oleraceus</i> na taxa de eclosão de embriões.....	79

3.4.2	Efeitos das concentrações no retardo do desenvolvimento embrionário e malformações em zebrafish	81
3.4.3	Efeito das concentrações no aparecimento de edemas e lordose no estágio embriolarval de zebrafish	82
3.5	Índice teratogênico dos extratos de <i>S. oleraceus</i> em Zebrafish	83
3.6	Capacidade melanogênica dos extratos de <i>Sonchus oleraceus</i> em Zebrafish	83
4	DISCUSSÃO	88
5	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento popular sobre as plantas medicinais atrelado às pesquisas científicas sobre as mesmas tem possibilitado a prevenção e o tratamento de enfermidades de forma segura. Mais de 25% de todos os medicamentos foram inicialmente descobertos nos vegetais. As plantas medicinais sempre foram objeto de estudo, onde se busca novas fontes para a obtenção de princípios ativos com ação farmacológica ou terapêutica.

Estima-se que aproximadamente 80% da população mundial já tenha feito uso de alguma planta medicinal para aliviar sintomas de doenças. Ainda hoje muitas pessoas fazem uso das plantas medicinais com a falsa ideia de que elas apresentam risco menor quando comparadas aos medicamentos. Esse é um problema grave, pois ainda são poucas as plantas que possuem estudos toxicológicos e, mesmo assim, continuam sendo utilizadas sem precaução.

Dentre essas plantas, *Sonchus oleraceus* L., uma espécie da família Asteraceae, é popularmente conhecida no Brasil como serralha. Pertencente ao grupo das hortaliças não convencionais é utilizada como alimento e apreciada por muitos na culinária. Como planta medicinal a serralha é utilizada com diversos fins, como antioxidante e no tratamento de discromias cutâneas, como o vitiligo. Na literatura não se encontra estudos científicos utilizando *S. oleraceus* para pigmentação cutânea, nem tampouco estudos etnobotânicos relatando o uso desta espécie em casos de vitiligo. Os relatos do uso desta planta para o vitiligo são encontrados apenas em sites informais, blogs e no relato de pessoas que fazem uso da medicina popular.

A serralha apresenta compostos com efeitos que trazem benefícios à saúde humana, dentre eles são encontrados o ácido chicórico, ácido cafeico, ácido caftárico, ácido clorogênico, rutina e quercetina. Entre as várias ações exercidas na saúde humana, por essas substâncias presentes na serralha, observa-se a capacidade antioxidante. Nos últimos anos têm crescido o interesse por estudos com antioxidantes naturais e em um contexto mais amplo, isso se deve à importância das propriedades antioxidantes com efeitos positivos no tratamento de doenças.

Além das suas propriedades medicinais, a serralha é uma espécie encontrada em diversas localidades, com condições geográficas e climáticas diferentes e não existem

trabalhos que analisem se o local de origem afeta geneticamente a espécie ocasionando diferenças em sua composição fenólica e atividade antioxidante.

Ensaio de toxicidade são fundamentais para atestar a segurança do uso de extratos de plantas medicinais pela população. O zebrafish é um modelo animal utilizado em ensaios biológicos, inclusive para determinar concentrações embriotóxicas de diversos tipos de compostos, inclusive extratos vegetais. Ele também é considerado um modelo alternativo para ensaios envolvendo a melanogênese de mamíferos, com várias vantagens incluindo rapidez, relação custo-benefício, são sensíveis à exposição química durante o desenvolvimento inicial, possuem 70% de genes homólogos aos dos seres humanos e relevância fisiológica.

Nesse contexto, com base na quantificação de compostos fenólicos totais, atividades antioxidantes e caracterização genética por repetições de sequência inter simples (ISSR), objetivou-se avaliar a similaridade entre 8 acessos de *S. oleraceus* e avaliar a embriotoxicidade e capacidade melanogênica de extratos de *S. oleraceus* em zebrafish (*Danio rerio*).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o polimorfismo genético e o potencial antioxidante de extratos de acessos de *S. oleraceus* e verificar a toxicidade e capacidade melanogênica de extratos de *S. oleraceus* em *Danio rerio*.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar o teor de fenóis totais e analisar o potencial antioxidante de extratos de 8 acessos de *S. oleraceus*.
- Analisar o polimorfismo genético de 8 acessos de *S. oleraceus* por meio de Iniciadores Inter Simple Sequence Reaction (ISSR).
- Avaliar a embriotoxicidade, teratogênese e capacidade melanogênica de extratos de *S. oleraceus* provenientes de áreas de cultivo orgânico e convencional.
- Estabelecer perfis cromatográficos dos extratos de *S. oleraceus*.
- Caracterizar e quantificar possíveis substâncias fenólicas presentes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Sonchus oleraceus*: de planta invasora à hortaliça não convencional

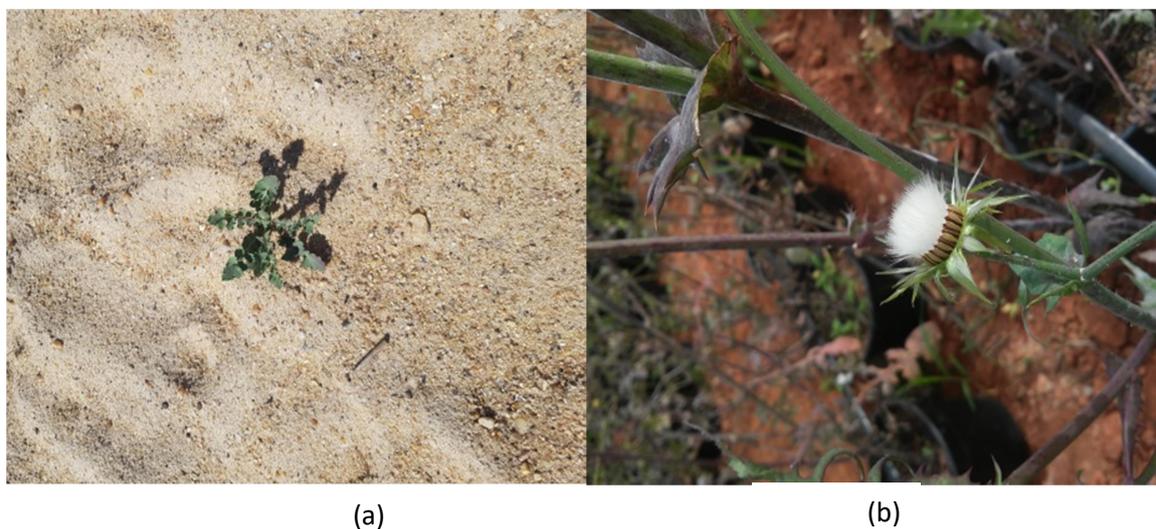
Sonchus oleraceus L. é uma herbácea anual, considerada por alguns autores como alopoliploide derivado de *Sonchus asper* L. e *Sonchus tenerrinus* L. Pertencente à família Asteraceae, subfamília Cichorioideae, ordem Asterales e representada por plantas do grupo dos “Dandelions”. Nativa da Europa, Ásia Central e norte da África (VILELA; PADILHA; SILVA et al. 2009) é conhecida como *sow thistle* (inglês), *cerraja* (espanhol), *laiteron maraîcher* (francês), *crespigno-cicerbita* (italiano), *kohl-gänsedistel* (alemão) e no Brasil é popularmente conhecido como serralha, serralha-verdadeira, serralha-lisa, cerraia, ciumo e chicória-brava. *S. oleraceus* L. foi nomeado por Carolus Linnaeus em 1753 em sua “Espécie Plantarum”. “*Sonchus*” é o nome grego para cardo de porca e significa “oco”, fazendo referência às suas hastes ocas e seu epíteto *oleraceus* significa “vegetal de cozinha”. (FLORENCE; ADEOLU; ANTHONY. 2011).

O gênero *Sonchus* possui cerca de 121 espécies descritas (CHAVES; COLARICCIO; EIRAS et al. 2007) e é composto em sua maioria por plantas anuais, raramente perenes, glabras, eretas e caule podendo medir até 150 cm de altura. Suas folhas apresentam formato variável e a planta exsuda secreção leitosa (ARANHA; BACCHI; LEITÃO FILHO. 1982) atraindo insetos, como pulgões. Por ser originária da Europa, a serralha adaptou-se melhor em regiões brasileiras de clima ameno, onde desenvolve-se mais facilmente. Não é uma planta exigente em termos de fertilidade, sendo encontrada nos mais variados tipos de solo. Não se desenvolve se coberta de muita vegetação e fica maior e mais viçosa em solos bem drenados, de textura areno-argilosa e a meia sombra (Figura 1a), além de ocorrer, em especial, em gramados, hortas e terrenos baldios (SANTOS; CARVALHO; FERREIRA et al. 2012).

Sonchus spp. tem uma popularidade questionável, por ser considerado uma das piores ervas daninhas do mundo, sendo uma praga em mais de 55 países (FLORENCE; ADEOLU; ANTHONY. 2011). É a segunda maior erva invasora de folha larga. É considerada uma erva difícil de controlar devido ao seu período de emergência intermitente e prolongado, baixa dormência de sementes, evolução na resistência a herbicidas, rápida maturidade das plantas e produção prolífica de sementes altamente dispersivas; além de suas sementes serem dispersas principalmente pelo vento (anemocoria) (Figura 1b). Todos esses fatores contribuem para a

distribuição bem-sucedida de *S. oleraceus* nos agroecossistemas (PEERZADA; O'DONNELL; ADKINS, 2019).

Figura 1 - *Sonchus oleraceus* em campo. (a) Planta jovem. (b) Frutos com semente.

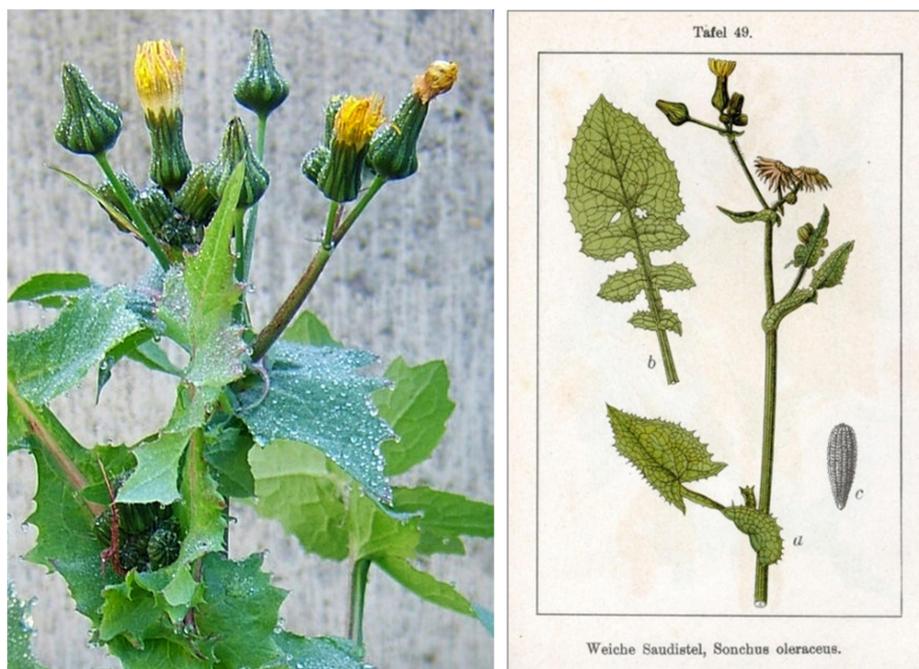


Fonte: Da autora (2017).

Além de ser uma planta invasora, também é relatado sua atividade alelopática. Hassan; Gomaa; Fahmy et al. (2014) em seus experimentos realizaram um preparado de solo onde havia sido plantado somente *S. oleraceus* para examinar o efeito das suas fitotoxinas liberadas no solo, onde posteriormente seriam plantadas outras espécies. Este estudo revelou que o solo infestado teve efeito inibitório significativo no número de sementes germinadas de *Brassica nigra* e *Melilotus indicus*. Além disso, todos os critérios morfológicos, biomassa e crescimento radicular foram significativamente reduzidos em comparação com o controle, constatando o efeito alelopático de *S. oleraceus*.

A serralha (Figura 2), como muitas outras herbáceas, é popularmente chamada de “mato” ou “daninha”. Entretanto é também uma alternativa alimentar de qualidade. Com o intuito de resgatar o uso de plantas largamente utilizadas no passado que hoje caíram em desuso, a serralha, assim como outras plantas, é classificada como hortaliça não convencional. O resgate do consumo dessas plantas é de grande importância, pois visa seus benefícios nutricionais, fácil acesso e a preservação da biodiversidade (VIANA; CARLOS; SILVA et al. 2015).

Figura 2 - Aspectos gerais de *Sonchus oleraceus*.



Fonte: Wildfeuer (2006).

Suas folhas tem sabor ligeiramente amargo, variando de planta para planta, e em quase todas as regiões brasileiras são utilizadas na culinária de forma crua ou cozidas, à semelhança do almeirão e da couve. No Brasil a região onde mais se encontra o uso de *S. oleraceus* é em Minas Gerais, e sua forma de preparo tradicional é refogada em banha de porco, com alho e cebola, para acompanhar angu, carne de porco ou frango caipira. Na culinária em geral a serralha também é utilizada em omeletes, feijão tropeiro, massas e ensopados (SANTOS; CARVALHO; FERREIRA et al. 2012).

3.2 Propriedades medicinais

Diversos compostos são encontrados em *S.oleraceus*, entre eles está a luteolina, apigenina, apigenina-7-O- β -D-glucuronideo metil ester, apigenina-7-O- β -D-glucuronideo etil ester, apigenina-7-O- β -D-glucopiranuronideo , acetato de germanicilo, ácido oleanólico e 1-cerotol (XU; LIANG. 2005), heterosídeos cardiotônicos, triterpenos, esteróides, cumarinas, taninos (LIMA; SILVA; ROSA et al. 2009), ácido caftárico (OU; SCHMIERER; RADES et al. 2013), vilosol, ácido ferúlico, β -sitosterol, ácido ursólico, rutina e β -daucosterina (LI; DONG; HUANG

et al. 2017), quercetina (ALREKABI; HAMAD. 2018) ácido α -linolênico, ácido linoleico e ácido palmítico (LI; YANG. 2018).

Preparações fitoterápicas a partir das folhas e raízes de *S. oleraceus* são utilizadas pela medicina tradicional em todo o mundo. Na China é utilizado como abortivo, anticancerígeno, anti-diarreico, anti-inflamatório, narcótico e no tratamento do vício em ópio. Na Turquia é utilizado como ansiolítico, tônico, catártico, digestivo, diurético, emenagogo, febrífugo, hepático, inseticida, lactogogo. Na Espanha e Turquia como cataplasma, na Tanzânia como tratamento para dor de dente e vermífuga e na Nova Zelândia como um laxante leve (FLORENCE; ADEOLU; ANTHONY. 2011).

Na base de dados Scopus são encontrados 425 artigos científicos buscando o termo “*Sonchus oleraceus*”, 27 artigos científicos utilizando os termos “*Sonchus oleraceus*” e “Medicinal uses”, 33 resultados para “*Sonchus oleraceus*” e “Antioxidant”. Apesar de pouco o número de trabalhos encontrados para esta espécie, estes trabalhos abarcam um grande número de aplicações em diversas áreas.

Li; Dong; Huang et al. (2017) relataram que os extratos de *S. oleraceus* inibiram significativamente a produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios nos níveis de genes e proteínas com a concentração de $31,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em camundongos.

Outros estudos têm apontado ação antinociceptiva pela administração de 300 mg kg^{-1} , via oral, de extratos hidroetanólicos 50% e diclorometânicos, que foram superiores à ação da indometacina (5 mg kg^{-1} , via oral) e morfina (10 mg kg^{-1} , via oral) (VILELA; PADILHA; SILVA et al. 2009); ação ansiolítica em ratos com a administração de 100 e 300 mg kg^{-1} via oral, de extratos hidroetanólicos 50% (VILELA; SONCINI; GIUSTI-PAIVA. 2009); ação antibacteriana (FLORENCE; ADEOLU; ANTHONY. 2011); ação antidiabética por meio de extratos hidroetanólicos (TEUGWA; MEJIATO; ZOFOU et al. 2013) e ação anti-idade (OU; RADES; MCDOWELL. 2015).

Em trabalhos realizados com extrato radicular e de folhas de *S. oleraceus* foi demonstrada atividade antiulcerogênica em camundongos e ratos Wistar. O extrato etanólico da raiz (500 mg kg^{-1}) produziu 88,5% de proteção contra a úlcera, a fração butanol do extrato de raiz também produziu 76,66% de proteção contra a úlcera. Os extratos etanólicos de folha e raiz não apresentaram alterações nas funções hepáticas e renais e são seguros até 500 mg kg^{-1} via oral. A triagem fitoquímica dos extratos investigados revelou a presença de carboidratos,

flavonóides, taninos, esteróis insaturados, proteínas e lactonas, responsáveis pelas atividades (ALOTHMAN; AWAAD; SAFHI et al. 2018).

Foi atestado o efeito anticancerígeno de extratos etanólicos de *S. oleraceus* em cultivo da linhagem celular de adenocarcinoma mamário (AMN3) nas concentrações de 5 mg mL⁻¹, 0,001 mg mL⁻¹, 0,0006 mg mL⁻¹, nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, e em cultivo da linhagem celular de câncer de laringe (Hep-2) nas concentrações de 5 mg mL⁻¹ e 0,001 mg mL⁻¹, durante os períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (ZGHAIR; NAHI; YASEEN et al. 2010).

Prichoa; Roman e Manfredini (2011) demonstraram que o macerado de *S. oleraceus* em etanol 70% proporcionou reparo tecidual em pele lesionada de ratos Wistar comparado com padrões fisiológicos normais. Em ensaios biológicos Nonato; Vargas Vilorio; Carvalho et al. (2018) apontaram o efeito de pomada preparada a base de *S. oleraceus* na recuperação de feridas em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em 10 dias de tratamento, demonstrando efeito superior ao grupo controle. Segundo esses autores, a serralha também é utilizada como um medicamento popular para de tratamento de vitiligo na região leste de Minas Gerais, Brasil.

3.3 Potencial antioxidante

Os antioxidantes são substâncias que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atuam atrasando, sequestrando ou inibindo a oxidação do substrato. Eles atuam por meio do mecanismo de doação de hidrogênio e/ou transferência de elétrons para o radical livre. A localização das hidroxilas nos compostos fenólicos, bem como a quantidade, influencia diretamente sua atuação como antioxidante (BOROSKI; VISENTAINER; COTTICA et al. 2015).

A indústria tem utilizado os antioxidantes de qualidade alimentar na preservação dos alimentos e de suas propriedades nutricionais; na saúde eles têm sido utilizados na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, catarata, câncer e diversas outras doenças autoimunes, além de tratar o envelhecimento (KAUR; KAPOOR. 2001; SHAHIDI. 2000).

Os compostos fenólicos são um dos grupos de metabólitos secundários mais abundantes nas plantas. São substâncias produzidas a partir de um conjunto de precursores biossintéticos, sendo eles: piruvato, fosfenol piruvato, acetato e alguns aminoácidos, malonil-CoA e acetil-CoA por meio da via do metabolismo do chiquimato e dos poliacetatos

(BOUDET. 2007; OKSANA. 2012; ROSS; KASUM. 2002). Os compostos fenólicos variam de moléculas simples como o fenol, até estruturas altamente polimerizadas, somando um total de mais de 8.000 estruturas já identificadas. Na saúde humana eles têm sido utilizados como antioxidantes prevenindo e tratando diversas doenças. Nas plantas eles estão envolvidos em aspectos relacionados à sua sobrevivência, como defesa contra patógenos, proteção de tecidos, pigmentação, crescimento dentre outros (BOUDET. 2007; OKSANA. 2012).

Entre os compostos fenólicos são encontrados os flavonoides. Eles são componentes que possuem funções nas plantas como antibióticos naturais, podendo ser utilizados como antifúngicos, bactericidas, agentes para proteção contra a radiação ultravioleta (UV), além de participarem da conformação estrutural da parede celular das plantas. Eles pertencem a uma ampla classe de substâncias químicas de origem natural. A síntese dos flavonóides não ocorre em seres humanos, todavia, apresentam várias propriedades farmacológicas que lhes permite agir nos sistemas biológicos e assim favorecer a saúde humana, como suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias já estabelecidas (FLAMBÓ. 2013).

Na literatura são descritas diversas metodologias para a exploração das atividades antioxidantes em plantas e alimentos, que contemplam algumas características como, por exemplo, o mecanismo de ação. Estudar a eficiência dos antioxidantes nas plantas é um trabalho complexo, requerendo a utilização de diferentes métodos para determinar o efeito antioxidante sob diferentes substratos. Os métodos podem variar de acordo com a natureza dos ensaios, se *in vitro* ou *in vivo*, de acordo com o desempenho do antioxidante frente ao radical ou íon metálico, na capacidade de doar ou transferir elétrons e capacidade de avaliar componentes hidrofílicos e lipofílicos (BOROSKI; VISENTAINER; COTTICA et al. 2015).

Segundo Yin; Heo; Jung et al. (2008) a atividade antioxidante relatada aos compostos com poder redutor está relacionada à capacidade de reduzir intermediários oxidados dos processos de peroxidação lipídica, e a atividade redutora é geralmente associada à presença de agentes redutores, que demonstram exercer um efeito antioxidante doando um átomo de hidrogênio e, assim, quebrando a cadeia de espécies reativas. Em ensaios de poder redutor, estes mesmos autores analisaram frações de extrato MeOH 70% de *S. oleraceus* comparadas aos padrões de BHT e Vitamina C e encontraram que a fração de acetato de etila a 1 mg g⁻¹ se assemelhou a ambos os padrões testados.

Em ensaios de poder quelante a ferrozina pode formar quantitativamente complexos com Fe²⁺. Quando outros agentes quelantes são adicionados à solução, a formação do

complexo é interrompida, resultando no desaparecimento da coloração avermelhada/lilás do complexo. Sendo que a medição da taxa de redução de cores permite estimar a atividade quelante do agente quelante coexistente (YIN; HEO; JUNG et al. 2008).

O ensaio de DPPH é baseado na captura do radical livre DPPH por antioxidantes, gerando um decréscimo da absorvância a 517 nm. No ensaio, ocorre uma reação de oxirredução, onde o DPPH, que apresenta coloração violeta, é reduzido formando DPPH-H (BOROSKI; VISENTAINER; COTTICA et al. 2015). Alguns estudos demonstraram que os extratos de *Sonchus oleraceus* exibiram atividade antioxidante quatro vezes superiores ao do mirtilo, um fruto conhecido devido a sua elevada atividade (GOULD; THODEY; PHILPOTT et al. 2006; MCDOWELL; THOMPSON; STARK et al. 2011).

O ensaio de ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) possui um mecanismo de ação semelhante a do ensaio de DPPH, cuja finalidade é verificar o potencial antioxidante de um substrato por meio do sequestro de um radical livre. Neste ensaio ocorre a captura do cátion $ABTS^{\bullet+}$, havendo a doação de hidrogênio ao radical. Essa metodologia possui a vantagem de poder medir a atividade de compostos de natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica (KUSKOSKI; ASUERO; TRONCOSO et al. 2005).

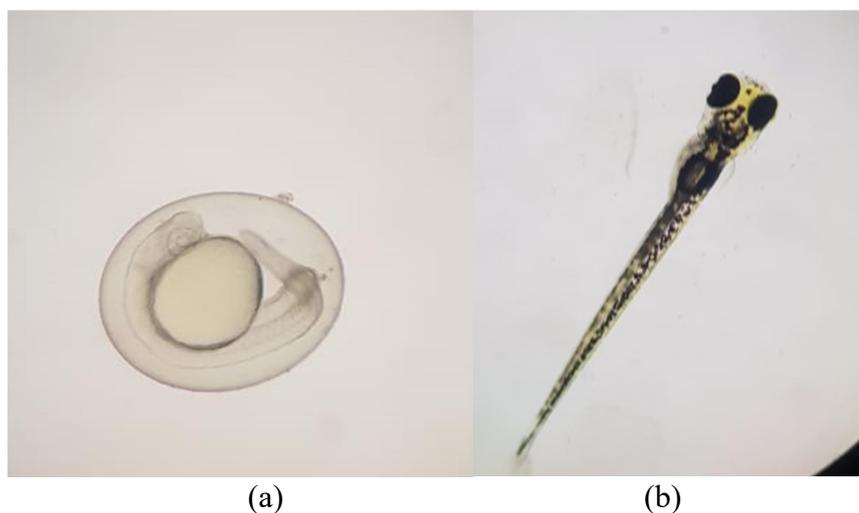
Na literatura alguns trabalhos exibiram a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS para *Sonchus* spp. sendo elas, em ordem decrescente, *S. arvensis* (IC_{50} 55,22 mg mL⁻¹) > *S. oleraceus* (IC_{50} 60,34 mg mL⁻¹) > *S. brachyotus* (IC_{50} 66,70 mg mL⁻¹) > *S. lingianus* (IC_{50} 71,46 mg mL⁻¹) > *S. asper* (IC_{50} 81,30 mg mL⁻¹) e > *S. uliginosus* (IC_{50} 93,06 mg mL⁻¹) (LI; YANG. 2018).

Jimoh; Adedapo e Afolayan (2011) encontraram no extrato acetônico a 1 mg mL⁻¹, de *Sonchus asper* 97,8% de inibição da eliminação do radical ABTS, enquanto o metanol, a água e o BHT causaram inibição em 98,0, 99,1 e 99,3%, respectivamente. Para *Sonchus oleraceus* na mesma concentração, os resultados foram 99,4, 95,7, 93,7 e 99,3% para acetona, metanol, água e BHT, respectivamente. Entretanto, a 0,05 mg mL⁻¹ a porcentagem de inibição para o extrato aquoso de *S. oleraceus* foi de 99,2% enquanto que para o extrato de acetona foi de 98,0% demonstrando não haver linearidade na relação concentração x % de inibição.

3.4 Zebrafish

Danio rerio, também conhecido em todo o mundo como zebrafish (Figura 3), é um peixe da família dos Ciprinídeos, originário da Ásia, trata-se de um vertebrado de água doce, de pequeno porte, medindo cerca de 3 a 5 cm quando adulto (FERREIRA. 2019).

Figura 3 - Embrião e larva de *D. rerio* com desenvolvimento normal.



(a) Embrião com 24 hpf. (b) Larva com 120 hpf.

Fonte: Da autora (2019).

O zebrafish é um animal de fácil manipulação, sendo possível obter um grande número de indivíduos em um único dia, possui baixo custo de criação e manutenção e desenvolvimento rápido, até 72 horas pós-fertilização ele evolui do estado ovo para larva e atinge maturidade reprodutiva aos 3 meses de vida. Estes são atributos fundamentais para a utilização deste modelo experimental na investigação de diversas enfermidades humanas (ESCALEIRA. 2017).

Os estudos de toxicidade e teratogênese são geralmente caros e demorados, devido à utilização de mamíferos. O zebrafish detém a vantagem de ser um modelo geneticamente manipulável, possuir desenvolvimento embrionário externo, ser visualmente transparente durante todo o desenvolvimento embrionário. Além disso, o desenvolvimento do zebrafish é semelhante ao de mamíferos, onde várias vias moleculares são evolutivamente conservados entre o zebrafish e os seres humanos e cuja manutenção é economicamente viável (FERREIRA. 2019; LEE; KANG; LIN et al. 2013).

O primeiro trabalho com o zebrafish data do ano de 1955, porém somente após o biólogo norte-americano George Streisinger publicar um estudo, no início da década de 1980, utilizando o *Danio rerio* como modelo em um estudo da função do sistema nervoso e seu desenvolvimento, foi que o modelo zebrafish começou a ser utilizado como modelo para pesquisas científicas (ESCALEIRA. 2017). O zebrafish também foi o primeiro animal a ser clonado. Este fato ocorreu em 1981 pela Universidade de Oregon, nos Estados Unidos. Além disto, dois prêmios Nobel já foram entregues por estudos com o zebrafish. Desde então é crescente o número de pesquisas envolvendo este vertebrado.

Por meio da base de dados Scopus, utilizando o termo “zebrafish” são encontrados 41.586 trabalhos. Após a primeira publicação, milhares de trabalhos já foram realizados. Há registros de mais de 3.000 trabalhos publicados por ano. Neste ano de 2020, até o mês de março, já foram publicados mais de 1.000 artigos científicos utilizando o zebrafish como modelo biológico.

O uso do zebrafish nas pesquisas científicas é amplo, variando de testes de embriotoxicidade (ALAFIATAYO; LAI; SYAHIDA et al. 2019), ensaios para tratamentos de diversas doenças e até trabalhos na área de física. Devido ao zebrafish ser consagrado como um modelo experimental seguro, muitos estudos biológicos com plantas medicinais tem utilizado este modelo com o intuito de atestar o uso terapêutico e alertar sobre as concentrações tóxicas de derivados vegetais. A Tabela 1 apresenta uma pequena compilação de estudos biológicos com plantas medicinais utilizando modelos experimentais com zebrafish e suas respectivas referências bibliográficas.

O uso de *Danio rerio* tem sido muito bem-sucedido na discriminação entre substâncias teratogênicas e não-teratogênicas. Essa discriminação apresenta concordância de 87% com ensaios de mamíferos *in vivo*, também têm apresentado baixas taxas de resultados falso-positivo e negativo, os quais são correspondentes a 15 e 11%, respectivamente. Os efeitos teratogênicos podem ser quantificados em embriões de zebrafish por meio de um sistema de pontuações de avaliações das alterações morfológicas. A teratogenicidade das substâncias em zebrafish é um assunto bem definido. As principais incidências de malformações incluem anormalidades cardíacas, lordoses, edemas e malformações (LEE; KANG; LIN et al. 2013).

Tabela 1 - Pesquisas biológicas recentes com plantas medicinais, utilizando o modelo experimental zebrafish.

	Espécie utilizada	Ação da planta avaliada	Referência
1	<i>Hylocereus polyrhizus</i> Britton & Rose	Efeito ansiolítico e toxicidade	Lira; Dionísio; Holanda et al. (2020)
2	<i>Hydrangeae Dulcis</i>	Diminuição do estresse físico	Oh; Kim; Kim et al. (2020)
3	<i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec	Toxicidade reprodutiva	Hyacienth; Ortiz; Picanço et al. (2020)
4	<i>Rumex vesicarius</i> L.	Toxicidade em células cancerígenas	Farooq; Abutaha; Mahboob et al. (2020)
5	<i>Clerodendrum cyrtophyllum</i> Turcz.	Ação anti-inflamatória e antioxidante	Nguyen; Le; Kim et al. (2020)
6	<i>Salvia plebeia</i> R. Br.	Ação hepatoprotetora	Xiong; Deng; Cao et al. (2019)
7	<i>Rhodiola crenulata</i> (Fröd.) S.H.Fu	Efeito anti-hipóxia	Ma; Wu; Xia et al. (2019)
8	<i>Libidibia ferrea</i> L.P. Queiroz	Toxicidade	Ferreira; Ferraz; Araújo et al. (2019)
9	<i>Ayapana triplinervis</i> (Vahl) R.M.King & H.Rob.	Inibição do Zika vírus	Haddad; Picard; Bénard et al. (2019)
10	<i>Aloysia polystachya</i> (Griseb.) Moldenke	Ação ansiolítica e antidepressiva	Melo; Sánchez-Ortiz; Sampaio et al. (2019)
11	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	Ação angiogênica e cardioprotetora	Yang; Zhao; Ding et al. (2019)
12	<i>Centella asiática</i> (L.) Urb.	Toxicidade	Zakaria; Ibrahim; Ismail et al. (2019)
13	<i>Curcuma longa</i> L.	Avaliação fitoquímica e embriotoxicidade	Alafiatayo; Lai; Syahida et al. (2019)
14	<i>Momordica charantia</i> Linn.	Toxicidade	Thiagarajan; Krishnan; Ei et al. (2019)
15	<i>Ligusticum sinense</i> Oliv.	Inibidores da melanogênese do rizoma do <i>Ligusticum sinense</i>	Cheng; Lee; Chu et al. (2018)
16	<i>Sutherlandia frutescens</i> (L.) R. Br.	Toxicidade cardiovascular	Chen; Xu; Gong et al. (2018)
17	<i>Spondias mombin</i> L.	Ação ansiolítica e antidepressiva	Sampaio; Melo; Paiva et al. (2018)
18	<i>Trapa natans</i> L.	Atividade sensora antiqorum e toxicidade	Aleksic; Ristivojevic; Pavic et al. (2018)
19	<i>Cannabis sativa</i> L.	Efeitos do canabidiol no comportamento e expressão de genes imunes em peixe-zebra	Jensen; Korbut; Kania et al. (2018)
20	<i>Naravelia zeylanica</i> (L.) DC.	Efeito anti-inflamatório	Ekambaram; Perumal e Pavadai (2017)

Fonte: Da autora (2020).

Baseado nos valores de CL_{50} e EC_{50} , calcula-se o índice teratogênico (IT). Maiores valores de IT estão associados a um agente tóxico que produz grandes separações entre as curvas de concentração-resposta de malformação e letalidade. Baseado nesse índice é possível encontrar agentes tóxicos que causam malformações graves, mas não são letais, em contrapartida, podem ser encontrados agentes tóxicos com uma capacidade letal intensa, mas que reduzem as malformações em concentrações mais baixas (LEE; KANG; LIN et al. 2013).

Além das aplicações acima citadas, o zebrafish é um modelo alternativo para ensaios envolvendo a melanogênese de mamíferos, com várias vantagens incluindo rapidez, relação custo-benefício e relevância fisiológica (CHOI; KIM; KO et al. 2007). Zhong; An; Li et al. (2019) relatam que os antioxidantes atuam como preventivos e no tratamento do surgimento de manchas em casos de vitiligo, testados em zebrafish. Guillot; Muriach; Rocha et al. (2016) também utilizaram o zebrafish em estudos para avaliar a capacidade de inibição da melanogênese. Segundo Lajis (2018) a aplicação do modelo zebrafish para estudos da atividade despigmentante de compostos bioativos tem recebido atenção na genética e também na indústria cosmética. Em seu trabalho Lajis (2018) afirma a confiabilidade do zebrafish em trabalhos que envolvem a melanogênese.

3.5 Síntese de melanina

A pigmentação da pele humana é causada pela síntese de melanina e pela sua distribuição na pele e nos folículos pilosos. A melanogênese consiste na biossíntese da melanina a partir de precursores fenólicos. Essa síntese é um processo enzimático catalisado principalmente pela tirosinase, proteína relacionada à tirosinase 1 (TYRP1) e ao dopacromo tautomerase (DCT). Por meio dessas enzimas ocorre a biotransformação da tirosina em melanina dentro dos melanócitos (PAULIN. 2016).

Os melanossomos maduros, portados de melanina, são transportados pelos prolongamentos dos melanócitos e depositados no citoplasma dos queratinócitos para então, fornecer pigmentação da pele e fotoproteção (PAULIN. 2016).

A melanina desempenha a função de manter a uniformidade do tom da pele, na pigmentação pilosa e na fotoproteção contra lesão do DNA induzido por raios UV. A produção do pigmento melanina pode ser modificada por fatores internos, como reações inflamatórias ou hormonais e também por fatores externos, como a exposição solar. Essa alteração na produção de melanina pode provocar alterações na pigmentação (cabelo grisalho,

vítíligo etc.) ou marcas de hiperpigmentação, como manchas de idade, melasma e lesões acneicas (MIOT; MIOT; SILVA et al. 2009).

O vítíligo é uma doença cutânea, ou hipomelanose adquirida, não contagiosa, que é causada pela destruição dos melanócitos, caracterizada por manchas acrómicas, geralmente bilaterais e simétricas (Figura 4), com início em qualquer faixa etária (SOUZA; CARVALHO; ROCHA et al. 2005).

A causa da destruição desses melanócitos ainda é desconhecida. Sabe-se, contudo, se tratar de uma doença multifatorial, que envolve condições genéticas, imunológicas, ambientais, emocionais e que as alterações imunológicas são ao mesmo tempo a causa e a consequência da doença. O que não deixa dúvidas no campo da dermatologia é que o vítíligo é uma das dermatoses que gera mais efeitos psicológicos graves (ANTELO; FILGUEIRA; CUNHA. 2008; CORREIA; BORLOTTI. 2013).

Figura 4 - Vítíligo nas mãos e pulsos.



Fonte: Resende; Aquino; Nascimento et al. (2015)

Na literatura existem três hipóteses básicas que explicam essa doença. São elas a hipótese da autotoxicidade, hipótese neural e hipótese autoimune. Outros fatores também são propostos para explicar essa doença, como deficiência de fatores de crescimento dos melanócitos, função dos melanócitos e estresse oxidativo por alteração mitocondrial, também descrito como melanocitorragia (ANTELO; FILGUEIRA; CUNHA. 2008).

Uma das principais linhas de tratamento consiste em estimular a produção de pigmento na pele. Outra linha de tratamento é utilizada nos casos em que o vitiligo atingiu uma grande extensão pelo corpo, nesses casos o tratamento consiste em destruir os melanócitos sadios e produzir a despigmentação das regiões ainda não atingidas (CORREIA; BORLOTI. 2013).

Na medicina tradicional muitas plantas têm sido utilizadas no tratamento como propostas de repigmentação total da pele, como cita Pourmand; Asgharzadeh e Rashedi (2016), na utilização de um xarope com 5g de *Acorus calamus* L. (açoro), 5g de *Piper longum* L. (*pimenta-longa*), 5g de *Terminalia citrina* Roxb. ex Fleming (Terminalia), 10g de *Pistacia lentiscus* L. (aroeira), 5g de *Aristolochia indica* L., 5g de *Boswellia carterii* Birdw. (olíbano do deserto) e 5g de *Laurus nobilis* L. (Louro) em 250 gramas de mel.

Outras plantas também são relatadas na literatura para o tratamento da repigmentação da pele como *Brosimum gaudichaudii* Trécul (mama-cadela) (CARNEIRO; DUARTE; NOGUEIRA et al. 2019), *Alocasia macrorrhizos* (L.) G.Don (orelha-de-elefante) (CORDEIRO. 2018), *Ammi majus* L. (erva do bispo), *Ammi visnaga* (L.) Lam. (erva-palito), *Citrus bergamia* Risso & Poit. (bergamota) e *Dorstenia brasiliensis* Lam. (carapiá, caiapiá, liga-liga) (VASCONCELOS; SANTOS; BARROS et al. 2015), *Solanum paniculatum* L. e *Jacaranda brasiliiana* (Lam.) Pers. (RESENDE; AQUINO; NASCIMENTO et al. 2015).

Para a repigmentação da pele, essas plantas têm sido utilizadas de forma tópica ou oral, acompanhado de exposição controlada da radiação UVA (luz UVA ou luz solar), como forma de induzir a repigmentação. É importante destacar que as plantas medicinais não são isentas de toxicidade, mesmo em caso de uso tópico, podendo causar sérias queimaduras, devendo ser utilizados com precaução, com consulta responsável na literatura e indicação médica (VASCONCELOS; SANTOS; BARROS et al. 2015).

REFERÊNCIAS

- ALAFIATAYO, A. A.; LAI, K. S.; SYAHIDA, A. et al. Phytochemical Evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic Effects of Curcuma longa Extract on Zebrafish (Danio rerio). **Evid Based Complement Alternat Med**, 2019, p. 3807207, 2019.
- ALEKSIC, I.; RISTIVOJEVIC, P.; PAVIC, A. et al. Anti-quorum sensing activity, toxicity in zebrafish (Danio rerio) embryos and phytochemical characterization of Trapa natans leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 222, p. 148-158, 2018. Article.
- ALOTHMAN, E. A.; AWAAD, A. S.; SAFHI, A. A. et al. Evaluation of anti-ulcer and ulcerative colitis of Sonchus oleraceus L. **Saudi Pharm J**, 26, n. 7, p. 956-959, Nov. 2018.
- ALREKABI, D. g.; HAMAD, M. N. Phytochemical Investigation of Sonchus Oleraceus (Family:Asteraceae) Cultivated in Iraq, Isolation and Identification of Quercetin And Apigenin. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 10, n. 9, p. 2242-2248, 2018.
- ANTELO, D. P.; FILGUEIRA, A. L.; CUNHA, J. M. T. Aspectos imunopatológicos do vitiligo. **Med Cutan Iber Lat Am**, 36, n. 3, p. 125-136, 2008.
- ARANHA, C.; BACCHI, O.; LEITÃO FILHO, H. **Plantas invasoras de culturas**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1982.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M. et al. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed. Curitiba: Appris, 2015.
- BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, 68, p. 2722-2735, 2007.
- CARNEIRO, M. F.; DUARTE, E. F.; NOGUEIRA, J. C. M. et al. Multiplicação da planta medicinal *Brossimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura. **Revista Fitos**, 13, n. 1, p. 61-73, 2019.
- CHAVES, A.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M. et al. *Sonchus asper* e *S. oleraceus* como reservatórios naturais de vírus em cultivos de alface no cinturão-verde de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74, p. 101-106, 04/01. 2007.
- CHEN, L.; XU, M.; GONG, Z. et al. Comparative cardio and developmental toxicity induced by the popular medicinal extract of *Sutherlandia frutescens* (L.) R.Br. detected using a zebrafish Tuebingen embryo model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 18, n. 1, 2018. Article.
- CHENG, M. C.; LEE, T. H.; CHU, Y. T. et al. Melanogenesis inhibitors from the rhizoma of *ligusticum sinense* in B16-f10 melanoma cells in vitro and zebrafish in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, 19, n. 12, 2018. Article.
- CHOI, T.-Y.; KIM, J.-H.; KO, D. H. et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. **Pigment Cell Research**, 20, n. 2, p. 120-127, 2007/04/01. 2007.

CORDEIRO, I. H. **Bioatividade dos extratos de alopecia macrorrhizos em cultura de células e modelo murino de vitiligo**. 2018. - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Saúde e Sociedade, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni.

CORREIA, K. M. L.; BORLOTI, E. Convivendo com o vitiligo: uma análise descritiva da realidade vivida pelos portadores. **Acta Comportamental**, 21, p. 227-240, 2013.

EKAMBARAM, S. P.; PERUMAL, S. S.; PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacology**, 25, n. 1, p. 147-158, 2017. Article.

ESCALEIRA, R. d. C. O zebrafish (*Danio rerio*): contribuições para a pesquisa biomédica na Marinha do Brasil. **Arq Bras Med Naval.**, 78, n. 1, p. 43-48, jan/dez. 2017.

FAROOQ, M.; ABUTAHA, N.; MAHBOOB, S. et al. Investigating the antiangiogenic potential of *Rumex vesicarius* (humeidh), anticancer activity in cancer cell lines and assessment of developmental toxicity in zebrafish embryos. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 27, n. 2, p. 611-622, 2020. Article.

FERREIRA, D. Q.; FERRAZ, T. O.; ARAÚJO, R. S. et al. Libidibia ferrea (Jucá), a traditional anti-inflammatory: A study of acute toxicity in adult and embryos zebrafish (*danio rerio*). **Pharmaceuticals**, 12, n. 4, 2019. Article.

FERREIRA, M. L. Zebrafish: sua importância na avaliação de toxicidade. São Paulo 2019.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana**. 2013. (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

FLORENCE, O. J.; ADEOLU, A. A.; ANTHONY, J. A. Comparison of the Nutritive Value, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*. **Records of Natural Products**, 5, n. 1, p. 29-42, 2011.

GOULD, K.; THODEY, K.; PHILPOTT, M. et al. Antioxidant activities of extracts from traditional Maori food plants. **New Zealand Journal of Botany - N Z J BOT**, 44, p. 1-4, 03/01. 2006.

GUILLOT, R.; MURIACH, B.; ROCHA, A. et al. Thyroid Hormones Regulate Zebrafish Melanogenesis in a Gender-Specific Manner. **PLoS one**, 11, n. 11, p. e0166152-e0166152, 2016.

HADDAD, J. G.; PICARD, M.; BÉNARD, S. et al. Ayapana triplinervis essential oil and its main component thymohydroquinone dimethyl ether inhibit zika virus at doses devoid of toxicity in zebrafish. **Molecules**, 24, n. 19, 2019. Article.

HASSAN, M. O.; GOMAA, N. H.; FAHMY, G. M. et al. Interactions between *Sonchus oleraceus* L. and some weeds in agroecosystems in Egypt. **Annals of Agricultural Sciences**, 59, n. 2, p. 221-228, 2014. Article.

HYACIENTH, B. M. S.; ORTIZ, B. L. S.; PICANÇO, K. R. T. et al. *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec.: A medicinal plant for gynecological treatments – A reproductive toxicity assessment in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, 250, 2020. Article.

JENSEN, H. M.; KORBUT, R.; KANIA, P. W. et al. Cannabidiol effects on behaviour and immune gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). **PLoS ONE**, 13, n. 7, 2018. Article.

JIMOH, F.; ADEDAPO, A. A.; AFOLAYAN, A. J. Comparison of the Nutritive Value, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*. **Rec. Nat. Prod.**, 5, n. 1, p. 29-42, 2011.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. **International Journal of Food Science & Technology**, 36, n. 7, p. 703-725, 2001.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAJIS, F. B. A. A Zebrafish Embryo as an Animal Model for the Treatment of Hyperpigmentation in Cosmetic Dermatology Medicine. **Medicina**, 54, n. 3, 2018.

LEE, S. H.; KANG, J. W.; LIN, T. et al. Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. **Biomed Res Int**, 2013, p. 726478, 2013.

LI, Q.; DONG, D. D.; HUANG, Q. P. et al. The anti-inflammatory effect of *Sonchus oleraceus* aqueous extract on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells and mice. **Pharmaceutical Biology**, 55, n. 1, p. 799-809, 2017. Article.

LI, X.-M.; YANG, P.-L. Research progress of *Sonchus* species. **International Journal of Food Properties**, 21, n. 1, p. 147-157, 2018/01/01. 2018.

LIMA, J. M.; SILVA, C. A.; ROSA, M. B. et al. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, 27, n. 1, p. 7-11, 03. 2009. research-article.

LIRA, S. M.; DIONÍSIO, A. P.; HOLANDA, M. O. et al. Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. **Food Research International**, 127, 2020. Article.

MA, Y.; WU, Y.; XIA, Z. et al. Anti-hypoxic molecular mechanisms of *rhodiola crenulata* extract in zebrafish as revealed by metabonomics. **Frontiers in Pharmacology**, 10, 2019. Article.

MCDOWELL, A.; THOMPSON, S.; STARK, M. et al. Antioxidant activity of puha (*Sonchus oleraceus* L.) as assessed by the cellular antioxidant activity (CAA) assay. **Phytotherapy Research**, 25, n. 12, p. 1876-1882, 2011. Article.

MELO, N. C.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; SAMPAIO, T. I. S. et al. Anxiolytic and antidepressant effects of the hydroethanolic extract from the leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) moldenke: A study on zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, 12, n. 3, 2019. Article.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G. d. et al. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 84, p. 623-635, 2009.

NGUYEN, T. H.; LE, H. D.; KIM, T. N. T. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of the ethanol extract of *Clerodendrum cyrtophyllum turcz* in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish. **Antioxidants**, 9, n. 3, 2020. Article.

NONATO, I.; VARGAS VILORIA, M.; CARVALHO, G. et al. Healing Effects of Formulations with Extract of *Sonchus oleraceus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 46, p. 7, 11/10. 2018.

OH, J.; KIM, D. H.; KIM, G. Y. et al. *Hydrangeae Dulcis Folium* Attenuates Physical Stress by Suppressing ACTH-Induced Cortisol in Zebrafish. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 26, n. 2, p. 130-137, 2020. Article.

OKSANA, S. e. a. Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. **Journal of Medicinal Plants Research**, 6, n. 13, p. 2526-2539, 2012.

OU, Z. Q.; RADES, T.; MCDOWELL, A. Anti-Ageing Effects of *Sonchus oleraceus* L. (puha) Leaf Extracts on H₂O₂-Induced Cell Senescence. **Molecules**, 20, n. 3, p. 4548-4564, Mar. 2015. Article.

OU, Z. Q.; SCHMIERER, D. M.; RADES, T. et al. Application of an online post-column derivatization HPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in *Sonchus oleraceus* L. leaf extracts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 65, n. 2, p. 271-279, Feb. 2013. Article.

PAULIN, J. V. **Abordagem alternativa para síntese de melanina**. 2016. 111 p. f. (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho", Bauru.

PEERZADA, A. M.; O'DONNELL, C.; ADKINS, S. Biology, impact, and management of common sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, 41, n. 8, p. 136, 2019/07/16. 2019.

POURMAND, M.; ASGHARZADEH, M.; RASHEDI, J. Vitiligo Treatment in Ancient Iranian Medicine. **Iran J Public Health**, 45, n. 8, p. 1100-1101, 2016.

PRICHOA, F. C.; ROMAN, S. S.; MANFREDINI, V. Tissue injuries of wistar rats treated with hydroalcoholic extract of *Sonchus oleraceus* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 47, n. 3, p. 605-613, Jul-Sep. 2011. Article.

RESENDE, J. H. C.; AQUINO, G. S. T.; NASCIMENTO, F. R. F. et al. Oral use of an infusion of leaves of *Solanum paniculatum* L., *Jacaranda brasiliensis* and *Sonchus oleraceus* for treatment of vitiligo. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, 5, p. 317-331, 2015.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu Rev Nutr**, 22, p. 19-34, 2002.

SAMPAIO, T. I. S.; MELO, N. C.; PAIVA, B. T. F. et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, 224, p. 563-578, 2018. Article.

SANTOS, I. C. d.; CARVALHO, O. C. d.; FERREIRA, E. D. et al. Serralha - *Sonchus oleraceus* L. Belo Horizonte: 3 p. 2012.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Food / Nahrung**, 44, n. 3, p. 158-163, 2000.

- SOUZA, A. P. F. d. S.; CARVALHO, F. T.; ROCHA, K. B. et al. Associação de eventos estressores ao surgimento ou agravamento de vitiligo e psoríase. **Psico**, 36, n. 2, p. 167-174, 2005.
- TEUGWA, C. M.; MEJIATO, P. C.; ZOFOU, D. et al. Antioxidant and antidiabetic profiles of two African medicinal plants: *Picralima nitida* (Apocynaceae) and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, 13, p. 9, Jul. 2013. Article.
- THIAGARAJAN, S. K.; KRISHNAN, K. R.; EI, T. et al. Evaluation of the Effect of Aqueous *Momordica charantia* Linn. Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2019, 2019. Article.
- VASCONCELOS, L. L. d.; SANTOS, S. L. F. d.; BARROS, F. H. d. S. et al. VITILIGO E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS PARA O SEU TRATAMENTO. *In: Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica (EEDIC)*, 2015, 1. 1.
- VIANA, M. M. S.; CARLOS, L. A.; SILVA, E. C. et al. Phytochemical composition and antioxidant potential of unconventional vegetables. **Horticultura Brasileira**, 33, n. 4, p. 504-509, 2015. Article.
- VILELA, F. C.; PADILHA, M. M.; SILVA, L. S. et al. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, n. 2, p. 306-310, 2009. Article.
- VILELA, F. C.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, n. 2, p. 325-327, 2009. Article.
- XIONG, G.; DENG, Y.; CAO, Z. et al. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish and Shellfish Immunology**, 95, p. 399-410, 2019. Article.
- XU, Y.; LIANG, J. Y. Chemical constituents of *Sonchus oleraceus* L. **Journal of China Pharmaceutical University**, 36, n. 5, p. 411-413, 2005. Article.
- YANG, L. F.; ZHAO, B. N.; DING, X. Y. et al. Spectrum-effect relationship of angiogenesis activity and cardioprotection of water-soluble components of *Salvia miltiorrhiza* in zebrafish. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 50, n. 12, p. 2899-2907, 2019. Article.
- YIN, J.; HEO, S. I.; JUNG, M. J. et al. Antioxidant Activity of Fractions from 70% Methanolic Extract of *Sonchus oleraceus* L. . **Food Science and Biotechnology**, 17, n. 6, p. 1299-1304, Dec. 2008.
- ZAKARIA, F.; IBRAHIM, W. N. W.; ISMAIL, I. S. et al. LCMS/MS metabolite profiling and analysis of acute toxicity effect of the ethanolic extract of *Centella asiatica* on zebrafish model. **Pertanika Journal of Science and Technology**, 27, n. 2, p. 985-1003, 2019. Article.
- ZGHAIR, Z.; NAHI; YASEEN, Y. et al. The Effect of Crude Extracts of *Sonchus oleraceus* on Cancer Cell Growth (In vitro). **Iraqi J. Vet. Med.**, 34, n. 2, p. 30-38, 01/01. 2010.
- ZHONG, H.; AN, X.; LI, Y. et al. Sodium tanshinone IIA silate increases melanin synthesis by activating the MAPK and PKA pathways and protects melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress. **RSC Advances**, 9, n. 33, p. 18747-18757, 2019. 10.1039/C8RA09786K.

CAPÍTULO 1 – ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Sonchus oleraceus*

RESUMO

O uso de hortaliças com capacidade antioxidante tem crescido devido aos seus benefícios de prevenção e tratamentos de enfermidades. *Sonchus oleraceus* L. é uma hortaliça não convencional, utilizada na alimentação e na medicina popular por todo o mundo. Este gênero destaca-se em diversidade de espécies endêmicas, complexidade taxonômica e ampla distribuição geográfica, com representantes em todos os continentes. Com base na quantificação de compostos fenólicos totais, atividades antioxidantes e caracterização genética por repetições de sequência inter simples (ISSR), objetivou-se avaliar a similaridade entre 8 acessos de *S. oleraceus*. Foram utilizados extratos hidroalcoólicos 70% obtidos por sistema de refluxo, de folhas frescas de diferentes acessos do Sudeste e Sul do Brasil, sendo Itumirim, Itumirim ZR₁, Horta – DAG UFLA, Lavras MG, Pouso Alegre MG, Itumirim ZR₂, Unicentro PR e DAG – UFLA, da coleção de germoplasma de hortaliças não convencionais da Universidade Federal de Lavras. Foram quantificados fenóis totais, flavonoides e realizados ensaios antioxidantes (Capacidade antioxidante total, DPPH, ABTS, poder redutor e quelante). Avaliou-se a diversidade genética utilizando 17 marcadores ISSR da série UBC (1, 3, 810, 812, 827, 830, 834, 845, 848, 849, 858, 860, 864, 868, 878, 881 e 884) por caracterização molecular e citometria de fluxo. Os resultados da quantificação de fenóis totais variaram de 94.53 a 99.66 mg EAG g⁻¹ e dos flavonoides de 2.40 a 7.13 mg EQ g⁻¹. Todos os acessos apresentaram valores de IC₅₀ nos ensaios de CAT, DPPH, ABTS e poder redutor. Os iniciadores UBC 864 e UBC 878 foram os que proporcionaram maior polimorfismo. Observou-se maior similaridade (77,14%) entre os acessos Itumirim ZR₂ e UNICENTRO PR e maior dissimilaridade no acesso 2 (Itumirim ZR₁) com 77%. O conteúdo de DNA variou de 1,59 no acesso 2 (Itumirim ZR₁) a 1,96 no acesso 5 (Pouso Alegre). Conclui-se que *S. oleraceus* possui composição fenólica, capacidade antioxidante e diversidade genética entre os 8 acessos da coleção e que essa diversidade genética influenciou nos resultados antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidante. Serralha. DNA. Diversidade genética.

ABSTRACT

The use of vegetables with antioxidant capacity has grown due to their prevention and disease treatment benefits. *Sonchus oleraceus* L. is an unconventional vegetable, used in food and in popular medicine all over the world. This genus stands out in diversity of endemic species, taxonomic complexity and wide geographic distribution, with representatives on all continents. Based on the quantification of total phenolic compounds, antioxidant activities and genetic characterization by inter simple sequence repetitions (ISSR), the objective was to evaluate the similarity between 8 accessions of *S. oleraceus*. 70% hydroalcoholic extracts obtained by reflux system were used, from fresh leaves from different accessions in the Southeast and South of Brazil, being Itumirim, Itumirim ZR₁, Horta - DAG UFLA, Lavras MG, Pouso Alegre MG, Itumirim ZR₂, Unicentro PR and DAG - UFLA, from the germplasm collection of unconventional vegetables from the Federal University of Lavras. Total phenols, flavonoids were quantified and antioxidant tests were performed (Total antioxidant capacity, DPPH, ABTS, reducing and chelating power). Genetic diversity was evaluated using 17 ISSR markers from the UBC series (1, 3, 810, 812, 827, 830, 834, 845, 848, 849, 858, 860, 864, 868, 878, 881 and 884) by characterization molecular and flow cytometry. The results of quantification of total phenols ranged from 94.53 to 99.66 mg EAG g⁻¹ and flavonoids from 2.40 to 7.13 mg EQ g⁻¹. All accessions showed IC₅₀ values in the CAT, DPPH, ABTS and reducing power tests. The UBC 864 and UBC 878 primers provided the greatest polymorphism. There was a greater similarity (77.14%) between the accessions Itumirim ZR₂ and UNICENTRO PR and a greater dissimilarity in access 2 (Itumirim ZR₁) with 77%. The DNA content varied from 1.59 in access 2 (Itumirim ZR₁) to 1.96 in access 5 (Pouso Alegre). It is concluded that *S. oleraceus* has phenolic composition, antioxidant capacity and genetic diversity among the 8 accessions of the collection and that this genetic diversity influenced the antioxidant results.

Keywords: Antioxidant. Serralha. DNA. Genetical diversity.

1 INTRODUÇÃO

Sonchus oleraceus L. é uma hortaliça não convencional da família Asteraceae, nativa da Europa, Ásia Central e norte da África. Em diversos países *S. oleraceus* é considerada uma planta daninha e também uma espécie pioneira, podendo infestar lavouras anuais e perenes durante todo o ano; no sudeste do Brasil o seu desenvolvimento ocorre principalmente no inverno (FRAGA; TASENDE. 2003; LIMA; SILVA; ROSA et al. 2009), em temperaturas que variam entre 12 °C e 28 °C.

O gênero *Sonchus* se destaca não somente quanto à sua ampla variedade de compostos químicos e efeitos medicinais, mas também quanto à diversidade de espécies endêmicas, totalizando 121 espécies descritas, complexidade taxonômica e vasta distribuição geográfica com representantes em todos os continentes (CHAVES; COLARICCIO; EIRAS et al. 2007).

Devido sua distribuição e facilidade adaptativa a regiões de frio, calor, chuva e seca, faz-se importante ampliar o conhecimento da espécie, sobretudo quanto as suas características genéticas, uma vez que estas variações ambientais podem implicar em alterações nos produtos do metabolismo secundário da planta. As repetições de sequência inter simples (ISSR) têm sido utilizadas em diversas áreas de pesquisa com plantas, incluindo diversidade genética, estudos filogenéticos, marcação de genes, mapeamento de genoma e biologia evolutiva de diferentes espécies. Os marcadores ISSR são altamente sensíveis para detectar polimorfismos genômicos e oferecem um grande potencial para determinar níveis de variação intra e interespecíficos.

Além disso, *Sonchus oleraceus* também é apreciada tanto na alimentação quanto na medicina popular, em infusões e tinturas, para prevenir e combater enfermidades por todo o mundo, devido à sua rica composição química. Ela apresenta compostos fenólicos, fitosteróis e outros metabólitos secundários de interesse para a saúde humana (AL JUHAIMI; GHAFOR; AHMED et al. 2017; VILELA; PADILHA; DOS SANTOS-E-SILVA et al. 2009).

A expectativa de vida é pautada por uma porção de fatores, genéticos e ambientais, e outros hábitos à mesa, como a ingestão adequada de alimentos. É fato que existe um elo entre o excesso de radicais livres no organismo e o aparecimento de doenças. Estudos apresentam a relação entre o consumo de hortaliças e a proteção a vários tipos de doenças devido à sua ação antioxidante. Os alimentos com esta capacidade agem inibindo a oxidação de um substrato por meio do sequestro de radicais livres no organismo. Entre as substâncias que conferem aos

alimentos ação antioxidante, estão os compostos fenólicos, a vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e os carotenoides.

Decorrente disso, com base na quantificação de compostos fenólicos totais, atividades antioxidantes e caracterização genética por repetições de sequência inter simples (ISSR), objetivou-se apontar a similaridade entre 8 acessos de *S. oleraceus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As sementes de *Sonchus oleraceus* foram originalmente obtidas de 8 localidades, sendo 7 no estado de Minas Gerais e 1 do Paraná (Tabela 2). Os acessos foram cultivados na horta experimental, pertencente à coleção de hortaliças não convencionais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), latitude 21°14'S, longitude 45°00'W e altitude média de 918 metros, no município de Lavras (MG) no período de junho a agosto de 2019. As plantas foram cultivadas em canteiro a sol pleno, todas no mesmo local e recebendo irrigação 2x ao dia. As plantas receberam adubação orgânica e não foi aplicado nenhum tipo de defensivo químico.

Tabela 2 - Localização de 8 ambientes de ocorrência natural de *S. oleraceus* L.

	Denominação	Local	Coordenadas	
			Latitude	Longitude
Acesso 1	ITU	Itumirim- MG	21°19'04.8"S	44°52'14.1"W
Acesso 2	ZR1	Itumirim-MG	21°16'27.8"S	44°49'47.2"W
Acesso 3	HAG	Lavras-MG	21°13'19.0"S	44°58'13.6"W
Acesso 4	LAV	Lavras-MG	21°13'59.1"S	44°59'46.9"W
Acesso 5	POA	Pouso Alegre-MG	22°13'24.0"S	45°56'08.5"W
Acesso 6	ZR2	Itumirim-MG	21°16'28.5"S	44°49'03.1"W
Acesso 7	UPR	Guarapuava-PR	25°24'22.6"S	51°28'11.7"W
Acesso 8	DAG	Lavras-MG	21°13'37.6"S	44°58'25.3"W

ITU = Itumirim; ZR₁ = Zona Rural 1; HAG = Horta do Departamento de Agricultura da Uiversidade Federal de Lavras (UFLA); LAV = Lavras, POA: Pouso Alegre; ZR₂ = Zona Rural 2; UPR = Universidade Estadual do Centro Oeste; DAG = Departamento de Agricultura da UFLA.

2.2 Obtenção dos extratos vegetais

As folhas de *S. oleraceus* foram coletadas, em toda a planta, nos meses de Julho e Agosto de 2019 entre as 7h e 9h da manhã. Os extratos foram preparados a 10% (p/v) empregando-se um sistema de refluxo. As folhas frescas, cortadas em fragmentos de cerca de

1 cm², foram destiladas em solução etanólica a 70% por 20 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados a vácuo e concentrados em evaporador rotatório a 40°C, sob pressão reduzida, até resíduo. Os rendimentos extrativos foram determinados e expressos em porcentagem (g.100g⁻¹ de folhas frescas). Os extratos foram armazenados em freezer a -20°C até as análises. Para as análises de quantificação de compostos fenólicos e potencial antioxidante os extratos foram ressuspensos em etanol 70% na concentração de 10 mg mL⁻¹.

2.3 Teor de compostos fenólicos

Os teores de fenóis totais foram mensurados pelo método colorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Slinkard e Singleton (1977). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 760 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em miligrama equivalente em ácido gálico por grama de folha fresca (mg EAG g⁻¹).

Os flavonoides (flavonas e flavonóis totais) foram determinados pelo método de Ahn; Kumazawa; Usui et al. (2007) utilizando a solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 10%. As absorvâncias foram lidas a 420 nm e o conteúdo total de flavonoides foi determinado usando uma curva padrão de uma solução etanólica de quercetina. O conteúdo total de flavonoides foi expresso como miligrama equivalente de quercetina por grama de folha fresca (mg EQ g⁻¹).

2.4 Atividades antioxidantes

Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata. As leituras das absorvâncias foram realizadas utilizando a Leitora de microplacas TECAN Infinity® M200 PRO)

2.4.1 Atividade de sequestro do radical DPPH

No sequestro do radical DPPH foi utilizado uma solução metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 0,2 mM. O BHT (3,5-di-tert-4-butilhidroxitolueno) foi utilizado como solução padrão e o metanol como controle negativo. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 517 nm. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante)

foi calculada utilizando-se a seguinte equação: $AA\% = (Abs_0 - Abs_1)/Abs_0 \cdot 100$, em que A_0 é a absorbância do controle negativo e A_1 a absorbância das amostras (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET. 1995). A atividade de eliminação de radicais livres por DPPH foi expressa como IC_{50} ($mg mL^{-1}$), indicando a concentração de extrato com capacidade de inibir 50% dos radicais DPPH.

2.4.2 Atividade de sequestro do radical ABTS

Na eliminação de radicais livres pelo ensaio de descoloração catiônica do radical ABTS, foi utilizado o método descrito por Ling; Yap; Radhakrishnan et al. (2009) e Re; Pellegrini; Proteggente et al. (1999) com ligeiras modificações. A solução de $ABTS^{\bullet+}$ foi diluída em etanol até alcançar a absorbância de $0,7 \pm 0,02$ em 734 nm, então foram adicionados 30 μL das amostras e 270 μL de solução diluída de ABTS. O etanol foi utilizado como controle negativo e o Trolox como controle positivo. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa em IC_{50} ($mg mL^{-1}$) em concentração de extrato.

2.4.3 Capacidade antioxidante total

O ensaio de capacidade antioxidante total foi realizado conforme descrito por Prieto; Pineda e Aguilar (1999) e as absorbâncias mensuradas a 695 nm. A análise foi realizada em quintuplicata e os resultados expressos em miligrama equivalentes em ácido ascórbico por grama de folha fresca ($mg EAA g^{-1}$).

2.4.4 Poder redutor

A capacidade dos extratos de reduzir os íons de Fe^{3+} a Fe^{2+} foi avaliada em comparação ao ácido ascórbico, segundo a metodologia de Oyaizu (1986). Para a determinação do poder redutor foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 6,6), ferrocianeto de potássio a 1% (p/v), ácido tricloroacético 10% (p/v), água destilada e cloreto férrico 0,1% (p/v). As absorbâncias foram mensuradas a 700 nm. O ensaio foi realizado em quintuplicata e expresso pelo valor da absorbância a 700nm.

2.4.5 Poder quelante

O poder quelante dos extratos foi avaliado de acordo com Miguel (2010). O grau de quelação dos íons de ferro II nos extratos foi avaliado utilizando cloreto tetra-hidratado de ferro II ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 2 mM e ferrozina 5 mM. As soluções foram incubadas por 10 minutos a 25°C. As absorbâncias foram medidas a 562 nm. Os resultados foram expressos em IC_{50} (mg mL^{-1} de matéria fresca), correspondendo à concentração eficaz para a quelação de 50% de íons ferro II. As análises foram realizadas em triplicata e EDTA foi utilizado como um controle positivo.

2.5 Extração de DNA

O material vegetal fresco foi macerado com nitrogênio líquido até obtenção de pó fino. Adicionou-se 10 mL de tampão CTAB pré-aquecido a 65 °C [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; β -mercaptoetanol 0,2% (v/v)] ao cadinho para maceração. A solução foi homogeneizada e incubada em banho maria a 65°C por 30 minutos. Arrefecidos a temperatura ambiente. Foi adicionado 10 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). Posteriormente, foi centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Coletado o sobrenadante e adicionado três vezes o volume de álcool-acetato de amônio (6:1) a 20°C. Freezer por *overnight*. O DNA precipitado foi coletado, transferido para um microtubo e retirado o excesso de álcool-acetato de sódio centrifugando-o. Após secagem, o DNA foi dissolvido em TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) aproximadamente 200-400 μL . Depois levado em banho maria a 65°C por 15 minutos para dissolver. Após dissolvido, adicionou-se igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico e centrifugado 5.000 rpm por 5 minutos. Foi coletado o sobrenadante e adicionado três vezes o volume com álcool-acetato de sódio e mantido em freezer por *overnight*. A amostra foi centrifugada e retirado o álcool-acetato e ressuspensos o DNA em TE, quantificado e exposto em gel de agarose para analisar a qualidade do mesmo (TEIXEIRA; SANTOS; RAMALHO et al. 2005) adaptado. Amostras foram armazenadas a -20°C.

2.6 Análises moleculares

Para a detecção de polimorfismo, testaram-se 17 Iniciadores Inter Simple Sequence Reaction (University of British Columbia, Canadá) – UBC ISSR em triplicatas de plantas matrizes (ADHIKARI; SAHA; BANDYOPADHYAY et al. 2015).

As reações de amplificação foram feitas em um volume de 25 μL contendo 10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 nM de KCl; 2,0 mM MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP; 0,25 μM de iniciador ISSR, 50 ng de DNA molde, 1 unidade de Taq polimerase (Invitrogen) e H_2O estéril p.s.p.

As reações foram submetidas a 35 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos. Cada ciclo consistiu de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos entre 42 e 50 °C (teste de gradiente de temperatura) e 2 minutos a 72 °C. Ao final de 35 ciclos, foi realizada uma extensão de 7 minutos a 72 °C.

Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese (5v.cm^{-1}) em gel de agarose a 1% (p/v), utilizando tampão de corrida TBE 1X e coradas com brometo de etídio. Para determinar o tamanho das bases foram utilizados marcadores de peso molecular (ladder) 100 pb (pares de bases - Promega).

2.7 Conteúdo de DNA

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram conduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Departamento de Agricultura - DAG, da Universidade Federal de Lavras – UFLA, em outubro de 2018.

Para a determinação do conteúdo de DNA, foram coletadas folhas frescas jovens em crescimento ativo. O ensaio foi realizado em triplicata. Aproximadamente 20-30 mg de material coletado foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie (MARIE; BROWN. 1993) sob banho de gelo para a liberação dos núcleos. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta e filtrada através de uma malha de 50 μm . Os núcleos foram corados pela adição de 25 μL de iodeto de propídeo. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson), os histogramas obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8. O

conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*Pisum sativum*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg).

2.8 Análise dos dados

A fim de analisar as variáveis referentes aos teores de compostos fenólicos e potenciais antioxidantes que melhor discriminassem as espécies, procedeu-se à seleção de variáveis utilizando a técnica multivariada de escalonamento multidimensional (EMD). Cada tratamento foi representado por uma coordenada, enquanto que os eixos representavam as variáveis analisadas. O uso desse procedimento consiste em comparar a matriz de distância euclidiana obtida com todas as variáveis. Para avaliar essa proximidade, utilizou-se a função STRESS, sendo o resultado desejado mais próximo de zero. As análises e a rotina computacional para o EMD foram implementadas por meio do sistema de análise estatística R (R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2010). As variáveis também foram analisadas isoladamente por meio do teste de média Scott Knott a 0,5% de probabilidade.

A análise de agrupamento foi realizada usando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) baseado no coeficiente de similaridade binária, adotando os pacotes Pclus e Vegan, no programa R. A representatividade do dendrograma foi testada por meio da correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias entre as populações no dendrograma com o auxílio do R (R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2010). Para o ensaio de conteúdo de DNA foi utilizado o teste de média Scott Knott a 0,5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos fenólicos e atividades antioxidantes

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas entre os acessos para os teores de compostos fenólicos (Tabela 3). Com base na análise estatística, observa-se a discriminação de três grupos de acordo com a semelhança dos seus teores de fenóis totais. Os acessos HAG, LAV, POA e ZR2 apresentaram os maiores teores de fenóis totais, os quais não diferiram estatisticamente entre si (99,38 a 98,71 mg EAG g⁻¹). Em seguida, o grupo dos acessos ITU, UPR e DAG (96,59 mg EAG g⁻¹ a 97,33 mg EAG g⁻¹) que também demonstraram entre si similaridade estatística. Por fim, o acesso ZR1, separado estatisticamente dos demais acessos, com o menor teor de fenóis totais (94,53 mg EAG g⁻¹).

Tabela 3 - Teores de compostos fenólicos presentes nas folhas de *Sonchus oleraceus*. UFLA. Lavras, MG, 2019.

Acessos	Fenóis totais mg EAG g ⁻¹	Flavonóides mg EQ g ⁻¹
A1 Itumirim	96,59±1,8b	5,92±0,04c
A2 Itumirim ZR ₁	94,53±0,7 c	3,60±0,09d
A3 Horta – DAG UFLA	99,66±0,8a	3,57±0,05d
A4 Lavras MG	99,38±0,6a	nd
A5 Pouso Alegre MG	98,71±0,3a	7,13±0,20a
A6 Itumirim ZR ₂	99,50±0,4a	6,89±0,23b
A7 UNICENTRO PR	97,15±1,1b	3,09±0,11e
A8 DAG – UFLA	97,33±1,0b	2,40±0,13f

Itumirim ZR₁ = Zona Rural 1; Itumirim ZR₂ = Zona Rural 2; DAG UFLA = Departamento de Agricultura da UFLA; UNICENTRO PR = Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, PR; nd = não detectado. Letras minúsculas na coluna seguidos das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

Quanto aos teores de flavonóides (flavonas e flavonóis totais) dispostos na Tabela 3, nota-se que somente os acessos ZR1 (3,60 mg EQ g⁻¹) e HAG (3,57 mg EQ g⁻¹) foram apontados como tendo resultados semelhantes. Todos os demais acessos diferiram entre si

quanto aos teores de flavonóides, sendo POA (7,13 mg EQ g⁻¹) o que revelou maior teor, DAG (2,40 mg EQ g⁻¹) com menor e LAV não foi detectado teores de flavonóides.

Avaliando cada variável isolada das demais pelo teste de Scott-Knott, nota-se que os acessos não foram agrupados de acordo com a procedência das sementes, tanto nos teores de fenóis totais quanto em flavonóides. Também é possível perceber que os acessos com maior teor de fenóis totais não necessariamente apresentaram respectivos teores de flavonóides, o que de fato pode ser esperado e não tido como uma regra geral, mesmo se tratando da mesma espécie, pois a origem de suas sementes pode afetar quantitativamente e/ou qualitativamente seus valores de compostos fenólicos.

Em doseamento de fenóis totais, Arbos; Freitas; Stertz et al. (2010) encontraram para hortaliças convencionais os seguintes teores em ordem decrescente: almeirão orgânico (92,15 ± 1,09 mg EAG.100 g⁻¹), alface convencional (91,22 ± 0,91 mg EAG.100 g⁻¹), rúcula convencional (90,78 ± 2,23 mg EAG.100 g⁻¹) e almeirão convencional (81,04 ± 3,64 mg EAG.100 g⁻¹). Esses resultados apontam que *S. oleraceus*, independentemente do acesso utilizado, é uma hortaliça não convencional com teores de fenóis totais superiores ao de hortaliças comumente consumidas pela população brasileira.

3.1.2 Capacidade antioxidante total

Os acessos LAV, POA, ZR2 e DAG demonstraram tanto maiores resultados (Tabela 4) quanto semelhança entre si na capacidade antioxidante total, sendo 19,52 mg EAA g⁻¹; 22,41 mg EAA g⁻¹; 19,93 mg EAA g⁻¹ e 22,07 mg EAA g⁻¹ respectivamente. Nos resultados de fenóis totais os acessos LAV, POA e ZR2 também apresentaram semelhanças, demonstrando poder haver relação entre a qualidade dos fenóis totais extraídos nesses acessos com os resultados da capacidade antioxidante total.

Os resultados dos acessos ITU, ZR1, HAG e UPR também foram semelhantes entre si. Esta semelhança também pode ser comparada aos resultados de fenóis totais e flavonóides, uma vez que o primeiro doseamento agrupou os acessos ITU e UPR e o segundo doseamento demonstrou semelhança entre os acessos ZR1 e HAG, podendo estes também ter tido influência nos resultados da capacidade antioxidante total destes acessos, devido ao tipo de composto fenólico presente.

Em trabalho realizado com *Dasyphyllum tomentosum*, espécie da família Asteraceae, esta tem demonstrado elevada atividade antioxidante (65,89 %) mensurada por este mesmo método, utilizando extratos hidroetanólicos (PAULA; CANTELI; VERDAM et al. 2014). Diversos trabalhos já foram desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante total de plantas (HUANG; OU; PRIOR. 2005; MAGALHÃES; SEGUNDO; REIS et al. 2008; PRIOR; WU; SCHAICH. 2005). Contudo, ainda não há relatos na literatura sobre a capacidade antioxidante total de *S. oleraceus* mensurado por meio do ensaio do fosfomolibdênio.

Tabela 4 - Atividade antioxidante de folhas de 8 acessos de *Sonchus oleraceus*.

	CAT mg EAA g ⁻¹	DPPH IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	ABTS IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	Redutor (nm)
A1 Itumirim	10,13±0,3b	0,03±0,0007a	0,03±0,0002a	1,12±0,03a
A2 Itumirim ZR ₁	15,58±2,28b	0,04±0,0005b	0,03±0,0008a	1,25±0,02a
A3 Horta – DAG UFLA	10,88±0,4b	0,04±0,0003b	0,03±0,002a	1,18±0,02a
A4 Lavras MG	19,52±3,64a	0,04±0,001b	0,03±0,0001a	1,21±0,05a
A5 Pouso Alegre MG	22,41±3,85a	0,03±0,0009a	0,03±0,0005a	1,26±0,04a
A6 Itumirim ZR ₂	19,93±2,2a	0,04±0,0011b	0,03±0,001a	1,16±0,03a
A7 UNICENTRO PR	12,12±0,17b	0,05±0,0017c	0,04±0,001a	1,08±0,06a
A8 DAG – UFLA	22,07±1,0a	0,08±0,0009d	0,06±0,003b	0,88±0,01b
Padrão		0,008±0,0001	0,006±0,0002	2,70±0,02

Itumirim ZR₁ = Zona Rural 1; Itumirim ZR₂ = Zona Rural 2; DAG UFLA = Departamento de Agricultura da UFLA; UNICENTRO PR = Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, PR. Padrões utilizados: CAT = ácido ascórbico; DPPH = BHT; ABTS = Trolox; Poder redutor = Ácido Ascórbico e Poder quelante = EDTA. Letras minúsculas na coluna seguidos das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

3.1.3 DPPH e ABTS

Os resultados do ensaio DPPH expressos em IC₅₀ variaram de 0.03 mg mL⁻¹ a 0.08 mg mL⁻¹ (Tabela 4). No ensaio de ABTS (Tabela 4) observou-se semelhança entre os acessos ITU, ZR1, HAG, LAV, POA e ZR2, sendo o IC₅₀ dessas amostras de 0.03 mg mL⁻¹. O acesso UPR e o acesso DAG apresentaram IC₅₀ 0.04 ± 0.001 mg mL⁻¹ e 0.06 ± 0.003 mg mL⁻¹ respectivamente.

As semelhanças encontradas nos resultados de DPPH e ABTS tiveram pouca correspondência com os de fenóis totais e flavonóides, entretanto McDowell; Thompson; Stark et al. (2011) alega que espécies do gênero *Sonchus* exibem elevados teores de polifenóis e atividade antioxidante mensurada pelo ensaio de DPPH, contudo esse potencial requer que os antioxidantes de baixo peso molecular (LMWA) sejam absorvidos e ativos nas células humanas. Os antioxidantes representados pelo esqueleto C6-C3 possuem, geralmente, baixo peso molecular, sendo que os mais importantes são os ácidos hidroxicinâmicos, como por exemplo, o ácido chicórico. Mesmo que os resultados deste ensaio demonstram pouca relação estatística entre DPPH, ABTS e a quantificação de fenóis totais, Ou; Schmierer; Rades et al. (2013) relataram a presença de ácido chicórico nas folhas de *S. oleraceus*, indicando a provável efetividade antioxidante de *S. oleraceus* no organismo humano. Estes autores ainda relatam que o ensaio de Atividade Antioxidante Celular (AAC) é capaz de investigar o potencial antioxidante efetivo dos extratos nas células. Esses autores obtiveram em extratos de *S. oleraceus* os valores de IC₅₀ de $0,012 \pm 0,003 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,010 \pm 0,005 \text{ mg mL}^{-1}$ para folhas liofilizadas e frescas, respectivamente. O estudo revelou que folhas liofilizadas exibiram perda de polifenóis comparado com as folhas frescas, porém isso não afetou o potencial dos LMWA dos extratos foliares de serem absorvidos por células HepG2.

Dados indicam que os compostos fenólicos extraídos das folhas de *S. oleraceus* e quantificados pelo ensaio Folin-Ciocalteu podem diferir dos compostos com capacidade de eliminação de DPPH (MCDOWELL; THOMPSON; STARK et al. 2011). Liu; Ardo; Bunning et al. (2007) em estudo com alface cultivada sob diferentes condições ambientais revelaram que plantas cultivadas com temperaturas mais altas e luz mais forte exibiram maior atividade antioxidante em comparação com plantas cultivadas a baixa temperatura e luz, embora o conteúdo fenólico total, determinado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, não tenha sido significativamente diferente.

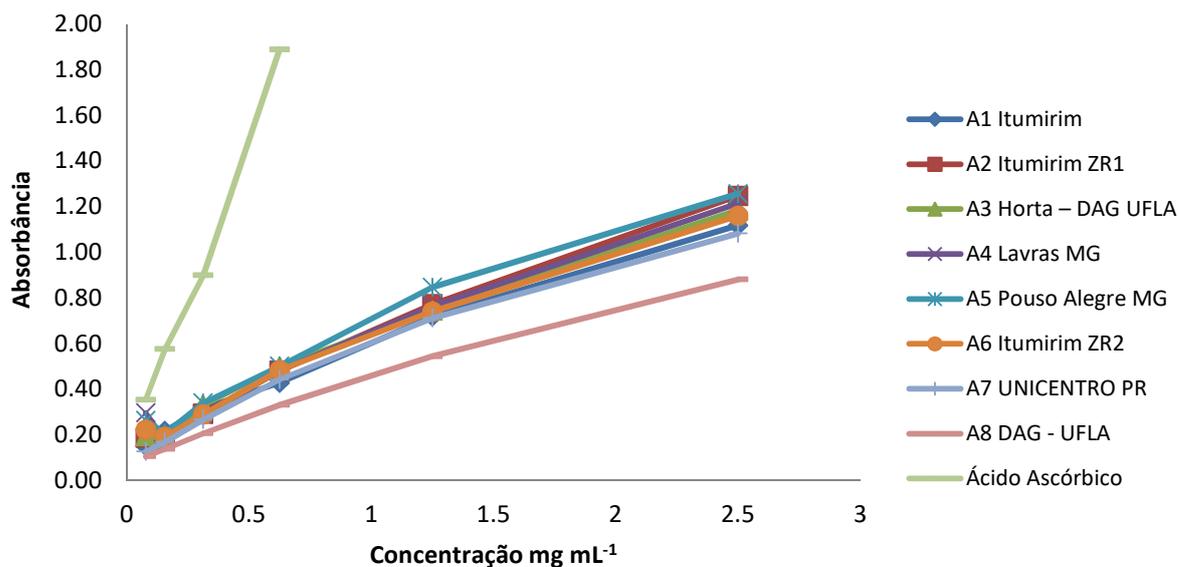
Esses dados corroboram com os resultados do presente trabalho demonstrando que a relação entre o teor de fenóis totais e os resultados antioxidantes dependem de fatores não puramente quantitativos, mas principalmente qualitativos. O tipo de composto fenólico e o baixo peso molecular destes influenciam decisivamente seu potencial antioxidante.

3.1.4 Poder redutor e quelante

De acordo com a Tabela 4 não houve diferenças estatísticas na ação de poder redutor dos extratos dos acessos de 1 a 7, que variou de 1,08 nm a 1,26 nm na concentração de 2,5 mg mL⁻¹. Nessa mesma faixa de concentração observa-se que DAG apresentou absorvância inferior aos demais (Figura 5). Todos os acessos exibiram uma atividade redutora dependente da concentração comparado ao padrão de ácido ascórbico (1,89 nm).

Comparando *Sonchus oleraceus* com espécies alimentícias convencionais, observou-se que ela apresentou resultados de poder redutor superiores ao de manga (0,12 nm), mamão (0,21 nm) e goiaba (0,41 nm), frutas oriundas do Ceasa MG (OLIVEIRA; AQUINO; RIBEIRO et al. 2011).

Figura 5 - Poder redutor dos acessos 1 a 8 de *S. oleraceus*.

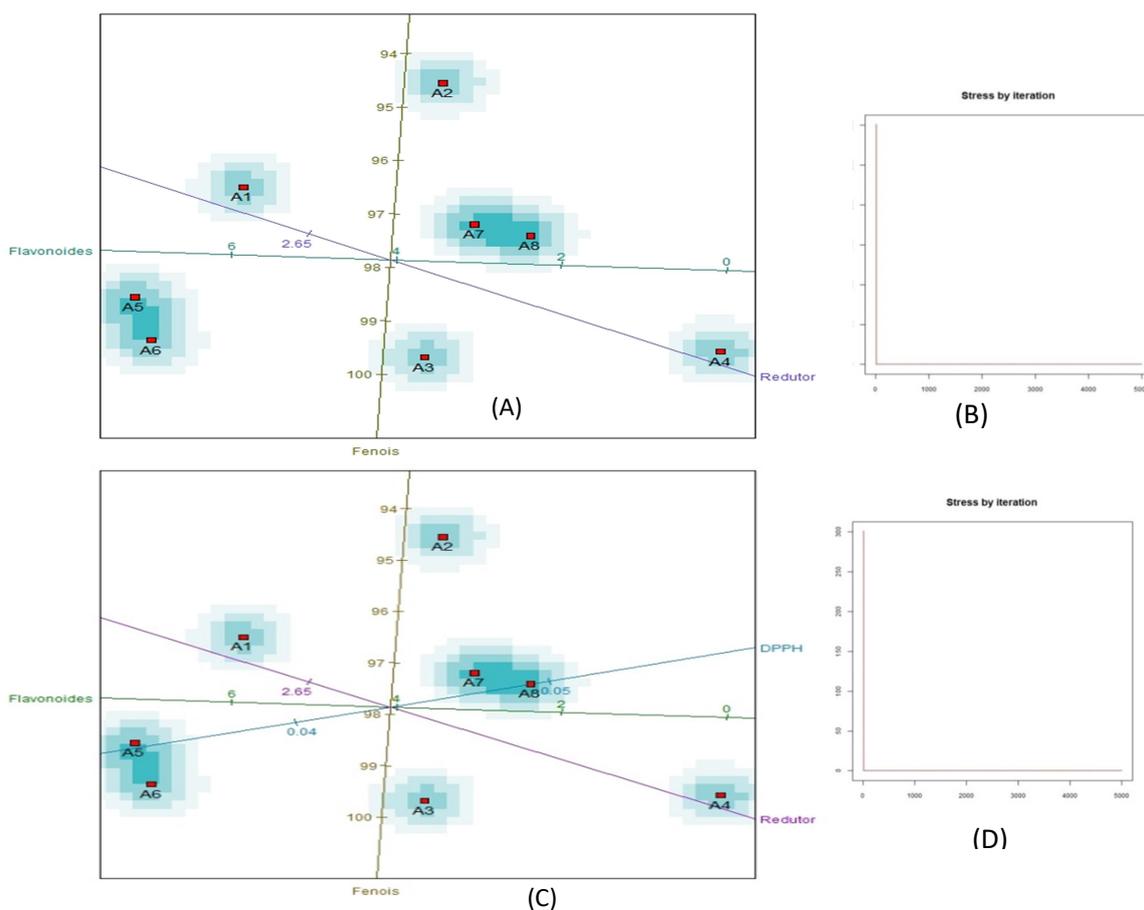


Os 8 acessos de *S. oleraceus* não apresentaram atividade quelante na concentração de 50%, não sendo possível o cálculo da IC₅₀. Por isso, os resultados foram expressos em porcentagem de quelação, os quais tiveram uma faixa de atividade entre 24% a 45%. Portanto, os resultados indicam que os extratos etanólicos 70% dos 8 acessos de *S. oleraceus* pouco interferem na formação do complexo cloreto de ferro (II) e ferrozina, sugerindo que os extratos expressaram fraca atividade quelante e captura do íon ferroso antes da ação da ferrozina.

3.2 Análise dos resultados sob Escalonamento Multidimensional

Quanto à similaridade na caracterização geral dos acessos, utilizou-se do escalonamento multidimensional, onde foi possível analisar a relação existente entre diversas variáveis e tratamentos em um mesmo biplot. Prestou-se esta avaliação, pois todas essas variáveis estão presentes em um indivíduo, sendo possível conjecturar compor um perfil da ação antioxidante dos acessos e avaliar a similaridade entre eles. Sendo assim, certificou-se que as variáveis consideradas importantes e padrões na discriminação das espécies frente aos demais testes, foram os fenóis totais, flavonoides e poder redutor (Figura 6 A), confirmadas pela minimização da função STRESS em relação ao número de iterações necessárias, na Figura 6B.

Figura 6 - Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis fenóis totais, flavonoides, poder redutor e DPPH

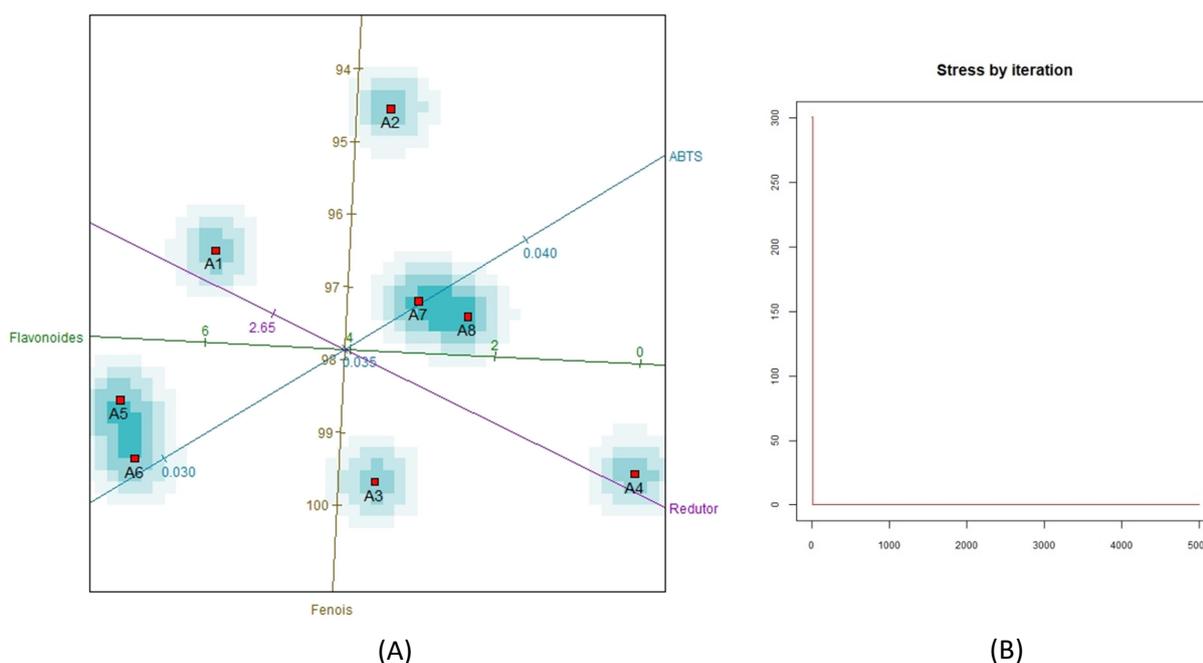


Legenda: (A) – Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis fenóis totais, flavonoides e poder redutor; (C) variáveis fenóis totais, flavonoides, poder redutor e DPPH. (B e D) Minimização da função STRESS na Figura A e C, respectivamente.

Observando o biplot padrão (Figura 6A), representado pelas variáveis fenóis totais, flavonóides e poder redutor, nota-se que houve similaridade nos resultados entre os acessos POA e ZR2 e entre os acessos UPR e DAG. Os acessos ITU, ZR1, HAG e LAV demonstraram dissimilaridade entre si e entre os demais.

Com a inserção das variáveis DPPH (Figura 6C) e ABTS (Figura 7A) os acessos mantiveram um posicionamento estável no gráfico de forma semelhante ao biplot padrão (Figura 6A). A cada inserção de alguma variável esta se torna responsável pela similaridade entre os acessos POA e ZR2 e entre os acessos UPR e DAG, juntamente com os flavonóides. Estes resultados corroboram para o fato de que a composição fenólica (fenóis e flavonoides) contribui para a atividade antioxidante destes acessos.

Figura 7 - Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis Fenóis, Flavonoides, Poder Redutor e ABTS.



Legenda: (A) Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis fenóis, flavonoides, poder redutor e ABTS. (B) Minimização da função STRESS em relação ao número de iterações necessárias para a confirmação da seleção das variáveis ilustradas na Figura A.

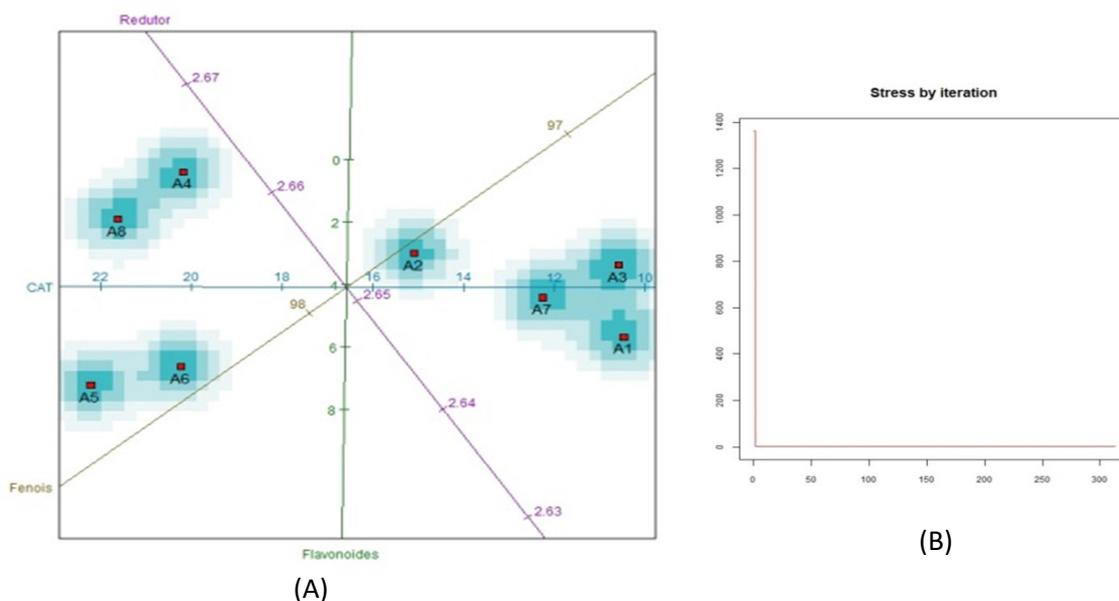
A similaridade entre os acessos ocorreu mesmo sendo eles oriundos de regiões diferentes (A5 Pouso Alegre MG e A6 Itumirim ZR₂ e entre os acessos A7 UNICENTRO PR e A8 DAG – UFLA), podendo-se inferir que a adubação e o tipo de solo não foram fatores que acarretaram tais diferenças, pois os acessos foram cultivados em um mesmo local,

recebendo o mesmo tratamento. Esses acessos (POA, ZR2, UPR e DAG) demonstraram ter, possivelmente, um fator genético responsável pela expressão desses antioxidantes. A dissimilaridade ocorrida entre os acessos ITU, ZR1, HAG e LAV (Itumirim, Itumirim ZR₁, Horta – DAG UFLA e Lavras MG, respectivamente), também pode ser explicada pelos mesmos fatores acima citados, pois esses acessos demonstraram que mesmo provenientes de locais próximos, não foram agrupados como similares quanto aos teores de fenóis totais e flavonoides.

O teor de compostos fenólicos pode variar não somente devido ao local de origem da planta, mas folhas localizadas em diferentes alturas na planta, também demonstram possuir teores distintos desses compostos. Ou; Schmierer; Rades et al. (2013) demonstraram que as folhas das regiões inferiores apresentam menores valores de compostos fenólicos que as folhas de outras regiões da planta.

No ensaio de Capacidade Antioxidante Total (CAT) a inserção desta variável influenciou a distribuição das coordenadas no espaço dimensional (Figura 8) exibindo similaridade entre os acessos ITU, HAG e UPR; entre POA e ZR2 e entre LAV e DAG. As variáveis demonstraram independência entre si no biplot, corroborando com a confiabilidade dos resultados; variáveis dependentes tendenciam os resultados.

Figura 8 - Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis fenóis, flavonoides, poder redutor e CAT.



Legenda: (A) Biplot com eixos preditivos considerando as variáveis Fenóis, Flavonoides, Poder Redutor e CAT. (B) Minimização da função STRESS ilustradas na Figura A.

Conforme Prieto; Pineda e Aguilar (1999) a avaliação pelo método fosfomolibdênio, mede a capacidade antioxidante total e detém a vantagem de avaliar componentes lipofílicos e hidrofílicos. Ademais, esse método permite avaliar uma mistura complexa de compostos, como extratos e frações obtidos de plantas (MERINO; OLIVEIRA; PAULA et al. 2015). Este método é quantitativo, uma vez que a atividade antioxidante é expressa como o número de equivalentes de ácido ascórbico.

Semelhante aos outros biplots o acesso ZR1 se manteve estável no posicionamento espacial, apresentando dissimilaridade com os demais acessos em todos os ensaios realizados e independente da inserção de qualquer variável. Em geral, este acesso apresentou um perfil de ação antioxidante diferente dos demais, sugerindo estudos mais aprofundados com o intuito de verificar as causas dessa dissimilaridade.

3.3 Polimorfismo demonstrado pelo ISSR-PCR

Dos 55 iniciadores testados, 18 apresentaram qualidade na amplificação dos fragmentos de DNA e 2 tiveram suas temperaturas de anelamento otimizadas. As sequências e as temperaturas de anelamento estão descritas na Tabela 5. O número total de bandas amplificadas foi de 248, numa média de 14,59 bandas por primer, contendo de 100 a 800 pb. Destes, 84 apresentaram-se polimórficos, em média 4,94 fragmentos, variando de 2 (UBC 878) a 8 (UBC 848) fragmentos polimórficos, com percentual de 18% a 100% de polimorfismo (Tabela 5).

Tabela 5 - Identificação, temperatura de anelamento e polimorfismo de *Sonchus oleraceus* com 17 iniciadores ISSR. (continua)

Iniciadores	Sequência (5' -3')	T (°C)	N° de fragmentos		
			amplificadas	polimórficas	Total P %
UBC 1	(AC)8-TT	50	16	4	25
UBC 3	(AC)8-TG	50	16	6	38
UBC 810	(GA)8-T	50	16	7	44
UBC 812	(GA)8-A	50	10	3	30

Tabela 5 – Identificação, temperatura de anelamento e polimorfismo de *Sonchus oleraceus* com 17 iniciadores ISSR. (Conclusão)

UBC 827	(AC)8-G	50	20	5	25
UBC 830	(TC)8-G	50	19	5	26
UBC 834	(AG)8-YT	50	22	4	18
UBC 845	(CT)8-RG	50	16	6	38
UBC 848	(CA)8-RG	48	20	8	40
UBC 849	(GT)8-YA	48	13	5	38
UBC 858	(TG)8-RT	50	15	4	27
UBC 860	(TG)8-RA	50	21	6	29
UBC 864	(ATG)6	50	6	6	100
UBC 868	(GGA)6	50	9	5	56
UBC 878	(GGAT)3-GGA	50	2	2	100
UBC 881	(GGGGT)3	50	14	5	36
UBC 884	HBH(AG)7	50	13	3	23
Média		49.76	14.59	4.94	41
Total			248	84	

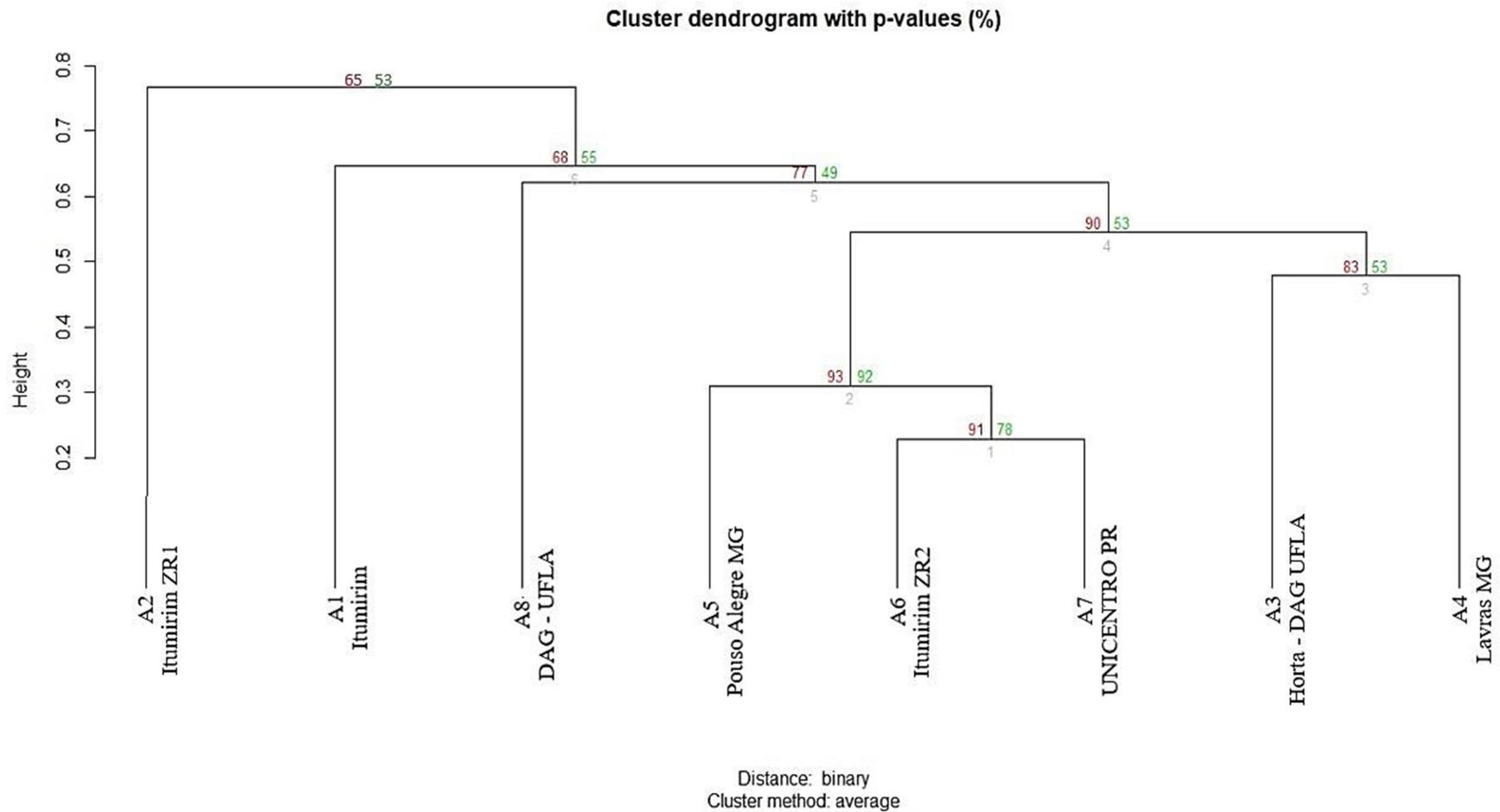
Os iniciadores UBC 864 e UBC 878 foram os que proporcionaram maior polimorfismo. O tamanho dos fragmentos amplificados foi em média de 100 a 600 pb para UBC 848; de 200 a 600 pb para UBC 849; de 200 a 700 pb para UCB 860 e de 100 a 800 pb para UBC 864.

3.4 Diversidade genética e conteúdo de DNA

Considerando a dissimilaridade genética de acordo com o método do “vizinho mais próximo”, verificou-se a formação de seis grupos distintos, com similaridade média de 0,5 (Figura 9). O grupo I é representado pelos acessos ZR2 e UPR; o grupo II pelo acesso POA, o III pelos acessos HAG e LAV, o IV pelo acesso DAG, o V pelo acesso ITU e o grupo VI pelo acesso ZR1.

Em relação ao agrupamento pelo método Hierárquico do “vizinho mais próximo”, baseado na distância Euclidiana (Figura 9), pode-se observar maior similaridade entre os acessos ZR2 e UPR (77,14%), cujas sementes tiveram origem na zona rural de Itumirim MG e no UNICENTRO no estado do Paraná, respectivamente, sendo isolados no dendrograma em um único grupo. A menor similaridade encontrada foi nos acessos ZR1 (23%), seguido do

Figura 9 - Dendrograma de dissimilaridade genética entre 8 acessos de *Sonchus oleraceus*, com base na matriz de dissimilaridade com dados quantitativos.



Legenda: Eixo x = distâncias relativas. Eixo y = identificação dos acessos.

Fonte: Da autora (2019).

acesso ITU (35%) e do acesso DAG (38%), em que as sementes foram originadas da zona rural de Itumirim ZR₁, do centro de Itumirim e do DAG, respectivamente.

Houve uma tendência de acessos oriundos de Estados diferentes agruparem próximos, como Itumirim (ZR₂) e UNICENTRO PR (UPR); bem como apresentarem como dissimilares acessos provenientes de localidades de uma mesma região, como por exemplo, Itumirim (ZR₁), Itumirim (ITU) e DAG - UFLA. O acesso ZR₁ com menor percentual de similaridade também mostrou-se dissimilar no seu teor de fenóis totais e flavonoides, bem como nos potenciais antioxidantes. A partir dessa análise é possível inferir que a dissimilaridade genética, possivelmente, é um dos fatores que influenciou o conteúdo de compostos fenólicos e a dissimilaridade do acesso ZR₁.

Com relação ao conteúdo de DNA (Tabela 6) não se observou diferenças significativas pelo teste F entre os acessos estudados, embora a amplitude tenha variado de 1,59 no acesso ZR₁ a 1,97 no acesso POA.

Tabela 6 - Conteúdo de DNA de 8 acessos de *S. oleraceus*.

Acessos	Conteúdo de DNA
A2 Itumirim ZR ₁	1,59a
A6 Itumirim ZR ₂	1,68a
A8 DAG – UFLA	1,71a
A1 Itumirim	1,72a
A4 Lavras MG	1,75a
A3 Horta – DAG UFLA	1,77a
A7 UNICENTRO PR	1,90a
A5 Pouso Alegre MG	1,97a

Itumirim ZR₁ = Zona Rural 1; Itumirim ZR₂ = Zona Rural 2; DAG UFLA = Departamento de Agricultura da UFLA; UNICENTRO PR = Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, PR. Letras minúsculas na coluna seguidos das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

Segundo Schifino-Wittmann (2001) a determinação da quantidade de DNA nuclear pode substituir a contagem de cromossomos, em particular, quando se trabalha com um número muito grande de indivíduos. Conhecer o número de cromossomos, além de

importante para a caracterização do germoplasma é imprescindível para os trabalhos de melhoramento genético, quando são programados cruzamentos.

Em geral, indivíduos com genomas pequenos são encontrados sob uma ampla variedade de condições, enquanto aqueles com genomas maiores são encontrados apenas sob condições moderadas, fora de zonas ambientais extremas (KNIGHT; MOLINARI; PETROV. 2005). A variedade de tamanhos de genoma em uma única espécie está relacionada à capacidade adaptativa dessa espécie (LI; HU; LUO et al. 2013).

Bennet e Leitch (1995) citam alguns dados isolados que indicam que alterações na quantidade de DNA podem ser influenciadas por fatores ambientais, mas salientam a necessidade de repetições e amplas discussões sobre o assunto, o que poderia desafiar o conceito da constância do valor C.

Esses dados corroboram com os resultados de diversidade genética de *S. oleraceus*, uma vez que esta é uma espécie encontrada em diversos países do mundo e em temperaturas e condições ambientais diversas.

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram dissimilaridade nos teores de compostos fenólicos totais entre os 8 acessos de *S. oleraceus*. Os acessos possuem atividade antioxidante, nem sempre associada ao teor de compostos fenólicos.

Por meio dos primers ISSR constatou-se a diversidade genética entre os acessos de *S. oleraceus* oriundos de diferentes locais; sendo os acessos ZR2 (Itumirim) e UPR (UNICENTRO PR) os mais similares e o acesso ZR1 (Itumirim) o mais dissimilar. Os resultados também demonstraram que os fatores genéticos influenciaram os teores de compostos fenólicos e atividades antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, S.; SAHA, S.; BANDYOPADHYAY, T. K. et al. Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon* germplasms and their suitability in molecular barcoding. **Plant Systematics and Evolution**, 301, n. 1, p. 439-450, 2015/01/01. 2015.
- AHN, M.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chem.**, 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.
- AL JUHAIMI, F.; GHAFOR, K.; AHMED, I. A. M. et al. Comparative study of mineral and oxidative status of *Sonchus oleraceus*, *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* leaves. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 11, n. 4, p. 1745-1751, 2017. Article.
- ARBOS, K. A.; FREITAS, R. J. S. d.; STERTZ, S. C. et al. Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Food Science and Technology**, 30, p. 501-506, 2010.
- BENNET, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, 76, p. 113-176, 1995.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, 28, n. 1, p. 25-30, // . 1995.
- CHAVES, A.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M. et al. *Sonchus asper* e *S. oleraceus* como reservatórios naturais de vírus em cultivos de alface no cinturão-verde de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74, p. 101-106, 04/01. 2007.
- FRAGA, M. I.; TASENDE, M. G. Mechanisms of resistance to simazine in *Sonchus oleraceus*. **Weed Research**, 43, n. 5, p. 333-340, 2003/10/01. 2003.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005/03/01. 2005.
- KNIGHT, C. A.; MOLINARI, N. A.; PETROV, D. A. The Large Genome Constraint Hypothesis: Evolution, Ecology and Phenotype. **Annals of Botany**, 95, n. 1, p. 177-190, 2005.
- LI, X.; HU, D.; LUO, M. et al. Nuclear DNA content variation of three *Miscanthus* species in China. **Genes & Genomics**, 35, n. 1, p. 13-20, 2013/02/01. 2013.
- LIMA, J. M.; SILVA, C. A.; ROSA, M. B. et al. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, 27, n. 1, p. 7-11, 03. 2009. research-article.
- LING, L. T.; YAP, S.-A.; RADHAKRISHNAN, A. K. et al. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. **Food Chemistry**, 113, n. 4, p. 1154-1159, 4/15/. 2009.
- LIU, X.; ARDO, S.; BUNNING, M. et al. Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. **LWT - Food Science and Technology**, 40, p. 552-557, 04/01. 2007.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, 613, n. 1, p. 1-19, 2008/04/14/. 2008.

MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biol Cell**, 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.

MCDOWELL, A.; THOMPSON, S.; STARK, M. et al. Antioxidant activity of puha (*Sonchus oleraceus* L.) as assessed by the cellular antioxidant activity (CAA) assay. **Phytotherapy Research**, 25, n. 12, p. 1876-1882, 2011. Article.

MERINO, F. J. Z.; OLIVEIRA, V. B.; PAULA, C. S. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 17, p. 1031-1040, 2015.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, 15, n. 12, 2010.

OLIVEIRA, D. d. S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R. et al. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, 33, n. 1, 03/29. 2011.

OU, Z. Q.; SCHMIERER, D. M.; RADES, T. et al. Application of an online post-column derivatization HPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in *Sonchus oleraceus* L. leaf extracts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 65, n. 2, p. 271-279, Feb. 2013. Article.

OYAIZU, M. Studies on Products of Browning Reaction Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S. et al. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 16, p. 189-195, 2014.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, 269, n. 2, p. 337-341, 5/1/. 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005/05/01. 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 5//. 1999.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, 31, p. 897-902, 2001.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, 28, n. 1, p. 49-55, March. 1977.

TEIXEIRA, F. F.; SANTOS, J. B. D.; RAMALHO, M. A. P. et al. QTL mapping for angular leaf spot in common bean using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5, p. 272-278, 2005.

VILELA, F. C.; PADILHA, M. D.; DOS SANTOS-E-SILVA, L. et al. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, n. 2, p. 306-310, Jul. 2009. Article.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE E CAPACIDADE MELANOGÊNICA DOS EXTRATOS DE *Sonchus oleraceus* EM ZEBRAFISH

RESUMO

Sonchus oleraceus L., espécie da família Asteraceae é popularmente conhecida no Brasil como serralha. Trata-se de uma hortaliça não convencional, também utilizada como planta medicinal no tratamento de discromias cutâneas, como o vitiligo. A medicina tradicional tem avançado devido à disseminação de informações sobre as plantas medicinais. Devido a isso, se torna imprescindível ampliar o conhecimento sobre a toxicidade e a eficácia das mesmas, a fim de aumentar a segurança no uso dos extratos de plantas. Objetivou-se avaliar a embriotoxicidade e a capacidade melanogênica dos extratos de folhas e raízes de *S. oleraceus* em zebrafish. Foram preparados extratos aquosos, hidroetanólico 70% e metanólico 50% por meio de um sistema de refluxo simples, a partir de plantas de crescimento espontâneo em áreas de cultivo orgânico e convencional de hortaliças. Os extratos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). Para os ensaios biológicos, vinte embriões de *Danio rerio* (zebrafish) fertilizados foram selecionados para testar a embriotoxicidade dos extratos de *S. oleraceus* a partir de diluições seriadas de 10 a 0,0012 mg mL⁻¹. Os embriões foram expostos aos extratos enquanto o controle foi exposto apenas ao meio E3 até 120 hpf. Para medir a capacidade melanogênica dos extratos, foram feitos dois tipos de ensaios utilizando a solução de 1-fenil-2-tiourea que inibe a melanogênese dos embriões e larvas de zebrafish. Os resultados da embriotoxicidade foram analisados usando programa estatístico Graph Pad Prisma 8.0.1 para a criação de curvas de concentração-resposta. O índice teratogênico foi calculado usando a razão de CL50/EC50 e a capacidade de pigmentação dos extratos em zebrafish foi expressa em densidade (pixel μm²). Nos resultados da cromatografia, foi caracterizado ácido clorogênico nas folhas e raízes de *S. oleraceus*. Nas folhas também foi quantificado ácido chicórico, contendo 1,52 a 4,11 mg g⁻¹ de folha, sendo identificado como o composto majoritário da planta. Os resultados dos ensaios de embriotoxicidade demonstraram que a toxicidade de *S. oleraceus* em embriões de zebrafish depende da concentração de extrato utilizado. A LC₅₀ mais elevada foi encontrada no extrato aquoso de raiz 0,08 mg mL⁻¹ e a menor no extrato metanólico de raiz 2,90 mg mL⁻¹. Doses acima de 5 mg mL⁻¹ em qualquer dos extratos, foram letais em 24h de incubação e doses abaixo de 0,0025 mg mL⁻¹ não foram embriotóxicas. O efeito teratogênico dos extratos nos embriões ocorreu a partir da concentração de 0,005 mg mL⁻¹ até 2,5 mg mL⁻¹, produzindo atraso na eclosão dos embriões, retardo no desenvolvimento embrionário, edema de pericárdio, edema de saco vitelino e lordose. Nos ensaios de capacidade melanogênica, os extratos de folhas e raízes, na concentração de 0,625 mg mL⁻¹, foram capazes de estimular a pigmentação nas larvas de zebrafish e seus resultados variaram de 0,00055 a 0,00084 pixels μm². Conclui-se que os extratos de *S. oleraceus* causaram toxicidade nos embriões de zebrafish, em uma faixa de concentração específica, todavia também possuem capacidade de pigmentação nas larvas destes mesmos animais.

Palavras-chave: Serralha. Melanogênese. *Danio rerio*. Toxicidade. CLAE-DAD.

ABSTRACT

Sonchus oleraceus L., a species of the *Asteraceae* family is popularly known in Brazil as serralha. It is an unconventional vegetable, also used as a medicinal plant in the treatment of skin disorders such as vitiligo. Traditional medicine has advanced due to the dissemination of information about medicinal plants. Because of this, it is essential to increase knowledge about toxicity and effectiveness, in order to increase safety in the use of plant extracts. The objective of this study was to evaluate embryotoxicity and melanogenic capacity of extracts of leaves and roots of *S. oleraceus* in zebrafish. Aqueous extracts, 70% hydroethanolic and 50% methanolic were prepared by means of a simple reflux system, from spontaneous growth plants in areas of organic and conventional vegetable cultivation. The extracts were subjected to high performance liquid chromatography (HPLC-DAD). For biological assays, twenty fertilized *Danio rerio* (zebrafish) embryos were selected to test the embryotoxicity of *S. oleraceus* extracts from serial dilutions of 10 to 0.0012 mg mL⁻¹. The embryos were exposed to the extracts while the control was exposed only to E3 medium up to 120 hpf. To measure the melanogenic capacity of the extracts, two types of assays were performed using the 1-phenyl-2-thiourea solution that inhibits the melanogenesis of zebrafish embryos and larvae. Embryotoxicity results were analyzed using the Graph Pad Prisma 8.0.1 statistical program to create concentration-response curves. The teratogenic index was calculated using the LC₅₀ / EC₅₀ ratio and the pigment capacity of the zebrafish extracts was expressed in density (pixel μm²). In the chromatography results, chlorogenic acid was characterized in the leaves and roots of *S. oleraceus*. Chicoric acid was also quantified in the leaves, containing 1.52 to 4.11 mg g⁻¹ of leaf, being identified as the major compound of the plant. The results of the embryotoxicity tests demonstrated that the toxicity of *S. oleraceus* in zebrafish embryos depends on the concentration of extract used. The highest LC₅₀ was found in the aqueous root extract 0.08 mg mL⁻¹ and the lowest in the methanol extract of root 2.90 mg mL⁻¹. Doses above 5 mg mL⁻¹ in any of the extracts were lethal within 24 hours of incubation and doses below 0.0025 mg mL⁻¹ were not embryotoxic. The teratogenic effect of the extracts on the embryos occurred from the concentration of 0.005 mg mL⁻¹ to 2.5 mg mL⁻¹, producing delay in the embryo's hatching, delayed embryonic development, pericardial edema, yolk sac edema and lordosis. In the tests of melanogenic capacity, the extracts of leaves and roots, in the concentration of 0.625 mg mL⁻¹, were able to stimulate the pigmentation in the zebrafish larvae and their results ranged from 0.00055 to 0.00084 μm² pixels. It is concluded that the extracts of *S. oleraceus* caused toxicity in the zebrafish embryos, in a specific concentration range, however they also have pigmentation capacity in the larvae of these same animals.

Keywords: Serralha. Melanogenesis. *Danio rerio*. Toxicity. CLAE-DAD.

1 INTRODUÇÃO

Várias plantas medicinais têm sido utilizadas durante décadas pela população com o propósito de obter efeitos benéficos à saúde. *Sonchus oleraceus* L. é uma planta medicinal e também uma hortaliça não convencional, originária da Europa, conhecida no Brasil como serralha. Pertencente à família Asteraceae é uma hortaliça que possui inúmeros benefícios para a saúde humana. Na medicina popular o uso de suas folhas, na forma de infusões, tem sido utilizado em pessoas acometidas discromias cutâneas, como o vitiligo.

O vitiligo, conhecido por provocar manchas brancas na pele, é uma doença de causas não muito claras. De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia, cerca de 1% da população mundial possui o vitiligo. Esta doença causa muito mais do que manchas esbranquiçadas na pele, ela também gera impacto negativo no psicológico dos pacientes.

As plantas medicinais possuem valores inestimáveis como fonte de agentes terapêuticos. A fitoterapia e a medicina tradicional têm passado por um reavivamento e avanço em um ritmo mais acelerado devido à aceitação do público como uma terapia, todavia algumas plantas causam interações medicamentosas adversas e efeitos tóxicos. Por este motivo, existe uma grande preocupação com a avaliação toxicológica de plantas medicinais.

A espécie *Danio rerio*, também conhecido como zebrafish ou Paulistinha, tem sido cada dia mais utilizado em ensaios biológicos, principalmente em estudos que avaliam a toxicidade de um substrato, por ser uma espécie que possui 70% dos seus 26.000 genes homólogos aos dos seres humanos e 84% de homologia dos genes envolvidos em doenças humanas (ESCALEIRA. 2017).

Além dessas características, o zebrafish também detém outras vantagens para seu uso, como alta taxa reprodutiva, rápido desenvolvimento e transparência, tanto natural quanto induzida, que facilita a visualização e análise de diversas partes e órgãos do animal. Estas e outras vantagens fazem deste peixe um importante modelo vertebrado para pesquisas biológicas, como por exemplo, em ensaios de toxicidade e capacidade melanogênica.

A avaliação da embriotoxicidade dos extratos *Sonchus oleraceus* é importante uma vez que várias plantas medicinais têm ganhado espaço e popularidade no mercado global de saúde e na mesa dos consumidores, alegando ter efeitos terapêuticos, porém sem informações sobre a sua toxicidade.

Por esses motivos, objetivou-se com este estudo avaliar a embriotoxicidade e a capacidade melanogênica de extratos de folhas e raízes de *Sonchus oleraceus*, oriundos de áreas de cultivo orgânico e convencional, em zebrafish.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado, folhas e raízes de *Sonchus oleraceus*, são provenientes de plantas adultas e de crescimento espontâneo em canteiros de duas regiões distintas da Coleção de Germoplasma de hortaliças não convencionais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A primeira, localizada em uma área de cultivo orgânico de hortaliças e a segunda localizada em uma área de cultivo de hortaliças, onde foi pulverizado o herbicida Roundup®, que contém glifosato em sua constituição. Esta segunda área é denominada neste trabalho como “cultivo convencional”. Ambas as áreas recebiam sol pleno e *S. oleraceus* crescia espontaneamente, como uma planta invasora, quando foi coletada. Este material foi obtido no período de maio a agosto de 2019. Latitude 21°14’S, longitude 45°00’W e altitude média de 918 metros, no município de Lavras (MG).

2.2 Obtenção e extração de *Sonchus oleraceus*

Foram coletados, entre as 7h e 9h da manhã, folhas de toda a parte aérea e raízes de *S. oleraceus*. As folhas e raízes foram lavadas em água destilada e os extratos foram preparados a 10% (p/v) empregando-se um sistema de refluxo a partir dos materiais vegetais frescos. Estes materiais foram cortados em fragmentos de 1 cm² e destilados em solução de água destilada, etanol 70% e metanol 50% por 20 minutos. Posteriormente, os extratos foram filtrados a vácuo e concentrados em evaporador rotatório a 40°C, sob pressão reduzida, até resíduo. Os rendimentos extrativos foram determinados e expressos em porcentagem (g.100g⁻¹ de folhas frescas). Os extratos foram armazenados em freezer a -20 °C até as análises. Ao total foram produzidos 12 extratos conforme Tabela 7.

Tabela 7 - Extratos de *S. oleraceus* utilizados na condução dos ensaios em zebrafish.

		Orgânico		Convencional	
Parte utilizada		Solvente		Solvente	
Folha	Extrato 1	H ₂ O		Extrato 7	H ₂ O
	Extrato 2	Etanol 70%		Extrato 8	Etanol 70%
	Extrato 3	Metanol 50%		Extrato 9	Metanol 50%
Raiz	Extrato 4	H ₂ O		Extrato 10	H ₂ O
	Extrato 5	Etanol 70%		Extrato 11	Etanol 70%
	Extrato 6	Metanol 50%		Extrato 12	Metanol 50%

Fonte: Da autora (2020).

2.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

Os perfis cromatográficos e as análises quantitativas por CLAE-DAD foram realizados em um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha) equipado com uma bomba quaternária (G1311A) com sistema desgaseificador (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A) e conjunto aquecedor TCC (G1316A). Utilizou-se um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G1315D) para obter cromatogramas a 210 nm em raízes e 320 nm em folhas e os espectros no UV de 190 a 400 nm também foram registrados on-line. O equipamento foi controlado pelo *software* OpenLAB versão A07.04, build 04.07.28. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa C18 (Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies®, EUA) com um empacotamento à base de sílica (5 µm × 150 mm × 4,6 mm I.D.) e pré-coluna (5 µm × 12,5 mm × 4,6 mm I.D.). As condições operacionais de análises estão descritas abaixo conforme a análise.

2.3.1 Preparo das amostras

Para obtenção das soluções amostras, 10 mg de cada extrato (raízes e folhas) foram pesados para microtubos e adicionado 1 mL de MeOH grau CLAE. A suspensão foi mantida em banho de ultrassom por 15 min para auxiliar na solubilização da amostra. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8.400 g por 10 min. Empregaram-se os sobrenadantes para

análise por CLAE. Foram injetadas alíquotas de 10 µL dos sobrenadantes, de modo automático, no sistema cromatográfico.

2.3.2 Análises qualitativas de perfis cromatográficos

Inicialmente, para extratos de folhas e raízes foi utilizado um perfil cromatográfico exploratório empregando-se um gradiente linear de H₂O (A) e CH₃CN (B): 0 min 95% A, 5% B; 60 min 5% A, 95% B, seguido de 10 min de eluição isocrática. O fluxo da coluna foi de 1,0 mL/min e temperatura de forno a 40 °C. Nesta e em todas as condições posteriormente avaliadas foi adicionado ácido fosfórico a 0,1% aos eluentes, o volume de injeção das amostras foi de 10 µL e a detecção, salvo na condição estabelecida para os extratos de folha, registradas no UV₂₁₀.

Considerando dados de estudos fitoquímicos relatados para a espécie (ALREKABI; HAMAD. 2018; OU; SCHMIERER; RADES et al. 2013; XU; LIANG. 2005) os perfis cromatográficos exploratórios foram comparados com tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com as substâncias de referência ácidos chicórico, clorogênico, gálico e cafeico e os flavonóides rutina e quercetina (Sigma-Aldrich[®], pureza declarada acima de 95%), a fim de caracterizar a presença dessas substâncias nos extratos. As soluções de referência individuais foram preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹ em metanol grau CLAE. Uma solução contendo um *pool* de alíquotas de 100 µL de cada solução de referência foi preparada diretamente em *vial* e injetadas no cromatógrafo.

Para os extratos de raízes de *Sonchus oleraceus* a condição exploratória foi ajustada visando obter apenas menor tempo de análise. A condição estabelecida para os extratos de raízes de *Sonchus oleraceus* está descrita na Tabela 8.

Tabela 8 - Gradiente de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD de amostras de raízes.

Tempo	A (%)	C (%)
0	95	5
27	59	41
32	45	55
37	95	5
42	95	5

Legenda: A = água. C = acetonitrila. Ambos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico.

Para os extratos de folhas de *Sonchus oleraceus*, as análises dos perfis cromatográficos e co-injeção com as substâncias de referência indicaram para o pico majoritário das amostras a presença de ácido chicórico. Assim, visando melhorar a resolução dos picos de interesse e diminuir o tempo de análise foram avaliadas diversas modificações na condição cromatográfica relacionadas a parâmetros de resolução, incluindo modificador orgânico (CH₃CN e MEOH), vazão, temperatura, inclinação do gradiente, eluição alternada com MEOH e CH₃CN e comprimento de onda de detecção. Com isto, a condição estabelecida para a quantificação de ácido chicórico nos extratos de folhas de *Sonchus oleraceus* foi a descrita na Tabela 9.

Tabela 9 - Gradiente de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD de amostras de folhas.

Tempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	95	5	0
17	70	30	0
17,1	82	0	18
25	76	0	24
30	5	50	45
32	5	95	0
34	5	95	0
39	95	5	0
45	95	5	0

Legenda: **A** = água. **B** = MeOH. **C** = acetonitrila. Todos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico. Fluxo: 1 mL/min. Temperatura do forno: 25 °C. Detecção: UV₃₂₀.

2.3.3 Quantificação do ácido chicórico nos extratos de folhas de *Sonchus oleraceus*

A quantificação de ácido chicórico nos extratos de folhas de *Sonchus oleraceus* foi realizada empregando-se o método por CLAE-DAD desenvolvido (Tabela 9). A confiabilidade da condição estabelecida foi examinada por testes de adequação do sistema, seletividade, estimativa das faixas de trabalho e linearidade.

Os ensaios de adequabilidade de sistema para o pico referente ao ácido chicórico compreenderam a avaliação da pureza de 3 pontos (P), resolução (Rs), números de pratos

teóricos (N), fator de cauda (T), fator de retenção (k), fator de cauda (T) e repetibilidade da resposta dos picos [DPR do tempo de retenção do ácido chicórico ($n = 5$)]. Os dados foram obtidos pelo programa EZChrom® (Agilent) versão OpenLab, de acordo com as equações recomendadas pela United States Pharmacopoeia (USP), sendo os resultados expressos como valor médio de 6 determinações. Os resultados foram comparados com os limites recomendados pelo Fda (2000). Para se estabelecer o tempo morto (t_0) da corrida cromatográfica, injetou-se no sistema, nas mesmas condições de análise, 10 μL de solução de nitrato de sódio 0,01% (p/v) preparada na fase móvel.

A seletividade do pico referente ao ácido chicórico foi avaliada pela homogeneidade dos espectros registrados no comprimento de onda de 230 nm nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos, sendo considerado puro sua exata sobreposição.

As estimativas das faixas de trabalho foram estabelecidas na área média referente ao pico do ácido chicórico nas seis amostras de extratos de folhas de *Sonchus oleraceus*.

A linearidade foi determinada pelo método do padrão externo, utilizando-se cinco concentrações distintas (RIBANI; BOTTOLI; COLLINS et al. 2004). Para isto, foram preparadas duas réplicas da solução de referência de ácido chicórico. Pesaram-se, precisamente 1 mg de ácido chicórico, em papel manteiga, o qual foi transferido para balões volumétricos de 1 mL. Dissolveu-se em MeOH grau CLAE e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se as soluções na concentração final de 1,0 mg mL⁻¹. As curvas analíticas foram determinadas em relação à massa injetada de cada substância de referência, em dois dias consecutivos. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de uma faixa de 2 a 10 μL da solução de referência, conforme indicado na Tabela 10.

Tabela 10 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção das curvas analíticas de ácido chicórico.

Volume (μL)	Massa (μg)
Solução de referência 1,0 mg/mL	
10	8,0
8	6,4
6	4,8
4	3,2
2	1,6

Fonte: Da autora (2020).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos (R_2) mínimos quadrados e os coeficientes de determinação correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de variância ($p < 0,05$). Os dados quantitativos de ácido chicórico foram expressos em mg g^{-1} de folha fresca, calculados a partir da equação média das curvas analíticas.

2.4 Manejo das matrizes zebrafish e instalações

O experimento foi realizado na Ala de Peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, MG. Os ensaios com os embriões foram realizados nos meses de agosto a dezembro de 2019. Todos os ensaios envolvendo o uso de peixes foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal incluídos nas normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA, tendo sido aprovados pela mesma e estando o projeto protocolado sob nº PVDAG230-2019.

As matrizes de *Danio rerio* (Zebrafish), de aproximadamente sete a oito meses de idade, foram mantidas em uma rack (Hydrus-Alesco) específica para a espécie, em aquários de policarbonato, com tamanho de 11,5cm x 34,5cm x 15,5cm, com capacidade para 15 peixes. A qualidade da água e temperatura de 28°C foram controlados de forma automatizada pela raque e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, a primeira alimentação com ração comercial (Nutrifish-Floculada), a segunda com o microcrustáceo *Artemia salina* e mantidos em ciclo de luz 14:10 (claro/escuro) (DAMMSKI; MULLER; GAYA et al. 2011).

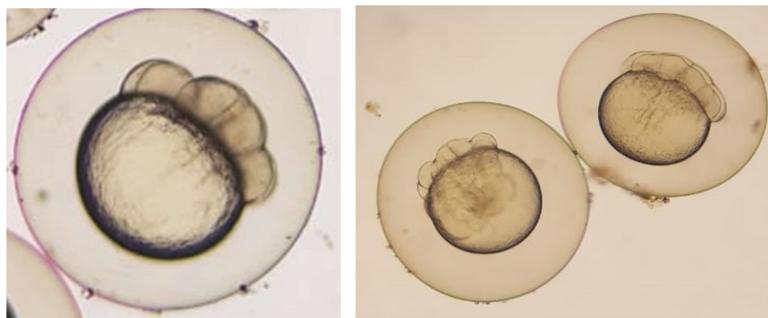
2.5 Obtenção dos embriões

Para a reprodução, os adultos de *D. rerio* foram separados de acordo com o sexo (aproximadamente 100 machos e 50 fêmeas) no dia anterior a cada reprodução, em pequenas criadeiras, com sistema de oxigenação constante e temperatura controlada a 28°C, com manutenção do fotoperíodo de 14 horas luz/ 10 horas escuro. Foram selecionadas as fêmeas com ventres abaulados e machos com coloração amarelada forte nas nadadeiras peitorais. No dia seguinte pela manhã, os machos foram acondicionados na criadeira das fêmeas (2 machos/1 fêmea) uma hora antes do término do período escuro (LAMMER; CARR; WENDLER et al. 2009; LAMMER; KAMP; HISGEN et al. 2009). Estas mudanças estimulam o comportamento

de acasalamento e a liberação dos gametas no ciclo de luz seguinte. Nas criadeiras foi utilizado um fundo gradeado para que os ovos passem para o fundo do aquário, se mantendo separado dos peixes, a fim de evitar o canibalismo.

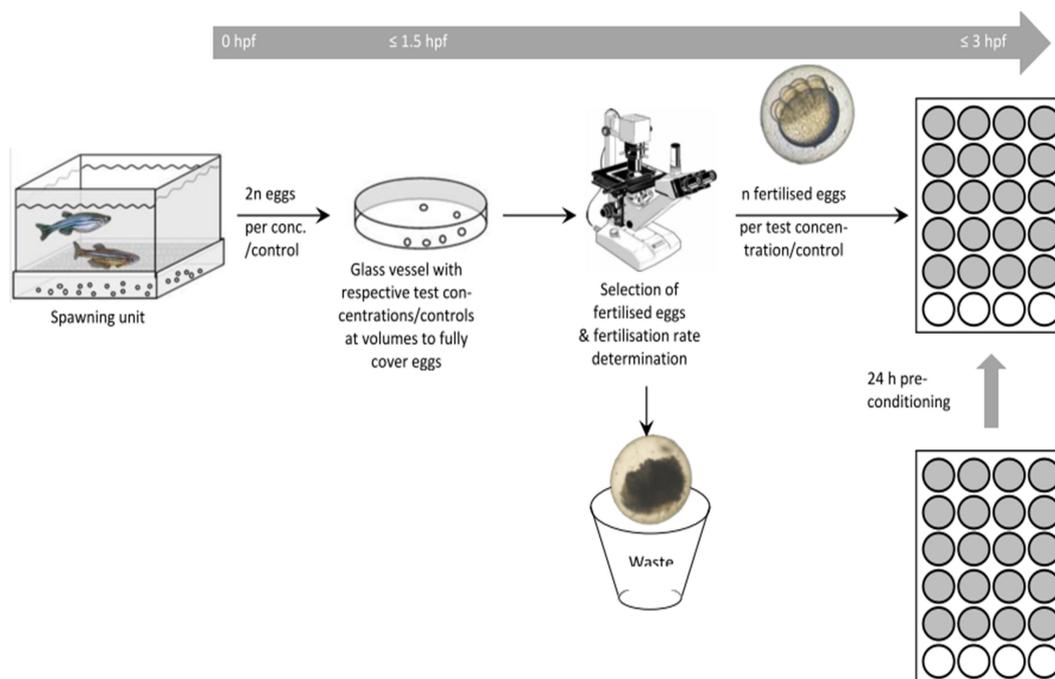
Após a reprodução, os embriões foram coletados e mantidos em meio E3, em placas de Petri. Os embriões com desenvolvimento normal (Figura 10) foram selecionados para os ensaios (Figura 11). O meio E3 permite a padronização do desenvolvimento embrionário do zebrafish; este meio E3 é composto por 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, e 0,1% de azul de metileno (DI PRINZIO; BOTTA; BARRIGA et al. 2010).

Figura 10 - Embriões com desenvolvimento normal.



Fonte: Da autora (2019).

Figura 11 - Procedimento do teste de toxicidade aguda do embrião de zebrafish.



Fonte: Oede (2013).

Todos os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho, tanto a reprodução quanto os testes toxicológicos, seguem especificações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE. 2013).

2.6 Preparação dos extratos para os ensaios

Os extratos brutos de cada amostra de *Sonchus oleraceus* foram pesados em balança de precisão e feito diluições seriadas em meio E3 em tubos Falcon e homogeneizados com auxílio de banho de ultrassom. Em seguida as amostras diluídas foram centrifugadas e retirado o sobrenadante. As diluições seriadas foram feitas nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,020; 0,010; 0,005; 0,0025 e 0,0012 mg mL⁻¹. Estas concentrações foram utilizadas para todos os ensaios realizados.

2.7 Teste de embriotoxicidade aguda em embriões

A exposição de embriões e larvas de zebrafish aos extratos foi realizada de acordo com o método descrito pela Ocd (2013) (teste nº 236) e Sy Mohamad; Mohd Said; Abdul Munaim et al. (2019). Foram selecionados 40 ovos fertilizados para cada tratamento; colocados em placa de Petri e tratados com 10 mL dos extratos diluídos. O controle negativo foi tratado com 10 mL do meio E3. Os embriões foram mantidos nas placas de Petri em estufa a 28°C por 24 horas. Após este período, foram selecionados 20 embriões saudáveis (n=20) de cada tratamento e foram alocados em placas de 96 poços, contendo 1 embrião por poço em 200 µL de extrato e no controle negativo contendo 200 µL do meio E3. As placas de 96 poços foram mantidas a 28°C durante todo o desenvolvimento embrionário e início do período larval (120 horas) e cobertas com Parafilm® para evitar o possível efeito de evaporação. Uma réplica é considerada válida quando a mortalidade e malformação de embriões do controle negativo é igual ou inferior a 10% no final da exposição de 96 horas (SY MOHAMAD; MOHD SAID; ABDUL MUNAIM et al. 2019).

Os embriões foram analisados individualmente a cada 24 horas até completar 120 horas pós fertilização (hpf). Os parâmetros de desenvolvimento avaliados em embriões e larvas durante a exposição de 120 horas foram: coagulação dos ovos, eclosão das lavras, mortalidade de embriões e larvas, ausência de desenvolvimento de somitos, desenvolvimento

dos olhos, movimentos espontâneos, presença de circulação na aorta dorsal, edema durante a formação do coração, ausência de deslocamento da cauda, falta de batimentos cardíacos, retardo de crescimento e deformidade morfológica (lordose) (Tabela 11). As larvas e embriões foram examinados diariamente com o auxílio de um microscópio óptico Olympus CX22LED para verificar as alterações do corpo em cada concentração, para determinação da embriotoxicidade. Ao todo 14 concentrações diferentes de cada extrato de *S. oleraceus* foram testadas quanto aos efeitos embriotóxicos e teratogênicos no desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish.

Tabela 11 - Características morfológicas avaliadas como medidas para o potencial embriotóxico e teratogênico de *S. oleraceus* ao longo de 120 horas.

Estágio de vida	Embriotoxicidade	Teratogênese	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
Ovo	Coagulação do ovo		√	√	√	√	√
		Somitos	√	√	√	√	√
		Movimentos espontâneos	√	√	√	√	√
		Olhos	√	√	√	√	√
		Deslocamento da cauda	√	√	√	√	√
		Circulação	√	√	√	√	√
		Batimentos cardíacos	X	√	√	√	√
		Retardo de crescimento	√	√	√	√	√
Eclosão (Larva)	Larva viva						
		Lordose	X	X	√	√	√
		Edema	X	√	√	√	√

hpf: horas pós fertilização. √: observação do desenvolvimento normal. X: não observação/não desenvolvimento. Fonte: Alafiatayo; Lai; Syahida et al. (2019) adaptado.

2.8 Avaliações do Índice Teratogênico (IT)

O método descrito por Selderslaghs; Van Rompay; De Coen et al. (2009) foi utilizado para a avaliação dos dados do índice teratogênico. Nos tempos de 24, 48, 72, 96 e

120 hpf, a mortalidade/embriotoxicidade e as alterações morfológicas dos embriões foram avaliadas usando um microscópio óptico Olympus CX22LED.

A cada indivíduo no experimento foram atribuídas pontuações para malformação e mortalidade a cada 24 horas, o que levou à determinação da porcentagem efetiva de cada concentração em 120 hpf. A porcentagem de toxicidade do extrato foi determinada como a proporção de embriões e/ou larvas mortas sobre o número total de embriões iniciais (20 ovos fertilizados). Além disso, a porcentagem de malformação para 24, 48, 72, 96 e 120 hpf foi determinada como a proporção de embriões malformados e/ou larvas sobre o número de embriões que estavam vivos.

2.9 Análise de concentração-resposta

A análise de concentração-resposta foi calculada de acordo com procedimentos descritos por Alafiatayo; Lai; Syahida et al. (2019). Utilizou-se o programa Graph Pad Prisma 8.0.1 para a criação de curvas de concentração-resposta para os dados de teratogênese, letalidade. Os dados foram apresentados em forma de curvas sigmoidais. A curva de concentração-resposta foi utilizada na determinação dos valores de LC₅₀ (letalidade) e EC₅₀ (efeito teratogênico). As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$.

2.10 Ensaio da capacidade melanogênica dos extratos de *S. oleraceus* em *Danio rerio*

A exposição de embriões e larvas de zebrafish à 1-fenil-2-tiourea (PTU; Sigma - Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) e extratos foi realizada de acordo com o método descrito por Voelz; Gratacap e Wheeler (2015). Após coleta dos embriões, estes foram mantidos em placas de Petri contendo meio E3 a 28°C por 24 horas. Após este período, foram selecionados 50 embriões saudáveis (n=50) para cada concentração de cada extrato e para os grupos controle positivo e negativo. A solução estoque de feniltiourea (PTU) foi preparada a 0,3% em meio E3. Posteriormente, a solução de PTU de trabalho foi preparada a 2% em meio E3, sendo adicionada 11 mL em cada placa contendo embriões com 24 hpf e trocada 24h depois. Em 72 hpf a solução de PTU foi retirada e adicionados os extratos nas concentrações de 0,625; 0,039 e 0,0025 mg mL⁻¹. Neste experimento foram realizados dois tipos de ensaios:

- a) No primeiro ensaio, a solução contendo os extratos foi preparada em PTU 2%. O grupo controle positivo foi tratado somente com PTU 2% e o controle negativo tratado somente com meio E3 (Tabela 12). Após despigmentação (72 hpf), as larvas foram mantidas na solução extrato + PTU até 144 hpf.
- b) No segundo ensaio, após despigmentação (72 hpf), as larvas foram lavadas 3x em meio E3 e os extratos foram preparados também em meio E3. As larvas foram mantidas na solução de extrato até 144 hpf. O controle positivo foi tratado com PTU 2% e em 72 hpf foi retirado e adicionado meio E3. O controle negativo tratado somente com meio E3 (Tabela 12).

Em ambos os ensaios as larvas foram fixadas em formalina 10% (v/v), às 144 hpf.

Tabela 12 - Esquema da metodologia de exposição de embriões e larvas de zebrafish à feniltiourea (PTU) e extratos.

	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf	144 hpf
Ensaio 1	Adição de PTU 2%	Renovação do PTU 2%	Adição de extrato com PTU 2%	Avaliação	Avaliação	Fixação das larvas
Ensaio 2	Adição de PTU 2%	Renovação do PTU 2%	Lavagem das larvas. Adição de extratos sem PTU 2%	Avaliação	Avaliação	Fixação das larvas

Fonte: Da autora (2020).

O conteúdo de melanina dos embriões tratados foi estimado usando o software de análise IMAGEJ 1.52a. Dez embriões representativos de cada grupo de dosagem, incluindo o controle positivo e negativo, foram fotografados aleatoriamente. A área da cabeça (dorso) foi delimitada e a densidade foi calculada para determinar o teor de pigmentação. A densidade é o produto da área delimitada e seu valor médio de cinza. De acordo com Grisola e Fuentes (2017), maior valor de densidade significa maior pigmentação. Para os resultados da pigmentação de zebrafish, observou-se o nível de significância do teste de F e foram realizados os testes das médias por meio do Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade, onde se utilizou o programa SISVAR ® (FERREIRA. 2011).

3 RESULTADOS

3.1 Análise qualitativa dos perfis cromatográficos

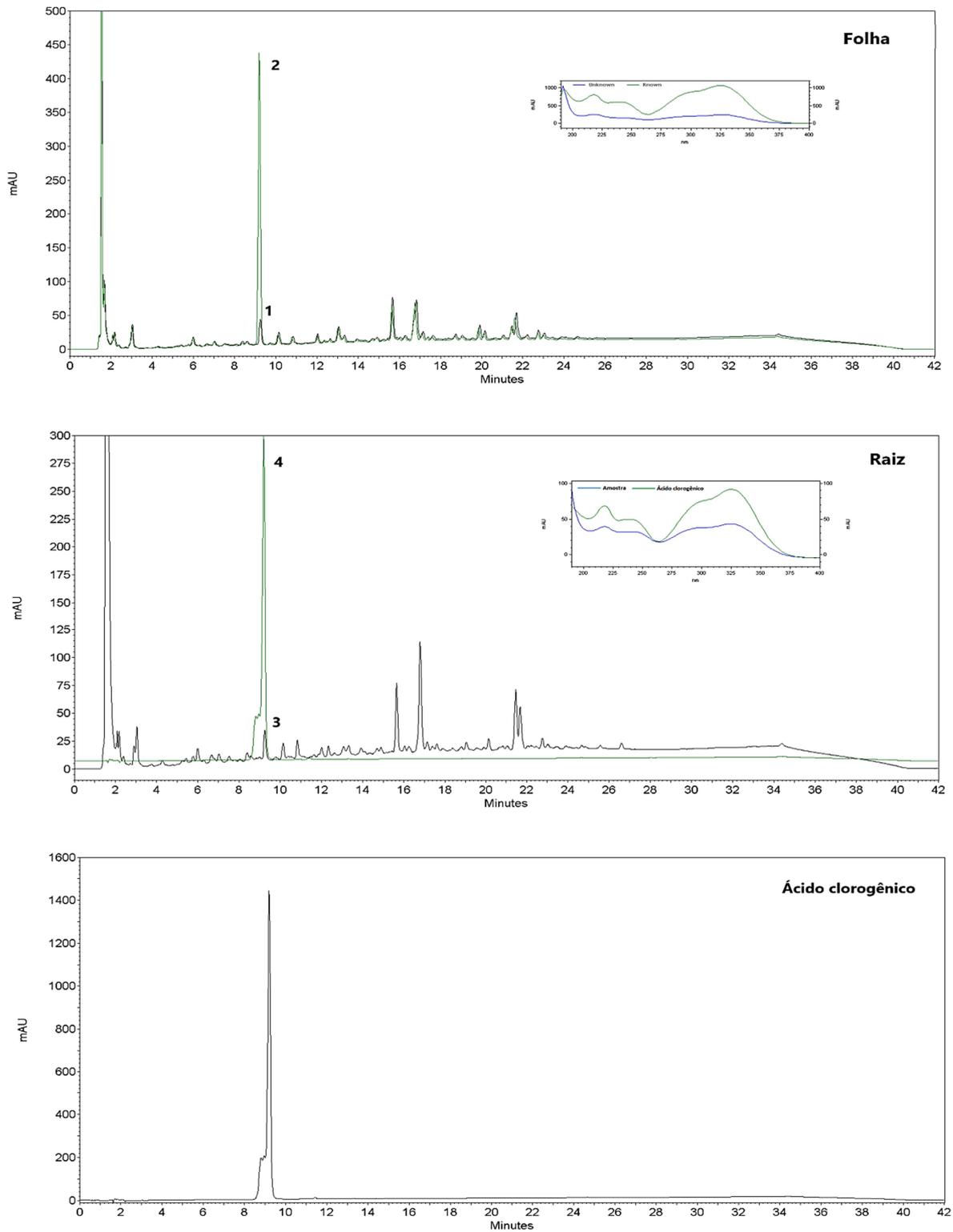
Análises de perfis cromatográficos obtido por CLAE para extratos vegetais em condições padronizadas, denominado “impressão digital”, revela sua constituição qualitativa e permite caracterizar o perfil químico do material analisado. A obtenção dos perfis por CLAE-DAD teve o objetivo de permitir comparações qualitativas entre o perfil metabólico dos diferentes extratos vegetais e dos materiais vegetais oriundos de cultivo orgânico e convencional.

Independente do solvente utilizado na preparação dos extratos e da origem do cultivo em área orgânica ou convencional, os perfis por CLAE-DAD dos 6 extratos de raízes foram similares. Da mesma forma, as análises dos perfis cromatográficos obtidos dos extratos de folhas indicou composição química qualitativa similar para os 6 extratos.

A co-injeção com substâncias de referência (ácidos chicórico, clorogênico, gálico e cafeico e os flavonóides rutina e quercetina) relatadas na literatura (ALREKABI; HAMAD. 2018; CHEN; TENG; CAO. 2019; LEE; SCAGEL. 2013; LI; DONG; HUANG et al. 2017; MOHAMMED. 2020; OU; SCHMIERER; RADES et al. 2013; YIN; SI; WANG. 2008) sobre o perfil metabólico conhecido de *Sonchus oleraceus* e/ou análise dos espectros no UV permitiu verificar a presença de ácido clorogênico nos extratos de raízes e folhas (TR = 9,25 e 15,81 min, respectivamente) e do ácido chicórico, como pico majoritário em todos os cromatogramas dos extratos de folhas (TR = 24,91 min). As Figuras 12 e 13 apresentam um *overlay* de um cromatograma representativo do extrato de folha e um de raiz com os de uma amostra autêntica de ácidos clorogênico e chicórico, respectivamente, e a sobreposição de seus espectros no UV obtidos *on-line* pelo detector DAD. A ocorrência dos ácidos clorogênico e chicórico já havia sido relatada para a espécie nas folhas e raízes de *S. oleraceus* (CHEN; TENG; CAO. 2019; LEE; SCAGEL. 2013; OU; SCHMIERER; RADES et al. 2013).

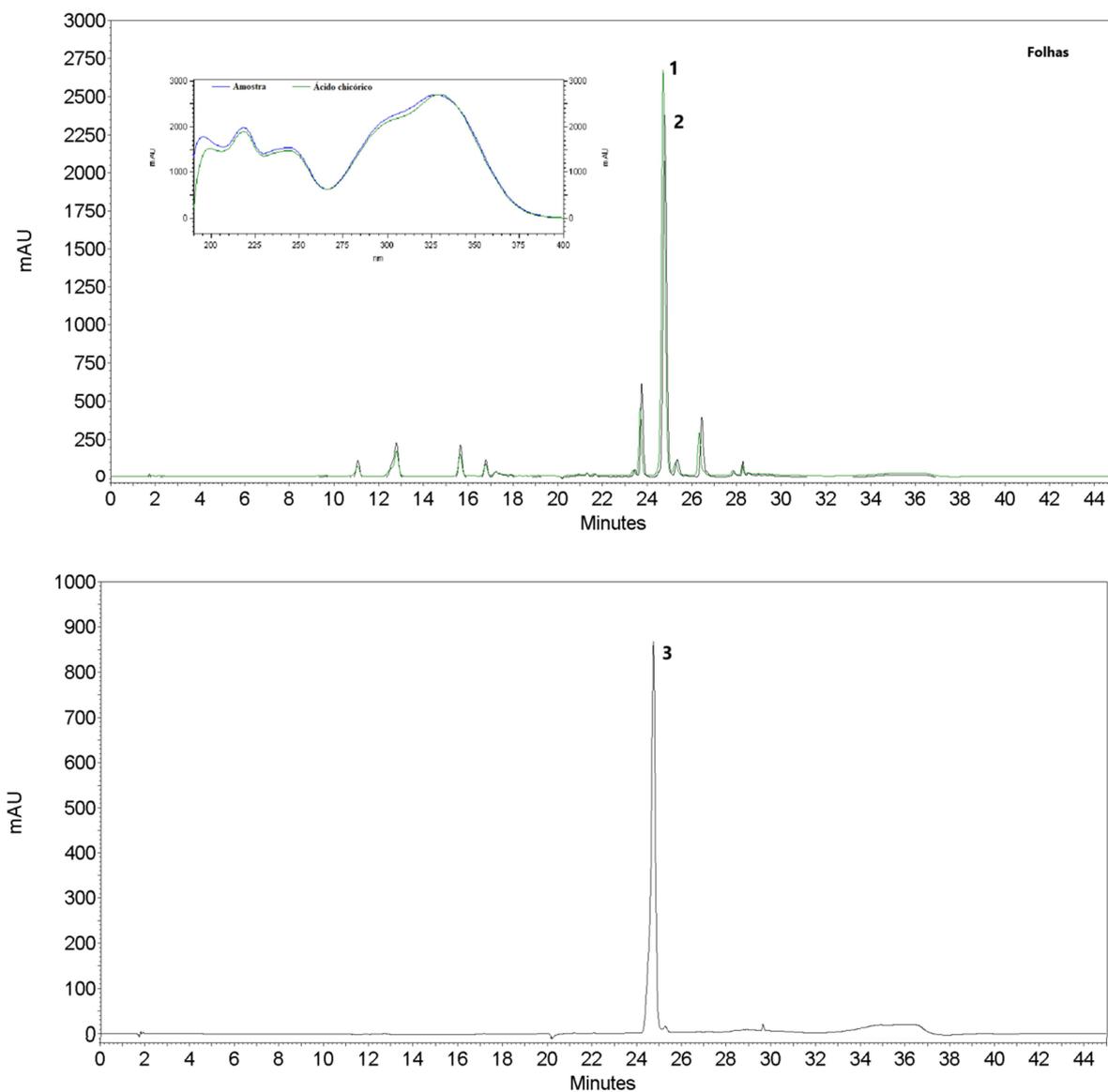
Devido à degradação ocorrida na amostra autêntica de ácido clorogênico que apresentou pureza de apenas 65% quando analisada por CLAE-DAD (Figura 12), esta substância não foi quantificada nos extratos de *S. oleraceus*.

Figura 12 - Perfis cromatográficos representativos por CLAE-DAD a 320 nm em folhas e 210 nm em raízes de preparações de *Sonchus oleraceus* e de amostra autêntica de ácido clorogênico.



Legenda: 1 – amostra de folha; 2 – amostra de folha coeluída com ácido clorogênico; 3 - amostra de raiz; 4 - amostra de raiz coeluída com ácido clorogênico.

Figura 13 - Perfis cromatográficos representativos por CLAE-DAD a 320 nm em folhas de preparações de *Sonchus oleraceus* e de amostra autêntica de ácido chicórico.



Legenda: 1 – amostra de folha coeluída com ácido chicórico; 2 - amostra de folha; 3 – substância de referência de ácido chicórico.

3.2 Quantificação de ácido chicórico

A condição estabelecida para as análises por CLAE-DAD para os extratos de folhas de *Sonchus oleraceus* teve a sua confiabilidade examinada por testes de adequabilidade do sistema, compreendendo a avaliação da pureza de 3 pontos (P), resolução (Rs), números de pratos teóricos (N), fator de cauda (T), fator de retenção (k), fator de cauda (T) e

repetibilidade, avaliada pelo DPR do tempo de retenção do pico referente ao ácido chicórico ($n = 5$). Os resultados foram expressos como valor médio de cinco determinações e estão apresentados na Tabela 13, juntamente com os limites recomendados pelo Fda (2000).

Todos os valores determinados estão de acordo com as recomendações, exceto a resolução ($R_s = 1,30$). Todavia, considerando tratar-se de matriz biológica, esses valores podem ser aceitos, pois testes de adequabilidade do sistema apresentam limites menos rigorosos para matrizes biológicas e análise de traços (DONG; PAUL; GERSHANOV. 2001). Alguns autores consideram R_s de 1,5 adequada para análises quantitativas (AOAC. 2019; DONG; PAUL; GERSHANOV. 2001) A resolução do pico do ácido chicórico ainda está abaixo do valor de $R_s = 1,50$, mas isso não é impeditivo para a análise quantitativa, pois o sistema apresentou excelente repetibilidade e o pico elevada pureza (98%).

Tabela 13 - Parâmetros de adequação do sistema determinados para as análises de marcador químico em folhas de *Sonchus oleraceus*.

Parâmetros de adequabilidade do sistema	Média ($n=6$)	Valores recomendados pelo FDA
Pureza de 3 pontos (P)	0,98	-
Resolução (R_s) (USP)	1,30	≥ 2
Número de Pratos Teóricos (N) (USP)	106533	>2.000
Fator de Retenção (K)	2,90	>2
Assimetria (T)	1,05	≥ 2
DPR do Tempo de Retenção (%)	0	DPR $\leq 1\%$, para $n \geq 5$

Condição cromatográfica: vide Parte Experimental, item 2.3.2.

A seletividade do método assume que as determinações quantitativas de marcadores químicos não estarão sujeitas a interferências de outros componentes da amostra. A seletividade foi avaliada pela homogeneidade espectral do pico referente ao ácido chicórico nas amostras nas regiões ascendente, apical e descendente do pico. O valor de similaridade espectral calculado pelo *software* EZChrom[®], versão Open LAB foi de 99,9% indicando que o método estabelecido é seletivo devido ao elevado percentual de pureza do pico.

A linearidade do método foi determinada a partir da construção de duas curvas analíticas obtidas em dois dias consecutivos. As curvas analíticas foram determinadas em relação à massa injetada de ácido chicórico, conforme apresentado na Tabela 14. Os dados da

análise de regressão linear, dos dois dias de análises, e a curva analítica obtida pela média das duas curvas, para o ácido chicórico estão apresentados na Tabela 15 e Figura 14.

Tabela 14 - Massa injetada, áreas médias (n=3) e desvio padrão relativo das curvas analíticas de ácido chicórico em 2 dias de análise.

Volume injetado (µL)	Massa injetada (µg)	Dia 1		Dia 2	
		Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
Solução de referência (0,8 mg mL ⁻¹)					
10,0	8,0	39123758	1,54	43594086	0,27
8,0	6,4	31313594	1,62	35143288	0,04
6,0	4,8	23485163	1,12	25945113	1,48
4,0	3,2	15893312	1,21	17431610	1,09
2,0	1,6	7852910	2,50	8808140	2,31

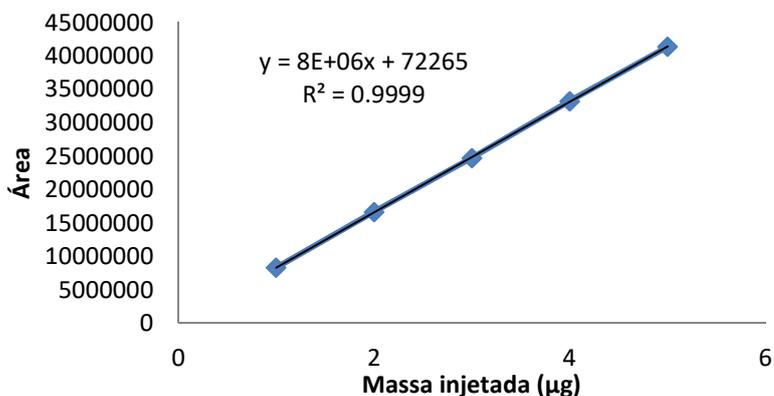
Fonte: Da autora (2020).

Tabela 15 - Resultados da regressão linear para curvas analíticas de ácido chicórico em 2 dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	Ácido chicórico	
	Dia 1	Dia 2
Faixa linear	10-2	
Coefficiente de determinação	0,9999	0,9998
Inclinação	59504	68142
Erro padrão da inclinação	308771	345608
Valor P - inclinação das 2 curvas	0,9857	
Intercepto	21534412	23894885
Erro padrão do intercepto	12151608	13601319
Valor P - intercepto das 2 curvas	0,7718	

Fonte: Da autora (2020).

Figura 14 - Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD para o ácido chicórico, em dois dias consecutivos.



Fonte: Da autora (2020).

As curvas obtidas nos dois dias consecutivos não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) indicando relação linear entre a massa injetada de ácido chicórico (μg) e a área do pico correspondente, comprovando a linearidade do método pelo coeficiente de determinação (R^2) médio de 0,9999.

A concentração de ácido chicórico variou de acordo com as amostras, independentemente de serem orgânicos ou convencionais, conforme Tabela 16. O maior teor de ácido chicórico foi encontrado no extrato E7 (H_2O , convencional) com $4,11 \text{ mg g}^{-1}$ de planta. Enquanto que o menor teor foi encontrado no extrato E2 (etanol 70%, orgânico) com $1,52 \text{ mg g}^{-1}$ de planta.

Tabela 16 - Concentração de ácido chicórico nos extratos de folhas de *Sonchus oleraceus*.

		Concentração de ácido chicórico (mg g^{-1})	
Folhas	Orgânico	E1	1,91
		E2	1,52
		E3	3,95
	Convencional	E7	4,11
		E8	2,90
		E9	3,66

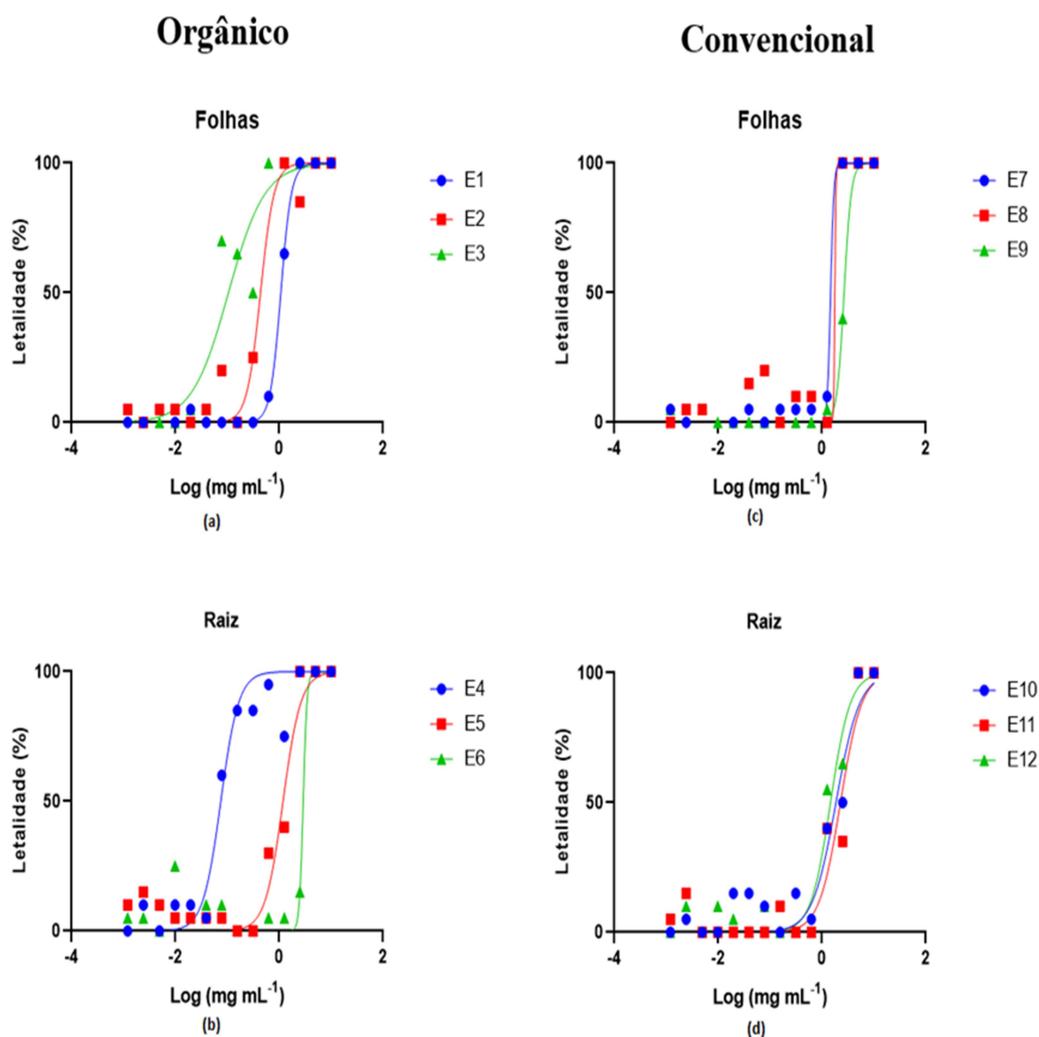
Fonte: Da autora (2020).

3.3 Avaliação da embriotoxicidade dos extratos de *S. oleraceus* em zebrafish

Durante as 120 h de teste, não foi observada letalidade significativa para o controle negativo, uma vez que os embriões e larvas apresentaram desenvolvimento normal, onde a taxa de eclosão e as taxas de sobrevivida foram superiores a 90%, conforme recomendado pelo protocolo 236 da OCDE. As concentrações de $0,0025$ e $0,0012 \text{ mg mL}^{-1}$ para todos os extratos de folha e a concentração de $0,0012 \text{ mg mL}^{-1}$ para os extratos de raiz obtiveram resultados semelhantes aos do grupo controle negativo.

Foi observado mais de 90% de letalidade em 24h e 48h de exposição aos extratos, nas concentrações de 2,5; 5 e 10 mg mL⁻¹ nos extratos de 1 a 8. A letalidade máxima foi de 100% e a mínima de 0% durante as 120 h de análise, para todos os extratos analisados (Figura 15).

Figura 15 - Letalidade dos extratos de *S. oleraceus* em zebrafish.



Fonte: Da autora (2019).

Em se tratando dos extratos de folhas, os orgânicos foram mais letais (Tabela 17, Figura 15), com destaque para o extrato 3 que apresentou LC₅₀ de 0,11 mg mL⁻¹. Em contrapartida, os extratos convencionais apresentaram menor letalidade, tendo o E9 um LC₅₀ de 2,66 mg mL⁻¹ demonstrando, assim, o maior LC₅₀ encontrado nas amostras foliares (Tabela 11). Nota-se também, que nos extratos foliares o menor e o maior LC₅₀ foram encontrados em amostras de metanol 50%.

Tabela 17 - Letalidade, teratogênese e índice teratogênico dos extratos de *S. oleraceus* em zebrafish, analisados às 120 hpf.

		Orgânico			Convencional			
		LC ₅₀	EC ₅₀	IT	LC ₅₀	EC ₅₀	IT	
Folha	E1	1,07	0,40	2,68	E7	1,47	0,62	2,37
	E2	0,76	0,60	1,27	E8	1,77	0,91	1,95
	E3	0,11	0,07	1,57	E9	2,66	1,40	1,90
Raiz	E4	0,08	0,08	1,00	E10	1,86	0,96	1,94
	E5	1,19	1,10	1,08	E11	2,27	0,45	5,04
	E6	2,90	0,81	3,58	E12	1,46	1,27	1,15

LC₅₀ = Concentração mínima capaz de causar 50% de letalidade. EC₅₀ = Concentração mínima capaz de causar 50% de efeito teratogênico. A LC₅₀ e a EC₅₀ são expressas em mg mL⁻¹. IT = índice teratogênico = LC₅₀/EC₅₀.

Analisando os extratos de raízes, nota-se que a maior e menor letalidade foi encontrada nos extratos orgânicos (Figura 15), sendo a maior letalidade no E4 (H₂O) com LC₅₀ 0,08 mg mL⁻¹ e a menor letalidade no E6 (metanol 50%) com LC₅₀ 2,90 mg mL⁻¹.

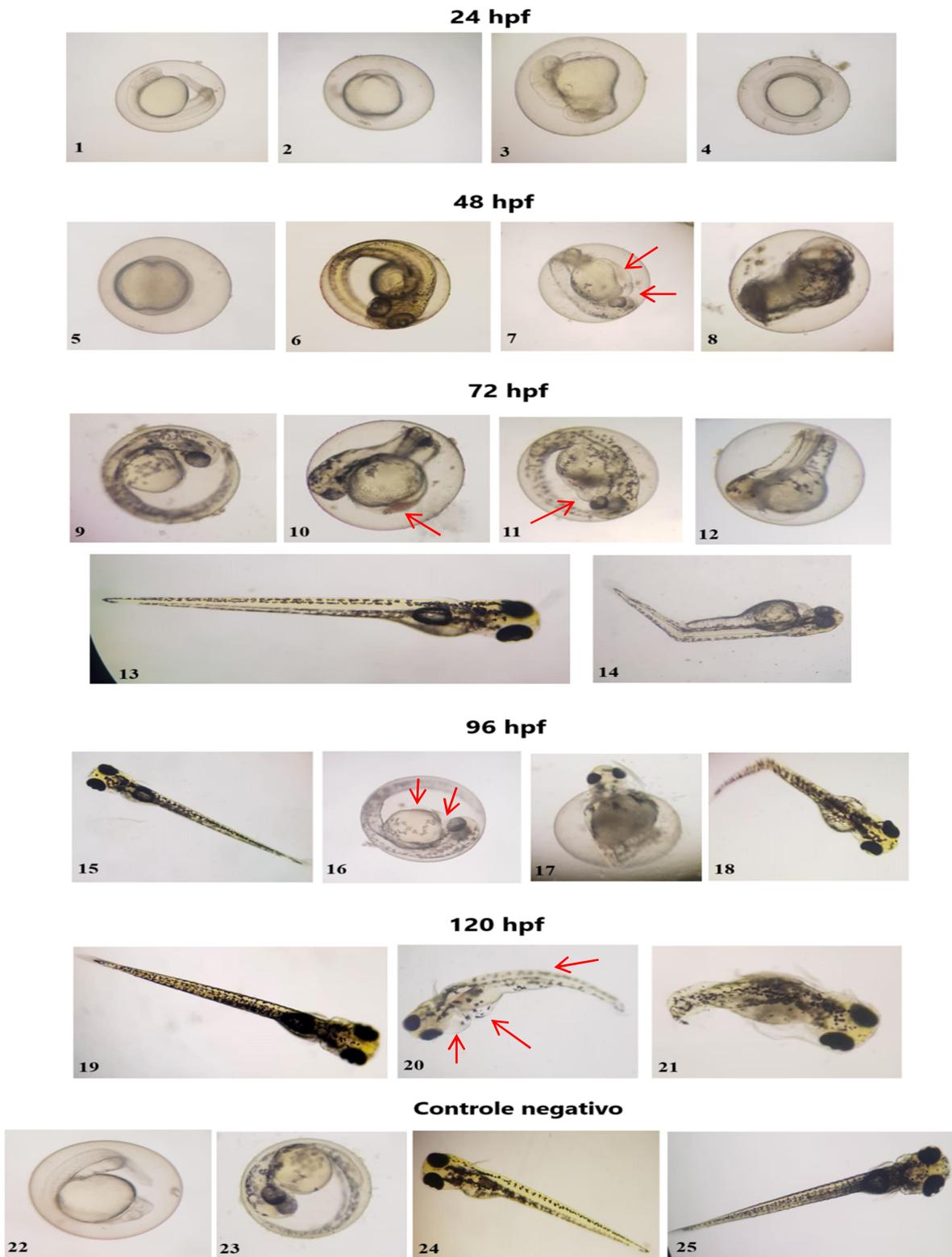
Portanto verificou-se que, de forma geral, os extratos orgânicos foram mais letais que os extratos convencionais (Figura 15), tanto em folhas quanto em raízes, nota-se que apenas o extrato E12 (raiz, metanol, convencional) foi mais letal que o seu correspondente E6 (raiz, metanol, orgânico). Doses acima de 5 mg mL⁻¹ foram letais em 24h de incubação e doses abaixo de 0,0025 mg mL⁻¹ não foram consideradas embriotóxicas, por apresentaram menos de 10% de letalidade.

3.4 Teratogenicidade dos extratos de *S. oleraceus* em zebrafish

3.4.1 Efeitos das concentrações dos extratos de *S. oleraceus* na taxa de eclosão de embriões

Os embriões de zebrafish expostos aos extratos de *S. oleraceus* apresentaram taxa de 70% de eclosão tardia, até 96 hpf, em todas as concentrações dos extratos foliares E1 (orgânico - H₂O) e E7, E8, E9 (convencional - H₂O, etanol 70% e metanol 50% respectivamente) conforme Figura 16. Essa mesma taxa de eclosão foi encontrado, em todas as concentrações dos extratos de raiz E4 (H₂O – orgânico) e E10 e E11 (H₂O e etanol 70% - convencional).

Figura 16 - Características morfológicas avaliadas como medida da embriotoxicidade e teratogenicidade dos extratos de *S. oleraceus* em diferentes pontos do tempo.



Legenda: Embriões e larvas com desenvolvimento normal: 1, 6, 13, 15, 19. Atraso no desenvolvimento: 2 e 5. Ausência de deslocamento da cauda: 4. Desenvolvimento normal, ainda sem eclosão: 9. Edema de pericárdio e saco vitelino: 7, 10, 11, 16 e 20. Lordose: 14, 18 e 20. Malformação: 3, 8, 12, 17 e 21. Controle negativo: 22, 23, 24 e 25. Fonte: Da autora (2019).

A taxa de eclosão dos demais extratos foliares e de raízes, tanto orgânico quanto convencional, variou em função da concentração, tendo início às 72 hpf. O grupo controle teve 100% das eclosões em 48 hpf e nenhum extrato foi semelhante a este.

3.4.2 Efeitos das concentrações no retardo do desenvolvimento embrionário e malformações em zebrafish

Os embriões de zebrafish apresentaram retardo no desenvolvimento inicial de aproximadamente 10 horas (Figura 16), no período de 24 e 48 hpf, nos extratos de *S. oleraceus* dependente da concentração. Todos os embriões, enquanto nessa condição, não desenvolveram os somitos permanecendo em estágio de gástrula e aparente epibolia. Não foi observado nenhum outro tipo de alteração na formação dos somitos, nem na falta de movimentos espontâneos, além do atraso no desenvolvimento inicial do embrião. Após as 72 hpf houve embriões que continuaram seu desenvolvimento normal, enquanto outros morreram, porém todos dependentes das concentrações aplicadas. O extrato foliar orgânico E1 (H₂O) e radicular convencional E10 (H₂O) e E11 (etanol 70%) provocaram atraso no crescimento dos embriões em maior número de concentrações, conforme Tabela 18. Em concentrações abaixo de 0,005 mg mL⁻¹ não foi observado nenhum efeito no desenvolvimento.

Tabela 18 - Concentrações responsáveis pelo retardo no crescimento dos embriões de zebrafish.

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
10	√											
5	√										√	√
2.5	√	√		√	√	√	√		√	√	√	√
1.25	√	√		√	√	√	√	√		√	√	
0.625	√	√			√	√	√	√		√	√	
0.313	√	√	√		√		√	√		√	√	
0.156	√		√							√	√	
0.078	√									√		
0.039	√											
0.020	√											
0.010	√											
0,005												
0,0025												
0,0012												

√ = presença de atraso no crescimento dos embriões.

O atraso no deslocamento da cauda (Figura 16) foi observado somente em casos de retardo do desenvolvimento inicial do embrião, nas situações em que os embriões se desenvolviam normalmente não houve atraso nesse descolamento. Em todos os extratos avaliados foi detectado a ocorrência de malformações nos embriões e larvas de zebrafish, dependentes das concentrações (Figura 16).

Considerando os demais efeitos, os 12 extratos analisados não implicaram em alterações nos batimentos cardíacos, na circulação dorsal e no desenvolvimento dos olhos do zebrafish.

3.4.3 Efeito das concentrações no aparecimento de edemas e lordose no estágio embriolarval de zebrafish

O surgimento de edemas de saco vitelino (Figura 16) nas larvas foi dependente das concentrações e tempo. Estes edemas foram observados a partir das 48 hpf e a partir da concentração:

- 2,5 mg mL⁻¹
 - no extrato radicular orgânico E6 (metanol 50%)
 - extrato foliar convencional E9 (metanol 50%)
 - extrato radicular convencional 10, 11 e 12 (H₂O, etanol 70% e metanol 50% respectivamente).
- 1,25 mg mL⁻¹
 - no extrato orgânico de folha E1 (H₂O) e de raiz E5 (etanol 70%)
 - no extrato convencional de folha E7 (H₂O) e E8 (etanol 70%).
- 0,625 mg mL⁻¹ no extrato foliar orgânico E2 (etanol 70%).
- a partir 0,312 mg mL⁻¹ nos extratos orgânicos de folha E3 (metanol 50%) e de raiz E4 (H₂O).

É possível perceber que a maior parte dos extratos convencionais causaram edemas de saco vitelino em concentrações mais altas que os orgânicos.

O aparecimento de edemas de pericárdio (Figura 16) nas larvas de zebrafish também foi dependente da concentração e iniciaram-se após 48 hpf. A taxa de edema de pericárdio nos embriões expostos aos extratos de folhas orgânicas variou de 2,8% a 4,6% e nos extratos de folhas convencionais de 5% a 7,8%, demonstrando maior número de edemas nas folhas

convencionais. Nas raízes a taxa de edemas de pericárdio variou de 1,4% a 5,7% em ambos os tratamentos, tanto no orgânico quanto no convencional.

O aparecimento de lordose (Figura 16) foi observado a partir de 72 hpf. Os extratos convencionais E9 e E10 (folha metanol 50% e raiz H₂O respectivamente) não causaram lordose nos embriões em nenhuma das concentrações. Nos demais extratos analisados foram observados de 5% a 10% de lordose nas larvas, até as 120 hpf.

3.5 Índice teratogênico dos extratos de *S. oleraceus* em Zebrafish

Os valores de índice teratogênico dos extratos de *S. oleraceus* podem ser observados na Tabela 17. Analisando apenas os extratos foliares, nota-se que o extrato E1 (H₂O – orgânico) apresentou maior índice teratogênico (2,68), enquanto que o extrato E2 (etanol 70% - orgânico) apresentou o menor índice de 1,27. Nesta comparação entre folhas x folhas, foi possível notar que tanto a maior, quanto a menor teratogenicidade encontram-se nos extratos foliares orgânicos, dependendo então, do solvente de extração utilizado.

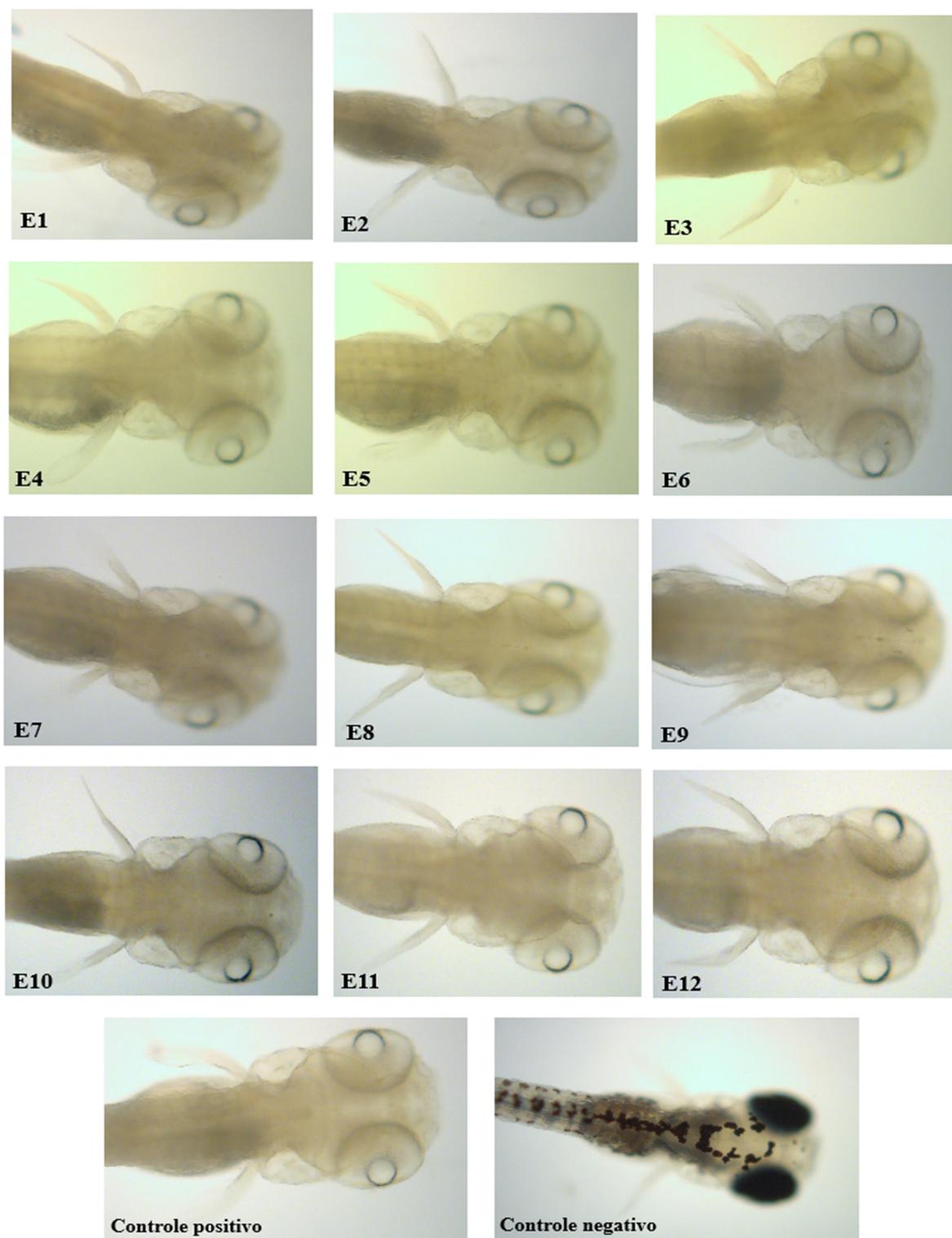
Quando analisados as raízes, o extrato E11 (etanol 70% - convencional) apresentou o maior índice teratogênico, enquanto que o menor índice foi encontrado no extrato E4 (H₂O - orgânico) com 1,00 (Tabela 17). Na comparação raiz x raiz, ao contrário do ocorrido nas folhas, o maior índice teratogênico esteve nos extratos convencionais. Nota-se também, que em ambos os tratamentos (folha x raiz; convencional x orgânico) os solventes água e etanol 70% extraíram compostos que causaram tanto a maior, quanto a menor teratogenicidade.

Analisando de maneira global todos os 12 extratos avaliados, observou-se que o E11 (raiz - etanol 70%) do tratamento convencional foi o que apresentou maior índice teratogênico, com um valor de 5,04 e o extrato E5 (raiz – etanol 70%) do tratamento orgânico o menor índice, com um valor de 1,08 (Tabela 17).

3.6 Capacidade melanogênica dos extratos de *Sonchus oleraceus* em Zebrafish

No ensaio 1 o controle positivo não promoveu a pigmentação nas larvas de zebrafish (Figura 17), enquanto que o controle negativo apresentou densidade de 0,0004 pixel μm^2 . As amostras referentes aos 12 extratos testados também não estimularam pigmentação nos embriões e larvas (Figura 17).

Figura 17 - Larvas de *D. rerio* submetidas aos extratos de *S. oleraceus* no ensaio 1.



Legenda: Extratos orgânicos de folha = **E1** H₂O, **E2** etanol 70%, **E3** metanol 50% e de raiz = **E4** H₂O, **E5** etanol 70% e **E6** metanol 50%. Extratos convencionais de folha = **E7** H₂O, **E8** etanol 70% e **E9** metanol 50% e de raiz = **E10** H₂O, **E11** etanol 70% e **E12** metanol 50%. Fonte: Da autora (2019).

Em todas as amostras testadas no ensaio 1 não ocorreram mortes ou teratogênese. Esses resultados apontam para a efetividade da 1-fenil-2-tiourea na despigmentação dos embriões e larvas de zebrafish sem provocar alterações morfológicas visíveis, também demonstra que os extratos não foram capazes de estimular a melanogênese quando na presença do PTU.

No ensaio 2, no controle negativo houve pigmentação das larvas com uma densidade de 0,0004 pixel μm^2 e o controle positivo apresentou densidade de 0,0003 pixel μm^2 (Tabela 19, Figura 18) às 144 hpf.

Tabela 19 - Densidade (pixel μm^2) referente à melanogênese de zebrafish em 144 hpf, promovido pelos extratos de *S. oleraceus* em diferentes concentrações, no ensaio 2.

		Concentrações analisadas				
			0,0025 mg mL ⁻¹	0,039 mg mL ⁻¹	0,625 mg mL ⁻¹	Controle Positivo
Orgânico	Folhas pixel μm^2	E1	0.00015 aB	0.00022 bB	0.00076 aA	0.0003 B
		E2	0.00026 aA	0.00022 bA	0.00033 cA	0.0003 A
		E3	0.00026 aB	0.00025 bB	0.00056 bA	0.0003 B
	Raizes pixel μm^2	E4	0.00046 aA	0.00036 bA	0.00028 cA	0.0003 A
		E5	0.00021 aB	0.00044 aB	0.00084 aA	0.0003 B
		E6	0.00020 aB	0.00025 bB	0.00057 bA	0.0003 B
Convencional	Folhas pixel μm^2	E7	0.00031 aA	0.00027 bA	0.00030 cA	0.0003 A
		E8	0.00027 aB	0.00022 bB	0.00058 bA	0.0003 B
		E9	0.00034 aA	0.00028 bA	0.00034 cA	0.0003 A
	Raizes pixel μm^2	E10	0.00015 aA	0.00016 bA	0.00016 cA	0.0003 A
		E11	0.00027 aB	0.00019 bB	0.00055 bA	0.0003 B
		E12	0.00018 aA	0.00027 bA	0.00019 cA	0.0003 A

Letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, seguidos das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

Analisando a capacidade dos 12 extratos de estimular a melanogênese em zebrafish, às 144 hpf, por meio da concentração de 0,0025 mg mL⁻¹ observou-se que os resultados não apresentaram diferenças estatísticas, sendo os valores considerados semelhantes entre si (Tabela 19). Na concentração de 0,039 mg mL⁻¹ o extrato E5, orgânico de raiz em etanol 70%, apresentou resultado superior aos demais extratos na pigmentação das larvas. Na

concentração de 0,625 mg mL⁻¹ os extratos orgânicos E1 (folha, H₂O) e E5 (Raiz, etanol) também obtiveram resultados acima dos demais, não apresentando diferenças entre si (Tabela 19).

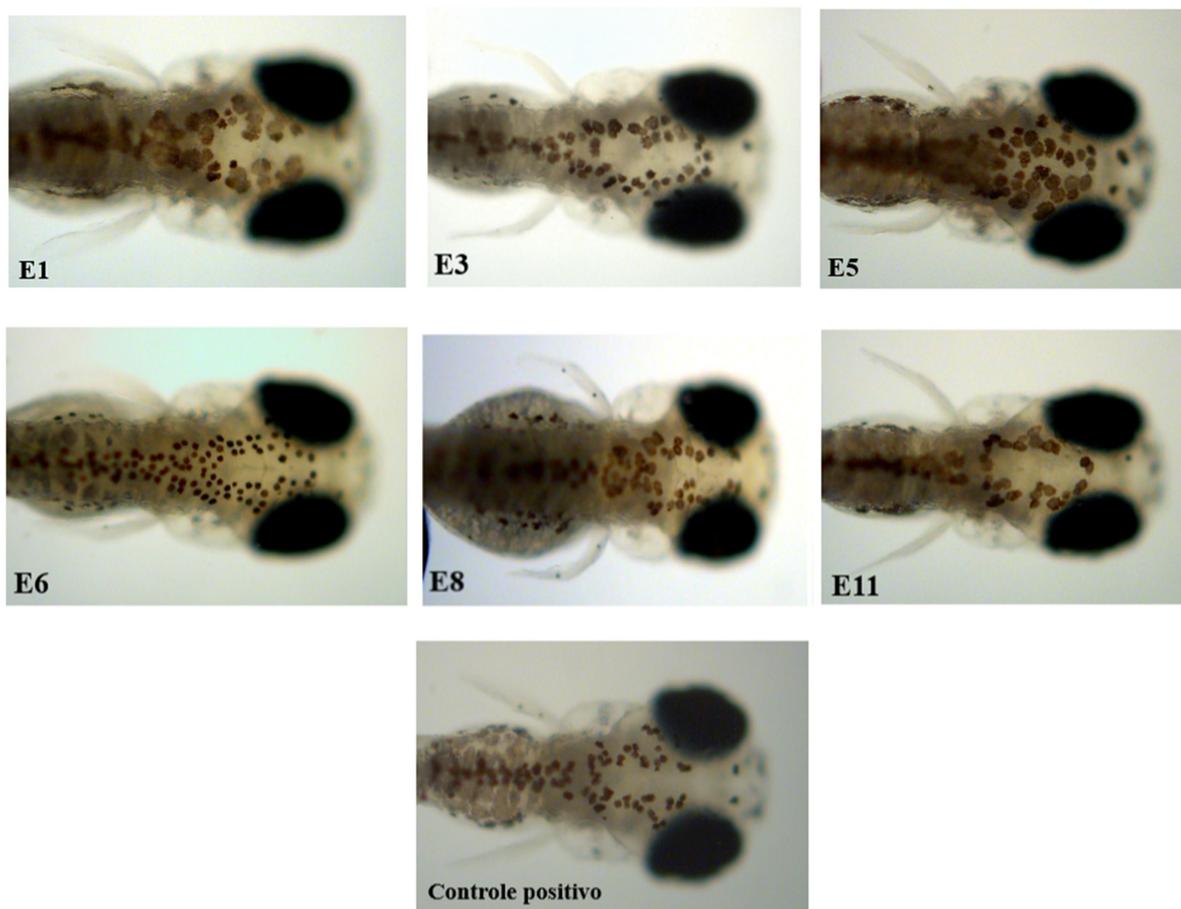
Sendo assim, quando analisado na Tabela 19 o efeito de cada concentração, ou seja, o efeito de uma única concentração entre os 12 extratos, notou-se que houveram extratos com resultados superiores a outros. No entanto, quando analisados os efeitos da primeira e segunda concentração, ou seja, o efeito da concentração de 0,0025 e 0,039 mg mL⁻¹ dentro de um mesmo extrato, notou-se que elas não diferenciaram estatisticamente entre si. A concentração de 0,625 mg mL⁻¹ foi diferente estatisticamente das demais e foi a que estimulou maior pigmentação nas larvas de zebrafish.

Quando analisados os extratos do ensaio 2 em comparação ao controle positivo, é possível notar a formação de dois grupos: aqueles que foram capazes de estimular a melanogênese e aqueles que foram semelhantes, estatisticamente, ao controle positivo (Tabela 19, Figura 18).

Os extratos que apresentaram capacidade de pigmentação estão na concentração de 0,625 mg mL⁻¹ e referem-se aos os extratos orgânicos de folha E1 (H₂O) 0,00076 pixel μm² e E3 (metanol) 0,00056 pixel μm², orgânico de raiz E5 (etanol) 0,00084 pixel μm² e E6 (metanol) 0,00057 pixel μm². Ainda neste mesmo grupo encontram-se os extratos etanólicos convencionais de folha E8 (0,00058 pixel μm²) e de raiz E11 (0,00055 pixel μm²) (Figura 18, Tabela 19).

Dentre esses extratos, dois terços (E1, E3, E5 e E6) são orgânicos e apenas um terço dos extratos são convencionais (E8 e E11). O extrato aquoso de folhas orgânicas E1 (0,00076 pixel μm²) apresentou maior poder de estimular a melanogênese em larvas, dentre as folhas orgânicas e convencionais. Dentre as raízes, o extrato etanólico 70% e orgânico E5 (0,00084 pixel μm²) estimulou maior aumento na melanogênese, que os demais extratos de raízes (Figura 18).

Figura 18 - Larvas de *D. rerio* submetidas a extratos de *S. oleraceus* no ensaio 2.



Legenda: Extratos orgânicos de folha = **E1** H₂O e **E3** metanol 50% e de raiz = **E5** etanol 70% e **E6** metanol 50%. Extratos convencionais de folha = **E8** etanol 70% e de raiz = **E11** etanol 70%. Fonte: Da autora (2019).

4 DISCUSSÃO

As análises realizadas por CLAE-DAD indicam a presença de ácido clorogênico nas raízes e folhas de *S. oleraceus*. A literatura cita a presença deste ácido nesta espécie como em trabalhos de Ou; Schmierer; Rades et al. (2013), Chen; Teng e Cao (2019) e Mohammed (2020). Este ácido além de ser um excelente antioxidante, também atua como antiinflamatório (CHEN; TENG; CAO. 2019) contribuindo no tratamento da diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemias e no tratamento de câncer (GARAMBONE; ROSA. 2008).

Nas análises por CLAE-DAD também foi possível verificar a presença de ácido chicórico e determinar o teor deste nas amostras. As seis amostras de folhas analisadas apresentaram diferentes teores de ácido chicórico, conforme segue em ordem crescente de resultados, E2 (etanol 70%) 1,52 mg g⁻¹; E1 (H₂O) 1,91 mg g⁻¹; E8 (etanol 70%) 2,90 mg g⁻¹; E9 (metanol 50%) 3,66 mg g⁻¹; E3 (metanol 50%) 3,95 mg g⁻¹ e E7 (H₂O) 4,11 mg g⁻¹. A diferença nos teores nas folhas de *S. oleraceus* pode estar relacionada com algum estresse sofrido pela planta, acarretando no aumento destes teores. Em trabalho realizado por Lee e Scagel (2013) observou-se que a aplicação de elicitores de estresse como calor, luz, ultrassom e hormônio resultaram em maior estresse das plantas e conseqüentemente aumentou a produção de ácido chicórico.

Nos ensaios de letalidade foi constatado que os extratos de *S. oleraceus* apresentaram LC₅₀ dependente da concentração do extrato. As menores LC₅₀ encontradas para esses extratos foram de 0,08 mg mL⁻¹ em raízes e 0,11 mg mL⁻¹ em folhas demonstrando a embriotoxicidade dessa hortaliça não convencional em diferentes partes da planta. Esses resultados não apontam para a espécie como uma planta tóxica, eles demonstram que *S. oleraceus* é embriotóxica em concentrações a partir de 0,08 mg mL⁻¹. Por exemplo, os resultados demonstram que concentrações de 0,002 mg mL⁻¹ e inferiores não apresentaram embriotoxicidade tanto em extratos foliares quanto radiculares e ainda essa concentração apresenta efeito na melanogênese em zebrafish.

Outras plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional apresentaram LC₅₀ semelhante ou superiores à de *S. oleraceus*, como *Punica granatum* L. (Romã) com 196,037±9,2 µg mL⁻¹; *Curcuma longa* (açafrão) com 55,89 µg mL⁻¹ e *Carthamus tinctorius* L. (Cártamo) com 0,345 mg mL⁻¹ (JAYASINGHE; JAYAWARDENA. 2019). São plantas que

possuem estudos comprovando sua eficácia terapêutica, entretanto também são embriotóxicas dependentes da concentração.

A letalidade dos extratos de *S. oleraceus* nos embriões e larvas de zebrafish pode ocorrer devido a diversos componentes, entre eles os taninos. Em estudos realizados por Lima; Silva; Rosa et al. (2009) é relatada a presença de taninos em *S. oleraceus*. Esse composto químico é considerado tóxico e indesejável nutricionalmente porque precipita proteínas, inibe enzimas digestivas e afeta a utilização de vitaminas e minerais (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO et al. 2005).

Os compostos fenólicos são outro fator presente em *S. oleraceus* que possivelmente possa ter causado a letalidade em embriões de zebrafish. O consumo total estimado de antioxidantes em seres humanos adultos varia de 26 mg a 1g por dia. Os antioxidantes, apesar de benéficos para a saúde humana, podem causar efeitos pró-oxidantes. A atividade pró-oxidante é diretamente proporcional ao número total de grupos hidroxilas. Múltiplos grupos hidroxila, especialmente presentes no anel B, aumentam significativamente a produção de radicais hidroxil no sistema de Fenton. Esse efeito pró-oxidante é responsável pelos efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos presentes em plantas medicinais. Isso sugere que a mesma propriedade estrutural que aumenta a capacidade antioxidante pode também aumentar o estresse oxidativo e os danos funcionais e estruturais das moléculas celulares (BEHLING; SENDÃO; FRANCESCATO et al. 2008) indicando que o consumo excessivo de chás medicinais, sucos e plantas abundantes em compostos antioxidantes, como *S. oleraceus*, podem trazer prejuízos à saúde humana, tanto quanto trazem benefícios.

De forma geral os extratos convencionais apresentaram menor letalidade que os orgânicos, supõe-se que essa diferença possa ter sido causada pela ação do glifosato presente no Roundup. Ele inibe a produção de fenilalanina, que é um substrato para a via dos fenilpropanóides que produzem numerosos produtos secundários de plantas, tais como os compostos fenólicos, que como já citados anteriormente são antioxidantes, mas que apesar disso podem causar efeitos pró-oxidantes. Tendo esses compostos fenólicos em menor quantidade, devido à inibição causada pelo glifosato, sugere-se uma menor letalidade dos extratos convencionais. Não é possível determinar que esta seja a causa química da menor letalidade dos extratos convencionais, pois é sabido que o teor de compostos fenólicos nem sempre está diretamente relacionado com o maior ou menor efeito biológico causado (MCDOWELL; THOMPSON; STARK et al. 2011), contudo é um efeito que deve ser ponderado.

Por isso, análises mais detalhadas de toxicidade devem ser realizadas em plantas medicinais para garantir a segurança e pleno efeito terapêutico no uso pela população.

Os resultados de teratogênese em zebrafish apontaram que os extratos analisados apresentaram de 1,4% a 7,8% de edemas de pericárdio. Um valor baixo que pode ser comparado com o controle negativo que apresentou 0,36% de edemas de pericárdio em embriões e larvas, pois segundo recomendações da Oede (2013) são válidos valores com menos de 10% de efeito em embriões e larvas. O ácido clorogênico presente nas amostras é um composto que age na proteção de doenças cardiovasculares, além de estudos também relatarem sua ação na diminuição da hipertensão (ALVES; CASAL; OLIVEIRA. 2009).

Além dos edemas de pericárdio, todos os extratos de *S. oleraceus* também foram teratogênicos em outros aspectos, dependentes da concentração. Isso indica que não é recomendado o uso dessa planta em gestantes, principalmente nos primeiros meses de gestação. Entre os muitos componentes existentes que podem ter causado esse efeito, alguns são descartados pela literatura. Alrekabi e Hamad (2018) em seus estudos identificaram nas folhas de *S. oleraceus* a quercetina e a apigenina. Em estudos realizados por Alafiatayo; Lai; Syahida et al. (2019) com extratos de *Curcuma longa*, nenhuma toxicidade ou efeito teratogênico foi observado para soluções de referência de quercetina e rutina aplicados em embriões de zebrafish. Também foi observado um efeito protetor contra anormalidades morfológicas nos casos de apigenina.

Nos ensaios de melanogênese seis extratos foram capazes de estimular a pigmentação nas larvas de zebrafish, são eles os extratos E1 (folha, H₂O), E3 (folha, metanol 50%), E5 (raiz, etanol 70%), E6 (raiz, metanol 50%), E8 (folha, etanol 70%) e E11(raiz, etanol 70%). *Sonchus oleraceus* é uma espécie conhecida e utilizada em diversos tipos de tratamentos naturais pela medicina popular, e um deles é tratamento do vitiligo. Resende; Aquino; Nascimento et al. (2015) em ensaio realizado durante 60 dias com pacientes com vitiligo, concluíram que uma preparação fitoterápica de *Sonchus oleraceus* e outras duas plantas foi eficaz no tratamento deste distúrbio, obtendo redução significativa das manchas. Lima; Silva; Rosa et al. (2009) também relatam que nos últimos vinte anos *S. oleraceus* tem sido utilizada no tratamento do vitiligo, principalmente no leste do estado de Minas Gerais. Em patente com o uso do ácido chicórico realizada por Guitard; Rhlid; Moodycliffe et al. (2015), também é relatado o uso desta substância no tratamento de distúrbios da melanina, como o vitiligo.

Vasconcelos; Santos; Barros et al. (2015) relataram que plantas, como *Sonchus oleraceus*, *Ammi majus* (erva do bispo), *Ammi visnaga* (khella, erva-palito), *Brosimum gaudichaudii* (mama-cadela), *Citrus bergamia* (bergamota) e *Dorstenia brasiliensis* (carapiá, caiapiá, liga-liga) possuem substâncias fotossensibilizantes derivadas dos psoralenos pertencentes à classe de compostos das furanocumarinas que absorvem eficazmente energia na radiação ultravioleta, e, por isso, são altamente reativas sob incidência de luz, apresentando assim efeito de repigmentação da pele em casos de vitiligo. Zhong; An; Li et al. (2019) em trabalho realizado com o modelo zebrafish no tratamento do vitiligo, atestam que a prevenção do estresse oxidativo é benéfico para pacientes com vitiligo. *Sonchus oleraceus* é uma espécie dotada de capacidade antioxidante, benéfico no tratamento de vitiligo (ABD EL-AZIM; SELIM. 2017).

Dentre os seis extratos que estimularam a pigmentação em zebrafish somente dois são convencionais (E8 e E11). Ou seja, dois terços desses extratos são orgânicos, demonstrando uma diferença na capacidade de pigmentação entre extratos orgânicos e convencionais.

Trabalhos por todo o mundo tem apontado o glifosato, presente no Roundup, como uma substância capaz de inibir especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfatossintase (EPSPs) que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, impedindo a síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina (YAMADA; CASTRO. 2007). A fenilalanina presente em *S. oleraceus* é um dos substratos da principal enzima envolvida na melanogênese, a tirosinase. Demonstrando a possibilidade de uma relação entre a inibição da produção da fenilalanina causada pelo glifosato no Roundup e a menor capacidade de pigmentação dos extratos convencionais.

5 CONCLUSÃO

Os extratos de *S. oleraceus* apresentaram embriotoxicidade em ambos os tratamentos, orgânico e convencional. O extrato que exibiu maior letalidade foi o extrato E4, aquoso de raiz e orgânico, com $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os extratos apresentaram teratogênese a partir da concentração de $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$ para os critérios de eclosão dos ovos, retardo no desenvolvimento do embrião, edema de pericárdio, edema de saco vitelino e lordose. Os extratos não provocaram alterações nos batimentos cardíacos, circulação dorsal e desenvolvimento dos olhos.

Na avaliação da capacidade melanogênica dos extratos de *S. oleraceus*, observou-se que os extratos do ensaio 2, na concentração de $0,625 \text{ mg mL}^{-1}$ promoveram a pigmentação das larvas de zebrafish, sendo eles os extratos orgânicos E1 (H_2O), E3 (metanol 50%), E5 (etanol 70%), E6 (metanol 50%) e convencionais E8 (etanol 70%) e E11 (etanol 70%).

REFERÊNCIAS

- ABD EL-AZIM, M. H. M.; SELIM, Y. Antitumor, Antioxidant and Chemical Constituents Identification of the Chloroform Extract of Wild Libyan *Sonchus oleraceus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, 36, n. 9, p. 1843-1848, 2017. Article.
- ADHIKARI, S.; SAHA, S.; BANDYOPADHYAY, T. K. et al. Efficiency of ISSR marker for characterization of *Cymbopogon* germplasms and their suitability in molecular barcoding. **Plant Systematics and Evolution**, 301, n. 1, p. 439-450, 2015/01/01. 2015.
- AHN, M.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chem.**, 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.
- AL JUHAIMI, F.; GHAFOR, K.; AHMED, I. A. M. et al. Comparative study of mineral and oxidative status of *Sonchus oleraceus*, *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* leaves. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 11, n. 4, p. 1745-1751, 2017. Article.
- ALAFIATAYO, A. A.; LAI, K. S.; SYAHIDA, A. et al. Phytochemical Evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic Effects of *Curcuma longa* Extract on Zebrafish (*Danio rerio*). **Evid Based Complement Alternat Med**, 2019, p. 3807207, 2019.
- ALEKSIC, I.; RISTIVOJEVIC, P.; PAVIC, A. et al. Anti-quorum sensing activity, toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and phytochemical characterization of *Trapa natans* leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 222, p. 148-158, 2018. Article.
- ALOTHMAN, E. A.; AWAAD, A. S.; SAFHI, A. A. et al. Evaluation of anti-ulcer and ulcerative colitis of *Sonchus oleraceus* L. **Saudi Pharm J**, 26, n. 7, p. 956-959, Nov. 2018.
- ALREKABI, D. g.; HAMAD, M. N. Phytochemical Investigation of *Sonchus Oleraceus* (Family:Asteraceae) Cultivated in Iraq, Isolation and Identification of Quercetin And Apigenin. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 10, n. 9, p. 2242-2248, 2018.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, 32, p. 2169-2180, 2009.
- ANTELO, D. P.; FILGUEIRA, A. L.; CUNHA, J. M. T. Aspectos imunopatológicos do vitiligo. **Med Cutan Iber Lat Am**, 36, n. 3, p. 125-136, 2008.
- AOAC. **Official methods of analysis of Association of Official Agricultural Chemists**. 18 ed. Arlington: 2019.
- ARANHA, C.; BACCHI, O.; LEITÃO FILHO, H. **Plantas invasoras de culturas**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1982.
- ARBOS, K. A.; FREITAS, R. J. S. d.; STERTZ, S. C. et al. Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. **Food Science and Technology**, 30, p. 501-506, 2010.
- BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, 15, 09/01. 2008.

BENNET, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, 76, p. 113-176, 1995.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M. et al. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed. Curitiba: Appris, 2015.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, 68, p. 2722-2735, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, 28, n. 1, p. 25-30, // . 1995.

CARNEIRO, M. F.; DUARTE, E. F.; NOGUEIRA, J. C. M. et al. Multiplicação da planta medicinal *Brossimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura. **Revista Fitos**, 13, n. 1, p. 61-73, 2019.

CHAVES, A.; COLARICCIO, A.; EIRAS, M. et al. *Sonchus asper* e *S. oleraceus* como reservatórios naturais de vírus em cultivos de alface no cinturão-verde de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74, p. 101-106, 04/01. 2007.

CHEN, L.; TENG, H.; CAO, H. Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 127, p. 182-187, 2019. Article.

CHEN, L.; XU, M.; GONG, Z. et al. Comparative cardio and developmental toxicity induced by the popular medicinal extract of *Sutherlandia frutescens* (L.) R.Br. detected using a zebrafish Tuebingen embryo model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 18, n. 1, 2018. Article.

CHENG, M. C.; LEE, T. H.; CHU, Y. T. et al. Melanogenesis inhibitors from the rhizoma of *ligusticum sinense* in B16-f10 melanoma cells in vitro and zebrafish in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, 19, n. 12, 2018. Article.

CHOI, T.-Y.; KIM, J.-H.; KO, D. H. et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. **Pigment Cell Research**, 20, n. 2, p. 120-127, 2007/04/01. 2007.

CORDEIRO, I. H. **Bioatividade dos extratos de alopecia macrorrhizos em cultura de células e modelo murino de vitiligo**. 2018. - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, Saúde e Sociedade, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Teófilo Otoni.

CORREIA, K. M. L.; BORLOTI, E. Convivendo com o vitiligo: uma análise descritiva da realidade vivida pelos portadores. **Acta Comportamental**, 21, p. 227-240, 2013.

DAMMSKI, A. P.; MULLER, B. R.; GAYA, C. et al. **Zebrafish. Manual de Criação em Biotério**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011. 107 p.

DI PRINZIO, C. M.; BOTTA, P. E.; BARRIGA, E. H. et al. Growth hormone receptors in zebrafish (*Danio rerio*): adult and embryonic expression patterns. **Gene Expression Patterns**, 10, n. 4-5, p. 214-225, 2010.

DONG, M.; PAUL, R.; GERSHANOV, L. Getting the peaks perfect: System suitability for HPLC. **Today's chemist at work [on-line]**, 10, n. 09, p. p. 38-40, 2001.

EKAMBARAM, S. P.; PERUMAL, S. S.; PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacology**, 25, n. 1, p. 147-158, 2017. Article.

ESCALEIRA, R. d. C. O zebrafish (*Danio rerio*): contribuições para a pesquisa biomédica na Marinha do Brasil. **Arq Bras Med Naval.**, 78, n. 1, p. 43-48, jan/dez. 2017.

FAROOQ, M.; ABUTAHA, N.; MAHBOOB, S. et al. Investigating the antiangiogenic potential of *Rumex vesicarius* (humeidh), anticancer activity in cancer cell lines and assessment of developmental toxicity in zebrafish embryos. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 27, n. 2, p. 611-622, 2020. Article.

FDA, U. S. F. a. D. A. **Guidance for industry: analytical procedures and methods validation**. 2000. Disponível em: <https://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.

FERREIRA, D. SISVAR: A COMPUTER STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. *Cienc. Agrotec.* 35: 1039-1042 p. 2011.

FERREIRA, D. Q.; FERRAZ, T. O.; ARAÚJO, R. S. et al. *Libidibia ferrea* (Jucá), a traditional anti-inflammatory: A study of acute toxicity in adult and embryos zebrafish (*danio rerio*). **Pharmaceuticals**, 12, n. 4, 2019. Article.

FERREIRA, M. L. Zebrafish: sua importância na avaliação de toxicidade. São Paulo 2019.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana**. 2013. (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

FLORENCE, O. J.; ADEOLU, A. A.; ANTHONY, J. A. Comparison of the Nutritive Value, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*. **Records of Natural Products**, 5, n. 1, p. 29-42, 2011.

FRAGA, M. I.; TASENDE, M. G. Mechanisms of resistance to simazine in *Sonchus oleraceus*. **Weed Research**, 43, n. 5, p. 333-340, 2003/10/01. 2003.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, 18, 11/01. 2008.

GOULD, K.; THODEY, K.; PHILPOTT, M. et al. Antioxidant activities of extracts from traditional Maori food plants. **New Zealand Journal of Botany - N Z J BOT**, 44, p. 1-4, 03/01. 2006.

GRISOLA, M.; FUENTES, R. Phenotype-based screening of selected mangrove methanolic crude extracts with anti-melanogenic activity using zebrafish (*Danio rerio*) as a model. **ScienceAsia**, 43, p. 163, 06/01. 2017.

GUILLOT, R.; MURIACH, B.; ROCHA, A. et al. Thyroid Hormones Regulate Zebrafish Melanogenesis in a Gender-Specific Manner. **PloS one**, 11, n. 11, p. e0166152-e0166152, 2016.

GUITARD, M.; RHLID, R. B.; MOODYCLIFFE, A. et al. Use of chcoric acid and lactic bacterium in food supplement for regulating skin pgmentation. 2015.

HADDAD, J. G.; PICARD, M.; BÉNARD, S. et al. Ayapana triplinervis essential oil and its main component thymohydroquinone dimethyl ether inhibit zika virus at doses devoid of toxicity in zebrafish. **Molecules**, 24, n. 19, 2019. Article.

HASSAN, M. O.; GOMAA, N. H.; FAHMY, G. M. et al. Interactions between Sonchus oleraceus L. and some weeds in agroecosystems in Egypt. **Annals of Agricultural Sciences**, 59, n. 2, p. 221-228, 2014. Article.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005/03/01. 2005.

HYACIENTH, B. M. S.; ORTIZ, B. L. S.; PIKANÇO, K. R. T. et al. Endopleura uchi (Huber) Cuatrec.: A medicinal plant for gynecological treatments – A reproductive toxicity assessment in zebrafish (Danio rerio). **Journal of Ethnopharmacology**, 250, 2020. Article.

JAYASINGHE, C. D.; JAYAWARDENA, U. A. Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 17 p, 2019.

JENSEN, H. M.; KORBUT, R.; KANIA, P. W. et al. Cannabidiol effects on behaviour and immune gene expression in zebrafish (Danio rerio). **PLoS ONE**, 13, n. 7, 2018. Article.

JIMOH, F.; ADEDAPO, A. A.; AFOLAYAN, A. J. Comparison of the Nutritive Value, Antioxidant and Antibacterial Activities of Sonchus asper and Sonchus oleraceus. **Rec. Nat. Prod.**, 5, n. 1, p. 29-42, 2011.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium’s health. **International Journal of Food Science & Technology**, 36, n. 7, p. 703-725, 2001.

KNIGHT, C. A.; MOLINARI, N. A.; PETROV, D. A. The Large Genome Constraint Hypothesis: Evolution, Ecology and Phenotype. **Annals of Botany**, 95, n. 1, p. 177-190, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAJIS, F. B. A. A Zebrafish Embryo as an Animal Model for the Treatment of Hyperpigmentation in Cosmetic Dermatology Medicine. **Medicina**, 54, n. 3, 2018.

LAMMER, E.; CARR, G. J.; WENDLER, K. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 149, n. 2, p. 196-209, Mar. 2009.

LAMMER, E.; KAMP, H. G.; HISGEN, V. et al. Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio). **Toxicol In Vitro**, 23, n. 7, p. 1436-1442, Oct. 2009.

- LEE, J.; SCAGEL, C. F. Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. **Frontiers in chemistry**, 1, p. 40-40, 2013.
- LEE, S. H.; KANG, J. W.; LIN, T. et al. Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. **Biomed Res Int**, 2013, p. 726478, 2013.
- LI, Q.; DONG, D. D.; HUANG, Q. P. et al. The anti-inflammatory effect of *Sonchus oleraceus* aqueous extract on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells and mice. **Pharmaceutical Biology**, 55, n. 1, p. 799-809, 2017. Article.
- LI, X.-M.; YANG, P.-L. Research progress of *Sonchus* species. **International Journal of Food Properties**, 21, n. 1, p. 147-157, 2018/01/01. 2018.
- LI, X.; HU, D.; LUO, M. et al. Nuclear DNA content variation of three *Miscanthus* species in China. **Genes & Genomics**, 35, n. 1, p. 13-20, 2013/02/01. 2013.
- LIMA, J. M.; SILVA, C. A.; ROSA, M. B. et al. Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, 27, n. 1, p. 7-11, 03. 2009. research-article.
- LING, L. T.; YAP, S.-A.; RADHAKRISHNAN, A. K. et al. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. **Food Chemistry**, 113, n. 4, p. 1154-1159, 4/15/. 2009.
- LIRA, S. M.; DIONÍSIO, A. P.; HOLANDA, M. O. et al. Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. **Food Research International**, 127, 2020. Article.
- LIU, X.; ARDO, S.; BUNNING, M. et al. Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. **LWT - Food Science and Technology**, 40, p. 552-557, 04/01. 2007.
- MA, Y.; WU, Y.; XIA, Z. et al. Anti-hypoxic molecular mechanisms of *rhodiola crenulata* extract in zebrafish as revealed by metabolomics. **Frontiers in Pharmacology**, 10, 2019. Article.
- MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, 613, n. 1, p. 1-19, 2008/04/14/. 2008.
- MARIE, D.; BROWN, S. C. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biol Cell**, 78, n. 1-2, p. 41-51, 1993.
- MCDOWELL, A.; THOMPSON, S.; STARK, M. et al. Antioxidant activity of puha (*Sonchus oleraceus* L.) as assessed by the cellular antioxidant activity (CAA) assay. **Phytotherapy Research**, 25, n. 12, p. 1876-1882, 2011. Article.
- MELO, N. C.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; SAMPAIO, T. I. S. et al. Anxiolytic and antidepressant effects of the hydroethanolic extract from the leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) moldenke: A study on zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, 12, n. 3, 2019. Article.

MERINO, F. J. Z.; OLIVEIRA, V. B.; PAULA, C. S. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 17, p. 1031-1040, 2015.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, 15, n. 12, 2010.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G. d. et al. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 84, p. 623-635, 2009.

MOHAMMED, H. Phytochemistry and Pharmacological Effects of Plants in Genus *Sonchus* (Asteraceae). **Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, 4, n. 1, p. 40-50, 2020.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. d.; ARAÚJO, E. d. L. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, 28, p. 892-896, 2005.

NGUYEN, T. H.; LE, H. D.; KIM, T. N. T. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of the ethanol extract of *Clerodendrum cyrtophyllum* turcz in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish. **Antioxidants**, 9, n. 3, 2020. Article.

NONATO, I.; VARGAS VILORIA, M.; CARVALHO, G. et al. Healing Effects of Formulations with Extract of *Sonchus oleraceus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, 46, p. 7, 11/10. 2018.

OCDE, O. P. A. C. E. D. E. Diretrizes da OCDE para a ensaios de produtos químicos. *In*: OXFORD (Ed.). **Effects on Biotic Systems**, 2013. p. 1-22.

OH, J.; KIM, D. H.; KIM, G. Y. et al. *Hydrangeae Dulcis Folium* Attenuates Physical Stress by Suppressing ACTH-Induced Cortisol in Zebrafish. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 26, n. 2, p. 130-137, 2020. Article.

OKSANA, S. e. a. Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. **Journal of Medicinal Plants Research**, 6, n. 13, p. 2526-2539, 2012.

OLIVEIRA, D. d. S.; AQUINO, P. P.; RIBEIRO, S. M. R. et al. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, 33, n. 1, 03/29. 2011.

OU, Z. Q.; RADES, T.; MCDOWELL, A. Anti-Ageing Effects of *Sonchus oleraceus* L. (puha) Leaf Extracts on H₂O₂-Induced Cell Senescence. **Molecules**, 20, n. 3, p. 4548-4564, Mar. 2015. Article.

OU, Z. Q.; SCHMIERER, D. M.; RADES, T. et al. Application of an online post-column derivatization HPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in *Sonchus oleraceus* L. leaf extracts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 65, n. 2, p. 271-279, Feb. 2013. Article.

OYAIZU, M. Studies on Products of Browning Reaction Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S. et al. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 16, p. 189-195, 2014.

PAULIN, J. V. **Abordagem alternativa para síntese de melanina**. 2016. 111 p. f. (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho", Bauru.

PEERZADA, A. M.; O'DONNELL, C.; ADKINS, S. Biology, impact, and management of common sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, 41, n. 8, p. 136, 2019/07/16. 2019.

POURMAND, M.; ASGHARZADEH, M.; RASHEDI, J. Vitiligo Treatment in Ancient Iranian Medicine. **Iran J Public Health**, 45, n. 8, p. 1100–1101, 2016.

PRICHOA, F. C.; ROMAN, S. S.; MANFREDINI, V. Tissue injuries of wistar rats treated with hydroalcoholic extract of *Sonchus oleraceus* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 47, n. 3, p. 605-613, Jul-Sep. 2011. Article.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, 269, n. 2, p. 337-341, 5/1/. 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005/05/01. 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: 2010.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, n. 9–10, p. 1231-1237, 5//. 1999.

RESENDE, J. H. C.; AQUINO, G. S. T.; NASCIMENTO, F. R. F. et al. Oral use of an infusion of leaves of *Solanum paniculatum* L., *Jacaranda brasiliensis* and *Sonchus oleraceus* for treatment of vitiligo. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, 5, p. 317-331, 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, p. 771-780, 2004.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu Rev Nutr**, 22, p. 19-34, 2002.

SAMPAIO, T. I. S.; MELO, N. C.; PAIVA, B. T. F. et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, 224, p. 563-578, 2018. Article.

SANTOS, I. C. d.; CARVALHO, O. C. d.; FERREIRA, E. D. et al. Serralha - *Sonchus oleraceus* L. Belo Horizonte: 3 p. 2012.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, 31, p. 897-902, 2001.

SELDERSLAGHS, I. W.; VAN ROMPAY, A. R.; DE COEN, W. et al. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. **Reprod Toxicol**, 28, n. 3, p. 308-320, Nov. 2009.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Food / Nahrung**, 44, n. 3, p. 158-163, 2000.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, 28, n. 1, p. 49-55, March. 1977.

SOUZA, A. P. F. d. S.; CARVALHO, F. T.; ROCHA, K. B. et al. Associação de eventos estressores ao surgimento ou agravamento de vitiligo e psoríase. **Psico**, 36, n. 2, p. 167-174, 2005.

SY MOHAMAD, S. F.; MOHD SAID, F.; ABDUL MUNAIM, M. S. et al. Proximate composition, minerals contents, functional properties of Mastura variety jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds and lethal effects of its crude extract on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Food Research**, 3, n. 5, p. 546 - 555, 2019.

TEIXEIRA, F. F.; SANTOS, J. B. D.; RAMALHO, M. A. P. et al. QTL mapping for angular leaf spot in common bean using microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5, p. 272-278, 2005.

TEUGWA, C. M.; MEJIATO, P. C.; ZOFOU, D. et al. Antioxidant and antidiabetic profiles of two African medicinal plants: *Picralima nitida* (Apocynaceae) and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, 13, p. 9, Jul. 2013. Article.

THIAGARAJAN, S. K.; KRISHNAN, K. R.; EI, T. et al. Evaluation of the Effect of Aqueous *Momordica charantia* Linn. Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2019, 2019. Article.

VASCONCELOS, L. L. d.; SANTOS, S. L. F. d.; BARROS, F. H. d. S. et al. VITILIGO E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS PARA O SEU TRATAMENTO. *In: Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica (EEDIC)*, 2015, 1. 1.

VIANA, M. M. S.; CARLOS, L. A.; SILVA, E. C. et al. Phytochemical composition and antioxidant potential of unconventional vegetables. **Horticultura Brasileira**, 33, n. 4, p. 504-509, 2015. Article.

VILELA, F. C.; PADILHA, M. D.; DOS SANTOS-E-SILVA, L. et al. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, n. 2, p. 306-310, Jul. 2009. Article.

VILELA, F. C.; PADILHA, M. M.; SILVA, L. S. et al. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, n. 2, p. 306-310, 2009. Article.

VILELA, F. C.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 124, n. 2, p. 325-327, 2009. Article.

- VOELZ, K.; GRATACAP, R. L.; WHEELER, R. T. A zebrafish larval model reveals early tissue-specific innate immune responses to *Mucor circinelloides*. **Dis Model Mech**, 8, n. 11, p. 1375-1388, Nov. 2015.
- XIONG, G.; DENG, Y.; CAO, Z. et al. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish and Shellfish Immunology**, 95, p. 399-410, 2019. Article.
- XU, Y.; LIANG, J. Y. Chemical constituents of *Sonchus oleraceus* L. **Journal of China Pharmaceutical University**, 36, n. 5, p. 411-413, 2005. Article.
- YAMADA, T.; CASTRO, P. R. d. C. e. Efeitos do glifosato nas plantas: Implicações fisiológicas e agronômicas :32 p. 2007.
- YANG, L. F.; ZHAO, B. N.; DING, X. Y. et al. Spectrum-effect relationship of angiogenesis activity and cardioprotection of water-soluble components of *Salvia miltiorrhiza* in zebrafish. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 50, n. 12, p. 2899-2907, 2019. Article.
- YIN, J.; HEO, S. I.; JUNG, M. J. et al. Antioxidant Activity of Fractions from 70% Methanolic Extract of *Sonchus oleraceus* L. . **Food Science and Biotechnology**, 17, n. 6, p. 1299-1304, Dec. 2008.
- YIN, J.; SI, C.-L.; WANG, M.-H. Antioxidant Activity of Flavonoids and Their Glucosides from *Sonchus oleraceus* L. **Journal of Applied Biological Chemistry** 51, n. 2, p. 57-60, 2008.
- ZAKARIA, F.; IBRAHIM, W. N. W.; ISMAIL, I. S. et al. LCMS/MS metabolite profiling and analysis of acute toxicity effect of the ethanolic extract of *Centella asiatica* on zebrafish model. **Pertanika Journal of Science and Technology**, 27, n. 2, p. 985-1003, 2019. Article.
- ZGHAIR, Z.; NAHI; YASEEN, Y. et al. The Effect of Crude Extracts of *Sonchus oleraceus* on Cancer Cell Growth (In vitro). **Iraqi J. Vet. Med.**, 34, n. 2, p. 30-38, 01/01. 2010.
- ZHONG, H.; AN, X.; LI, Y. et al. Sodium tanshinone IIA silate increases melanin synthesis by activating the MAPK and PKA pathways and protects melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress. **RSC Advances**, 9, n. 33, p. 18747-18757, 2019. 10.1039/C8RA09786K.