



MARIA DE FÁTIMA SANTOS

**MORFOANATOMIA FOLIAR, EFEITOS TOXICOLÓGICOS E
ANTI-INFLAMATÓRIO EM EMBRIÕES/LARVAS DE
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) APÓS A EXPOSIÇÃO À
DIFERENTES EXTRATOS E AO ÓLEO ESSENCIAL DE
Siparuna guianensis AUBLET (SIPARUNACEAE)**

**LAVRAS - MG
2022**

MARIA DE FÁTIMA SANTOS

**MORFOANATOMIA FOLIAR, EFEITOS TOXICOLÓGICOS E ANTI-
INFLAMATÓRIO EM EMBRIÕES/LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) APÓS A
EXPOSIÇÃO À DIFERENTES EXTRATOS E AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Siparuna
guianensis* AUBLET (SIPARUNACEAE)**

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

Prof^a. Dr^a. Elisângela Elena Nunes Carvalho
Orientadora

Prof. Dr. Manuel Lousada Gavilanes
Coorientador

Prof. Dr. Marcos Ferrante
Coorientador

LAVRAS – MG

2022

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

Santos, Maria de Fátima.

Morfoanatomia foliar, efeitos toxicológicos e anti-inflamatório em embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*) após a exposição à diferentes extratos e ao óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae) / Maria de Fátima Santos. - 2022.

154 p. : il.

Orientador(a): Elisângela Elena Nunes Carvalho.

Coorientador(a): Manuel Lousada Gavilanes, Marcos Ferrante.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Negramina. 2. Anfihipoestomática. 3. Neutrófilos. I. Carvalho, Elisângela Elena Nunes. II. Gavilanes, Manuel Lousada. III. Ferrante, Marcos. IV. Título.

MARIA DE FÁTIMA SANTOS

MORFOANATOMIA FOLIAR, EFEITOS TOXICOLÓGICOS E ANTI-INFLAMATÓRIO EM EMBRIÕES/LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) APÓS A EXPOSIÇÃO À DIFERENTES EXTRATOS E AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Siparuna guianensis* AUBLET (SIPARUNACEAE)

LEAF MORPHANATOMY, TOXICOLOGICAL AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) EMBRYO/LARVAE AFTER EXPOSURE TO DIFFERENT EXTRACTS AND ESSENTIAL OIL OF *Siparuna guianensis* AUBLET (SIPARUNACEAE)

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

APROVADA em 28 de março de 2022

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dr. Marcos Ferrante UFLA

Dr^a. Brigida Monteiro Vilas Boas IFSULDEMINAS Campus Machado

Prof^a. Dr^a. Elisângela Elena Nunes Carvalho
Orientadora

Prof. Dr. Manuel Lousada Gavilanes
Coorientador

Prof. Dr. Marcos Ferrante
Coorientador

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por ter me concedido a graça de concluir esta etapa tão importante da minha vida.

Aos meus pais, João Manoel e Maria Aparecida pela vida, dedicação, amor e apoio incondicionais e por serem meu admirável exemplo de vida a seguir. À minha irmã Crislane e ao meu cunhado Carlos pelo companheirismo, pelas palavras de amizade e por estarem sempre ao meu lado. Aos meus sobrinhos João Vitor e Ana Julia por me darem forças para conseguir alcançar todos os meus objetivos.

A minha orientadora Elisângela Elena Nunes Carvalho e os coorientadores Manuel Lousada Gavilanes e Marcos Ferrante, pela paciência, dedicação, orientação e conselhos durante todo este tempo juntos.

Ao professor Eduardo Valério de Barros Vilas Boas por ter me acolhido no Laboratório de Pós-colheita de frutos e hortaliças.

Os meus amigos Quênia, Dayana, Táina Rocha, Natalia Ruas, Ana Paula, Wesley e Isabela pelo companheirismo, paciência e amizade.

A “Família Biotério”, Kiara, Bárbara, Tassia, Aline e William, pelo companheirismo, que muito me ajudaram dia e noite durante o desenvolvimento do projeto, pela paciência e principalmente, pelas palavras amigas dentro e fora do ambiente universitário.

A “Família Alimentos”, Ana Lassara, Hanna, Caio, Aline Noberto, Elidio, Rafael, Ingrid, Ana Beatriz e Danilo que me acolheram desde o primeiro dia que cheguei no Laboratório que estão presente todos os dias me escutando e aconselhando dentro e fora do ambiente de trabalho.

A Giulia e Giuliana por estarem comigo desde o início desta trajetória, pelo companheirismo, paciência e pela amizade durante está caminhada. Obrigada por terem me recebido nas “Las chicas”.

Os funcionários Giulia, Annete, Dico, Paulinho (*in memoria*), Creusa, Pamela, Fernanda, Willian e Aline Noberto pela ajuda e atenção durante toda a minha caminhada.

A todos os professores que fizeram parte de minha formação e contribuíram com minha chegada até aqui.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação de Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a concluir a etapa final dessa longa caminhada.

RESUMO GERAL

Siparuna guianensis Aublet é uma planta aromática, conhecida popularmente como negramina. Suas folhas são utilizadas tradicionalmente no tratamento de diversas enfermidades, como anti-inflamatório e antipirético. Este trabalho tem como objetivo verificar as características anatômicas da lâmina foliar, a toxicidade, o potencial anti-inflamatório, a capacidade de regeneração da nadadeira e atividade das enzimas antioxidantes dos extratos aquoso (EA), hidroetanólico (EH), metanólico (EM) e do óleo essencial (OE) das folhas *S. guianensis* em embriões e larvas de zebrafish. Para verificar as características anatômicas foi realizada a determinação de uma equação para estimar a área foliar, a quantificação e caracterização dos estômatos e foram utilizados diferentes métodos histoquímicas. A partir das folhas foram elaborados três tipos de extratos empregados diferentes solventes sendo, metanol, álcool 70° e água destilada; e a obtenção do OE foi realizada por hidrodestilação. Os principais compostos fenólicos presentes nos extratos foram determinados usando análise HPLC e a identificação e quantificação do OE através da análise cromatográfica. A toxicidade e teratogenicidade foram investigadas usando o modelo zebrafish. Embriões de zebrafish foram tratados com diferentes concentrações dos extratos (10 a 0,08mg/ml) e OE (200 a 0,39µg/ml) durante um período de 120 horas, sendo avaliadas mortalidade, eclosão e malformações. As concentrações não letais e teratogênicas foram utilizadas para a realização das análises de migração de neutrófilos; regeneração da nadadeira; apoptose e atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST). Foi identificada na análise anatômica das folhas a presença de estômatos na epiderme classificar as folhas como anfihipoestomática. Foi identificada a existência de tricomas do tipo tectores estrelados na epiderme abaxial e a presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, alcaloide, tanino e lignina, e a equação matemática obtida foi através da regressão linear por meio da relação comprimento e largura, utilizado o modelo $Y=3,5833+0,6715x$, com coeficiente de determinação de 0,97. Foi identificada nos extratos a presença de compostos fenólicos com o ácido trans-cinâmico. Os extratos apresentaram toxicidade, sendo para o EA nas concentrações de 2,5 a 10mg/ml e os EH e EM entre 0,62 a 10mg/ml. As larvas tratadas com EA não exibiram malformações. Todos os extratos testados demonstram atividade anti-inflamatória, no entanto não demonstram bom desempenho na regeneração da nadadeira. Os extratos não influenciaram na atividade da SOD e CAT. EA não induziu células apoptóticas ao contrário dos EH e EM. No OE foi identificado a presença do monoterpene β -Micerno (24,72%). No teste de inflamação, as diferentes concentrações apresentaram capacidade de reduzir a migração dos neutrófilos para o local lesionado das larvas, na regeneração da nadadeira caudal o OE demonstrou uma taxa de regeneração menor que os controles (DMSO 1% e Meio E3). Não foi verificada a influência do OE nas enzimas antioxidantes, por fim foram identificadas células apoptóticas na região do coração, na concentração de 12,5µg/ml. Concluiu-se que os estômatos desta espécie são classificados com paracíticos e os EA, EH, EM e o OE das folhas de *S. guianensis* apresentam atividade anti-inflamatória através da redução da migração dos neutrófilos.

Palavras-chaves: Anfihipoestomática. Histoquímicas. Negramina. Inflamação. Regeneração. Neutrófilos. *Danio rerio*.

GENERAL ABSTRACT

Siparuna guianensis Aublet is an aromatic plant, popularly known as negramina. Its leaves are traditionally used in the treatment of several diseases, as an anti-inflammatory and antipyretic. This work aims to verify the anatomical characteristics of the leaf blade, the toxicity, the anti-inflammatory potential, the capacity of caudal fin regeneration and activity of antioxidant enzymes of the aqueous (AE), hydroethanolic (HE), methanolic (ME) and essential oil (EO) extracts of *S. guianensis* leaves in zebrafish embryos and larvae. To verify the anatomical characteristics, an equation was determined to estimate the leaf area, the quantification and characterization of stomata and different histochemical methods were used. From the leaves, three types of extracts were prepared using different solvents (methanol, alcohol 70° and distilled water) and the EO was obtained by hydrodistillation. The main phenolic compounds present in the extracts were determined using HPLC analysis and the identification and quantification of the EO by chromatographic analysis. Toxicity and teratogenicity were investigated using the zebrafish model. Zebrafish embryos were treated with different concentrations of the extracts (10 to 0.08mg/ml) and OE (200 to 0.39µg/ml) for a period of 120 hours, and mortality, hatching and malformations were evaluated. The non-lethal and teratogenic concentrations were used for the analyses of neutrophil migration; caudal fin regeneration; apoptosis and activity of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST). It was identified in the anatomical analysis of the leaves the presence of stomas in the epidermis to classify the leaves as anfihiypoestomatics. The existence of stellate tector trichomes in the abaxial epidermis and the presence of secondary metabolites such as phenolic compounds, alkaloids, tannin and lignin were identified and the mathematical equation obtained was through linear regression by means of the length and width relationship, using the model $Y=3.5833+0.6715x$, with a determination coefficient of 0.97. It was identified in the extracts the presence of phenolic compounds with trans-cinnamic acid. The extracts showed toxicity, being for EA at concentrations from 2.5 to 10mg/ml and for EH and EM between 0.62 to 10mg/ml. The larvae treated with EA didn't exhibit malformations. All tested extracts demonstrate anti-inflammatory activity, however they do not show good performance in caudal fin regeneration. The extracts did not influence SOD and CAT activity. EA didn't induce apoptotic cells unlike EH and EM. In OE was identified the presence of the monoterpene β -Myrcene (24.72%). In the inflammation test, the different concentrations showed ability to reduce the migration of neutrophils to the site of the larvae, in the regeneration of the caudal fin the EA showed a lower regeneration rate than the controls (DMSO 1% and Medium E3). No influence of EO on antioxidant enzymes was verified. Finally, apoptotic cells were identified in the region of the heart at the concentration of 12.5µg/ml. Conclude that the stomata of this species are classified as paracytic and the EA, EH, EM and the OE of the leaves of *S. guianensis* present anti-inflammatory activity by reducing the migration of neutrophils.

Keywords: Anfihiypoestomatics. Histochemical. Negramina. Inflammation. Regeneration. Neutrophils. *Danio rerio*.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	14
2.1. Identificação botânica	14
2.2. Família Siparunaceae	15
2.3. Gênero <i>Siparuna</i> Aubl.	15
2.4. Espécie <i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	16
2.5. <i>Danio rerio</i> como modelo animal de pesquisa	22
2.6. Vantagens da utilização do zebrafish na pesquisa científica.....	24
2.6.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória	25
2.6.2. Avaliação da regeneração de cauda.....	26
2.6.3. Avaliação da toxicidade e apoptose celular	28
2.6.4. Avaliação das enzimas antioxidantes	30
2.7. Zebrafish com modelo animal para estudos com plantas medicinais.....	31
2.8. Processo inflamatório	33
2.8.1. Papel dos neutrófilos na inflamação.....	35
2.9. Anti-inflamatório	36
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	40
SEGUNDA PARTE- ARTIGOS	52
ARTIGO 1 - Análise estomática em folhas de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl. (Siparunaceae)	52
1. Introdução	53
2. Metodologia	54
Microscopia óptica (MO)	54
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	55
Análise dos estômatos	55
Estatística.....	55
3. Resultados.....	55
4. Discussão.....	59
5. Considerações Finais	60
Agradecimentos.....	60
Referências	60
ARTIGO 2 - Morfoanatomia e histoquímica da lâmina foliar de <i>Siparuna guianensis</i> (Siparunaceae)	62
1. INTRODUÇÃO.....	65

2.	MATERIAIS E MÉTODOS	66
2.1.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67
2.2.	Corte em nitrogênio líquido	67
2.3.	Microscopia Luz (ML)	67
2.3.	Histoquímica	68
3.	RESULTADOS	69
4.	DISCUSSÕES	73
5.	CONCLUSÃO	75
	Agradecimentos	75
	REFERÊNCIAS	75
ARTIGO 3 - Estimativa da área foliar de <i>Siparuna guianensis</i> Aubl. (Siparunaceae) utilizando método não destrutivo		79
1.	INTRODUÇÃO	82
2.	MATERIAL E MÉTODOS	83
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	85
4.	CONCLUSÃO	88
	Agradecimentos	88
	REFERÊNCIAS	89
ARTIGO 4 - Efeito anti-inflamatório, antioxidante, anti-apoptótico e embriotoxicidade de extratos foliares de <i>Siparuna guianensis</i> Aublet (Siparunaceae) em zebrafish (<i>Danio rerio</i>).		92
1.	INTRODUÇÃO	95
2.	MATERIAL E MÉTODOS	96
2.1.	Declaração de ética	96
2.2.	Obtenção do material vegetal	96
2.3.	Preparo do extrato	96
2.4.	Perfil de compostos fenólicos	97
2.4.1.	Obtenção do extrato para determinação do perfil de compostos fenólicos	97
2.4.2.	Determinação do perfil do composto fenólico	97
2.5.	Índice de atividade antioxidante (IAA)	98
2.7.	Testes de toxicidade aguda em embriões de peixes	99
2.8.	Atividade anti-inflamatória determinada pela migração de neutrófilos	99
2.9.	Teste de regeneração da nadadeira caudal de larva de zebrafish	100
2.10.	Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	100
2.10.2.	Catalase (CAT)	101
2.10.3.	Superóxido desmutase (SOD)	101
2.10.4.	Glutathione -s-transferase (GST)	101
2.11.	Identificação de células apoptóticas	102

2.12.	Análise estatística	102
3.	RESULTADOS	102
3.1.	Determinação do perfil do composto fenólico	102
3.2.	Índice de atividade antioxidante (IAA)	103
3.3.	Testes de toxicidade aguda em embriões de peixes	103
3.4.	Atividade anti-inflamatória determinada pela migração de neutrófilos	107
3.5.	Regeneração da nadadeira caudal	108
3.6.	Enzimas antioxidantes	109
3.7.	Apoptose celular	111
4.	DISCUSSÃO	111
5.	CONCLUSÃO	114
	Agradecimentos	114
	REFERÊNCIAS	115
	DOCUMENTOS SUPLEMENTARES	121
	ARTIGO 5 - Toxicidade e atividade anti-inflamatório do óleo essencial de <i>Siparuna guianensis</i> Aublet (Siparunaceae) em embriões e larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	122
1.	INTRODUÇÃO	125
2.	MATERIAL E MÉTODOS	126
2.1.	Obtenção do material vegetal	126
2.2.	Extração do óleo essencial (OE)	126
2.3.	Composição química do OE	127
2.4.	Criação e obtenção dos embriões	127
2.6.	Testes de toxicidade aguda em embriões de peixes	128
2.7.	Atividade anti-inflamatória determinada pela migração de neutrófilos	129
2.8.	Teste de regeneração da nadadeira caudal de larva de zebrafish	130
2.9.	Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	130
2.9.1.	Preparo do homogenato	130
2.9.2.	Catalase (CAT)	131
2.9.3.	Superóxido desmutase (SOD)	131
2.9.4.	Glutathione -s-transferase (GST)	131
2.10.	Identificação de células apoptóticas	132
2.10.1.	Identificação de células apoptóticas induzida por H₂O₂	132
2.11.	Análise estatística	132
3.	RESULTADOS	133
3.1.	Composição química	133
3.2.	Testes de toxicidade aguda em embriões de peixes	133
3.3.	Migração de neutrófilos e regeneração da nadadeira caudal	136

3.4. Enzimas antioxidantes	138
3.5. Apoptose celular.....	139
5. CONCLUSÃO	145
Agradecimentos.....	146
REFERÊNCIAS.....	146
DOCUMENTOS SUPLEMENTARES	153

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas ao longo do tempo pela população por meio de chás (infusão e decocção), cataplasmas, banhos, tinturas, xarope, melito, óleo essencial, gargarejo e pomadas no tratamento de diversas enfermidades, sendo considerada planta com ação medicinal qualquer espécie que apresenta uma ou várias estruturas vegetais compostas por princípios ativos que podem ser utilizados com a finalidade terapêutica ou para a elaboração de fármacos semissintéticos (SANTOS; IORI, 2017; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; WHO, 1998).

Diante as diversas atividades atribuídas às plantas, um dos maiores problemas na sua utilização está relacionada à forma incorreta da identificação. O uso da nomenclatura botânica é importante para que não ocorra divergências entre espécies, pois inúmeras plantas apresentam o mesmo nome popular. Existem várias maneiras para identificar uma espécie botânica, como a confecção de exsicata, análise organoléptica, macroscópica, microscópica e fitoquímica (CHANDA, 2014; LORENZI; MATOS, 2008).

Um exemplo de planta que apresenta diferentes nomes populares é a *Siparuna guianensis* Aubl., (Siparunaceae) que é considerada uma planta aromática; vulgarmente conhecida como “negramina”, “folha-santa”, “marinheiro”, “capitiú”, “mata-cachorro”, “catingoso” e “formigueiro”. Sendo localizada desde a Nicarágua, América do Sul até o Paraguai; no Brasil esta espécie é encontrada em diferentes domínios fitogeográficos como na Mata Atlântica, Amazônia, Caatinga e no Cerrado (PEIXOTO; LIRIO; PIGNAL, 2020; SANTOS et al., 2022; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

As folhas de *Siparuna guianensis* possuem uma vasta indicação etnobotânica e etnofarmacológica como carminativas, antidiarréicas, anti-inflamatória, diuréticas, sendo também utilizada no tratamento de sinusite, reumatismo, enxaqueca, gripe, dores no corpo, febre, antibiótico pós-parto e pressão arterial alta (AGUIAR et al., 2015; LECANTE et al., 2011; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010). Na composição química do óleo essencial, obtido das folhas desta planta, já foram identificadas a presença de β -Mirceno, Germacreno D, Bicyclgermacreno, Humuleno, Elemeno, Siparunona e Epicurzerenona (AGUIAR et al., 2015; ANDRADE et al., 2015; FERREIRA et al., 2020; FERREIRA et al., 2017; LOURENÇO et al., 2018; MOURA et al., 2021; PORTELLA et al., 2014) e em estudos químicos revelaram a presença de alcaloides, flavonoides, taninos, cumarina e compostos

fenólicos nas folhas de *S. guianensis* (BRAZ FILHO et al., 1976; CARVALHO et al., 2020; CONEGUNDES et al., 2021; FACUNDO et al., 2012; NEGRI; SANTI; TABACH, 2012; THOMÉ et al., 2012). Apesar de suas aplicações terapêuticas, são limitadas as pesquisas científicas *in vivo* com as folhas desta espécie, para a comprovação dos seus efeitos e possível toxicidade utilizado modelo *Danio rerio* (Cyprinidae).

O *Danio rerio* popularmente conhecido no Brasil como “zebrafish”, “paulistinha” e “bandeirinha” tornou-se amplamente empregado como organismo modelo vertebrado em pesquisas científicas, devido à sua semelhança fisiológica com os mamíferos, apresentando genoma totalmente sequenciado. Todas as suas fases de vida são utilizadas em diferentes análises, desde biologia do desenvolvimento e toxicologia comportamental (HE et al., 2020; HENRY et al., 2013; TEAME et al., 2019; XIONG et al., 2019; YANG et al., 2018).

Baseado nos argumentos apresentados, neste estudo, investigou-se à morfoanatomia da lâmina foliar e analisou-se à toxicidade, potencial anti-inflamatória, regeneração da nadadeira caudal e a atividade das enzimas antioxidantes, em embriões e larvas de zebrafish tratados com os extratos aquoso, hidroetanólico, metanólico e ao óleo essencial das folhas de *Siparuna guianensis*.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Identificação botânica

No Brasil, as plantas medicinais são utilizadas pela população para tratar várias enfermidades, principalmente, as pessoas que residem no interior; na maioria das vezes isto ocorre, devido à dificuldade no acesso ao serviço de saúde ou alto custo dos fármacos industrializados. Porém, o uso e a comercialização em regiões metropolitanas estão em expansão, sendo encontradas em feiras livres e mercados populares (ALVES et al., 2016; BRIZZOLLA et al., 2018; SILVA; MARINI; MELO, 2015). Diante da biodiversidade encontrada no Brasil, as pesquisas realizadas com plantas medicinais, ainda são incipientes, havendo uma carência de informações sobre a utilização, composição química, formas de cultivo, caracterização botânica e atividade biológica (SANTOS; IORI, 2017).

Um dos principais problemas da utilização de plantas é a identificação incorreta da espécie. Tanto para realizar um trabalho científico ou apenas no uso da planta no combate de alguma doença é necessária a identificação botânica da espécie (LORENZI; MATOS, 2008). A utilização da nomenclatura botânica é importante, para que não ocorra confusão entre espécies, pois existem vários vegetais com mesmo nome popular, por exemplo; a planta conhecida como bálsamo pode ser a *Myroxylon peruiferum* L.f. - Fabaceae (usada no tratamento de reumatismo e asma) ou *Schinus molle* L. - Anacardiaceae (apresenta propriedade adstringente, diurética, purgativa e em doses fortes pode provocar aborto). Outro exemplo são as espécies *Dracontium asperum* K. Koch (Araceae) e *Taccarum ulei* Engl. & K. Krause (Araceae) que são conhecidas como jararaca. Assim, espécies totalmente diferentes podem apresentar mesmo nome popular (LORENZI; MATOS, 2008).

Existem várias maneiras para identificar uma espécie botânica. Inicialmente, para estudos científicos é necessário confeccionar a exsicata ou “voucher”, este material consiste em um ramo da planta, contendo flores e/ou frutos, posteriormente prensada e seca. Após este processo, esta amostra vegetal é encaminhada a um herbário, onde será identificada e registrada (LORENZI; MATOS, 2008).

O material vegetal também pode ser identificado por meio de testes organolépticos, macroscópicos, microscópicos e fitoquímicos. A identificação organoléptica é o meio mais simples e rápido, estando relacionado com o formato, tamanho, cor, odor e sabor. O macroscópico, que é a descrição morfológica de parte da planta, vista a olho nu ou com auxílio de lente de aumento. O microscópico, que é o estudo anatômico, executado com a

utilização de microscópio óptico ou eletrônico. E o teste fitoquímico é realizado para identificação dos compostos químicos (CHANDA, 2014).

Outro aspecto importante para a identificação correta de plantas são as características morfológicas, embora erros de classificação possam ocorrer devido à semelhança entre espécies, principalmente quando o material vegetal se encontra pulverizado como exemplo no caso da *Mikania* spp. (Asteraceae), *Passiflora* spp. (Passifloraceae), e *Piper* spp. (Piperaceae) (BOBEK et al., 2016).

2.2 Família Siparunaceae

Siparunaceae é uma família desmembrada da família Monimiaceae. Nela encontram-se plantas de hábito arbóreo ou arbustivo, com odor cítrico desagradável. Suas folhas são simples, elípticas (exceto em *Siparuna monogyna* Jangoux, Jacques Ivan G. - Siparunaceae), verticiladas ou opostas, margens inteiras, denteadas ou serradas sem estípulas. Algumas espécies são glabras enquanto outras apresentam vários tipos de tricomas nas folhas ou/e ramos, sendo tricomas simples, estrelados ou escamosos (SILVA; SILVA, 2008). As inflorescências são cimosas e agregadas, apresentando flores não vistosas, actinomorfas ou assimétricas, monoclamídeas e receptáculo floral bem desenvolvido. No Brasil, a Siparunaceae não está presente somente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (HALL; MEIRELLES, 2017).

Siparunaceae é dividida em dois gêneros: *Glossocalyx* Benth e *Siparuna* Aubl. O primeiro gênero encontra-se espécies na África Ocidental e aproximadamente 70 espécies distribuídas desde o México, Caribe, Paraguai e Argentina. O gênero *Siparuna* é composto de 53 a 74 espécies distribuídas no México ao Paraguai. No Brasil, encontram-se 47 espécies (HALL; MEIRELLES, 2017; SILVA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2021; SILVA; SILVA, 2008).

2.3 Gênero *Siparuna* Aubl.

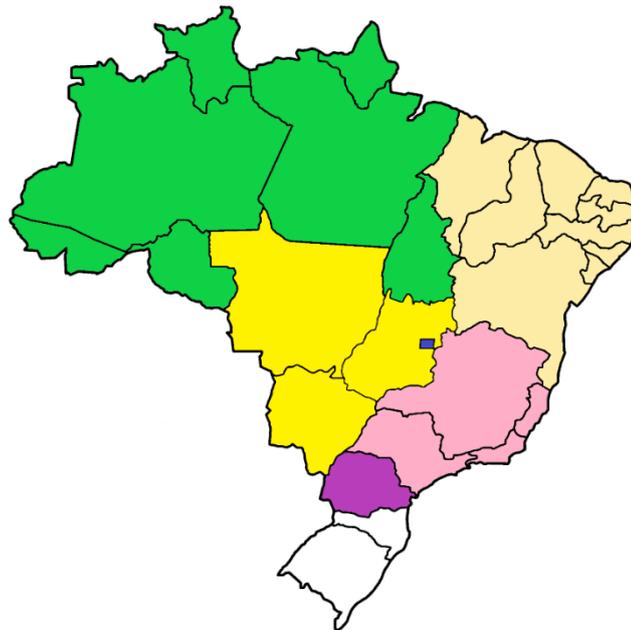
É composto por espécies aromáticas, sendo encontradas na forma de arbustos sarmentosos, arvoretas ou árvores, monoicas ou dioicas, com folhas decussadas ou reticuladas e isófilas. Flores unissexuais e com receptáculo dos frutos carnosos, normalmente globoso, ocorrendo sua abertura a partir do ápice, apresentando cheiro pungente. São identificados no Brasil as espécies: *Siparuna bifida* (Poepp. & Endl.) A.DC., *Siparuna guianensis* Aubl., *Siparuna krukovii* A.C.Sm., *Siparuna poeppigii* (Tul.) A.DC., e *Siparuna ficoides* S.S. Renner

& Hausner (HALL; MEIRELLES, 2017; SILVA, OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2021).

2.4 Espécie *Siparuna guianensis* Aubl.

A *Siparuna guianensis* (sinónimas *Citriosma discolor* Poepp & Endl.; *Citriosma guianensis* Aublet; *Citriosma glubrescens* Mart, *Siparuna discolor* (Poepp. & Endl.) A.DC.; *Siparuna arianae* M.V.L. Pereira; *Siparuna cavalcantei* Jangoux e *Siparuna panamensis* A.DC.) é uma planta aromática, muito utilizada na medicina tradicional e para a conservação de biomas (AMARAL et al., 2017; BRAGA; BORGES; MARTINS, 2015; COUTINHO et al., 2019; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010). Popularmente conhecida como “capitiú”, “negramina”, “catingueira-de-paca”, “fedegoso”, “limão-bravo”, “erva-santa”, “folha-santa”, “marinheiro”, “mata-cachorro”, “cicatrizante-das-guianas”, “amescla-de-cheiro” e “jaqueira”. Sendo localizada desde a Nicarágua, América do Sul até o Paraguai; no Brasil esta espécie é encontrada em diferentes domínios fitogeográficos como na Mata Atlântica, Amazônia, Caatinga e no Cerrado (FIGURA 1) (PEIXOTO; LIRIO; PIGNAL, 2020; SANTOS et al., 2022; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

Figura 1 – Mapa do Brasil mostrando a distribuição geográfica da *Siparuna guianensis* no Brasil



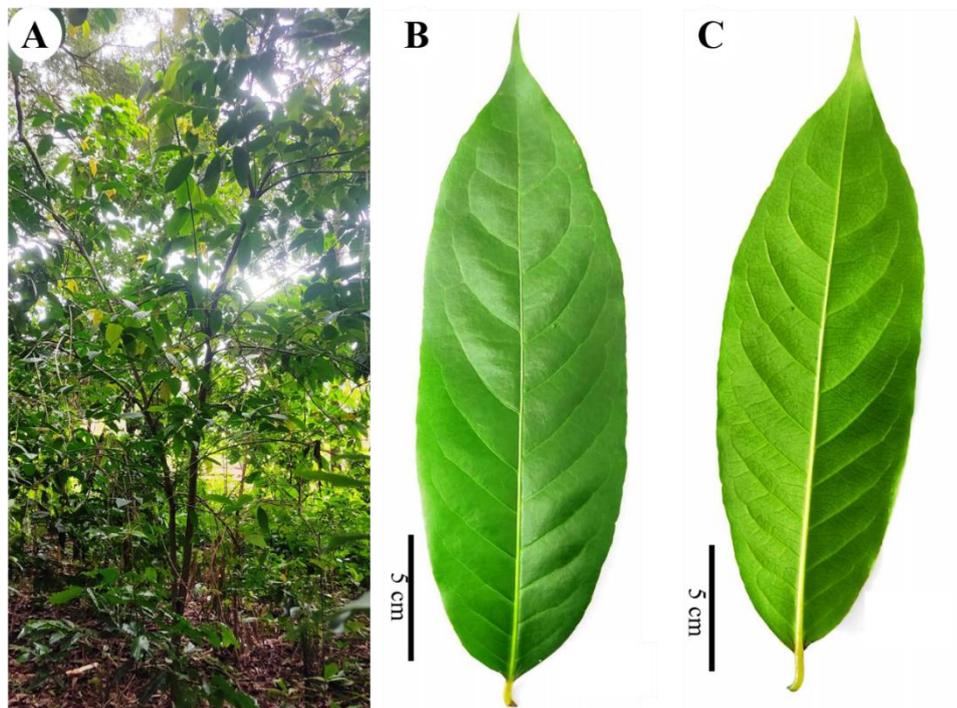
Legenda: Cor verde região norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), cor bege região nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe); cor amarelo e azul região centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso); cor rosa região sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e cor roxa região sul (Paraná). Área em branco no mapa significa ausência da espécie *Siparuna guianensis*.

Fonte: Adaptado de Peixoto, Lirio e Pignal (2020).

As folhas de *Siparuna guianensis* são utilizadas na medicina popular como estimulante, antidispéptica, antiflatulento, diurética, antipirético, anti-inflamatório, antimalária, dores reumáticas e sinusite, também é utilizada em picada de cobra, inseticida, repelente, isca para peixe e no combate ao piolho de galinha (ALMEIDA et al., 2021; CARVALHO et al., 2020; CONEGUNDES et al., 2021; FACUNDO et al., 2012; FERREIRA et al., 2020; MOURA et al., 2020; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010). O óleo essencial extraído das folhas de *S. guianensis* é empregado como, anticariogênicos (MELO et al., 2017), antimicobacteriano (ANDRADE et al., 2015; MELO et al., 2017), anti-leishmania (ANDRADE et al., 2016) atividade acaricida (DINIZ et al., 2022), antifúngico, inseticida e repelente (AGUIAR et al., 2015; MOURA et al., 2021).

A *Siparuna guianensis* é uma espécie perenifólia, arbustos ou arvoretas, podendo atingir cerca 5 a 15 m de altura (FIGURA 2A). As folhas são simples (FIGURA 2B e C), membranáceas, de margens lisas com 9 a 11 pares de nervuras secundárias levemente salientes na face adaxial. As inflorescências ocorrem em forma de cachos com 1-1,5 cm de comprimento, contendo 5 a 15 flores (FIGURA 3B). Sua floração ocorre de agosto a outubro, sendo o amadurecimento dos frutos (FIGURA 3A) de dezembro a maio (MAGALHÃES et al., 2018; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

Figura 2 – Fotografias de Indivíduo da espécie *Siparuna guianensis* localizado em Remanescente de Floresta Estacional Semidecidual.



Legenda: A) arvoreta de *S. guianensis*; B) folha na face adaxial e C) folha na face abaxial.
Fonte: Do autor (2022).

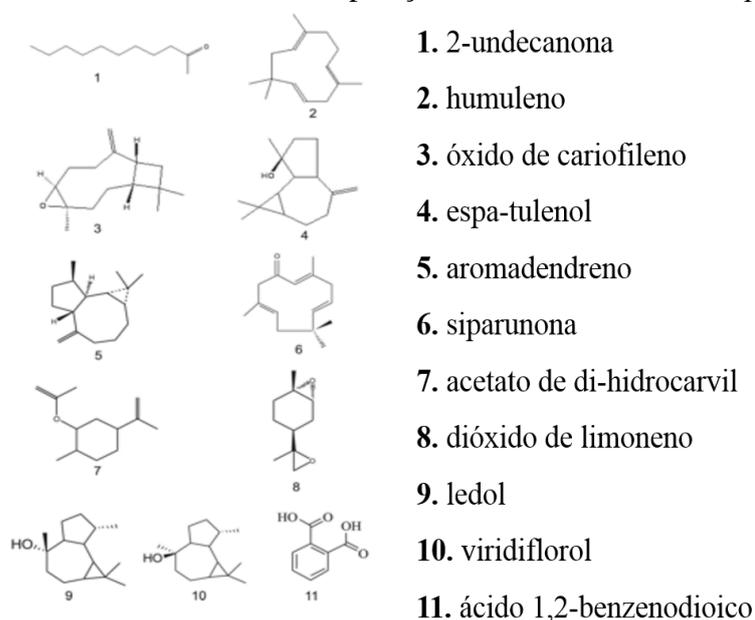
Figura 3 – Fotografia de: (A) Frutos maduros e (B) Flores de *Siparuna guianensis*



Fonte: Valentini, Rodríguez-Ortíz e Coelho (2010).

Na composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Siparuna guianensis* (FIGURA 4) foram identificados hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados, hidrocarbonetos monoterpênicos, β -mirceno, germacreno D, biciclogermacreno, E,E-farnesol, siparunona, ácido decanoico, curzerenona, (E) Nerolidol, humuleno, óxido cariofileno, espatulenol, aromadendreno, acetato de di-hidrocarvil, dióxido de limoneno, ledol, viridiflorol, ácido 1,2-benzenodioico, 2-undecanona, α -muuroleno, espatulenol, elemol, α -pineno, α -felandreno, (E) - β -ocimeno, undecan-2-ono, δ -elemeno, β -cubebeno, α -copaeno, β -ilangeno e trans- β -elemenona (AGUIAR et al., 2015; ANTONIO, 1985; FISCHER et al., 2005; MACHADO et al., 1998; MARTINS et al., 2021; MELO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2020; VALENTINI et al., 2010). No óleo essencial extraídos dos frutos frescos foram verificadas a presença de 2-undecanona, β -pineno e limoneno (FISCHER et al., 2005).

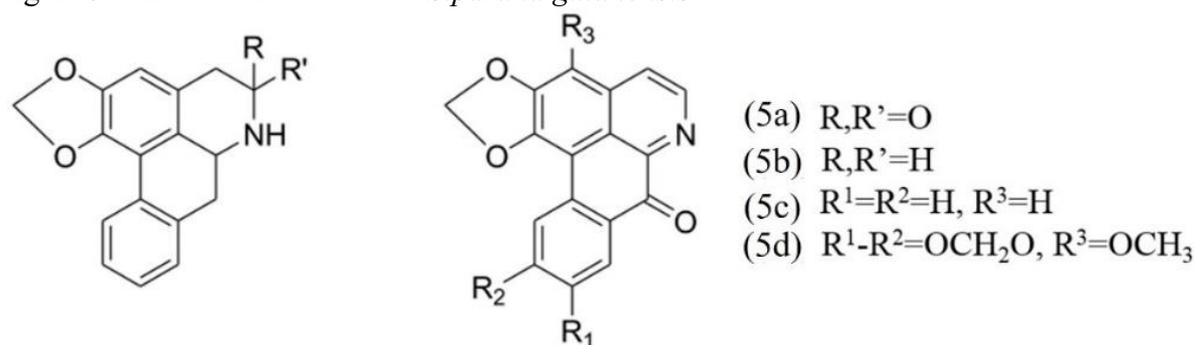
Figura 4 - Compostos identificados na composição volátil das folhas da *Siparuna guianensis*



Fonte: Adaptado de Valentini et al. (2010).

Estudos químicos revelaram a presença de alcaloides, flavonoides, taninos, cumarina e compostos fenólicos nas folhas de *Siparuna guianensis* (BRAZ FILHO et al., 1976; CARVALHO et al., 2020; CONEGUNDES et al., 2021; FACUNDO et al., 2012; NEGRI; SANTI; TABACH, 2012; THOMÉ et al., 2012). Braz Filho et al. (1976) isolaram quatro alcaloides (FIGURA 5), sendo o aporfina denominados fuseína (5a), 1,2-metilenodióxido-5-oxoaporfina (5b), liriodenina (5c) e cassamedina (5d). No trabalho de Leitão et al. (2005) através da cromatografia em contracorrente (CCC) isolaram três flavonoides (FIGURA 6): a quercetina (6a) e dois de seus derivados glicosilados (6b) e (6c). Foi identificado na fração diclorometano das folhas de *S. guianensis* uma mistura de flavonoides glicosilados e metoxilados, sendo: kaempferol-pentosil-pentosido-ramnósido; dirhamnosídeo de caempferol; caempferol-pentosil-ramosídeo; ramnosil-caempferol e éter dimetílico de caempferol (CONEGUNDES et al., 2021). Também foi observado no extrato hidroetanólico obtido da parte aérea fresca a presença vicenina-2 (apigenina-6,8-di-C-glicosídeo), quercetina 3-O-rutinoside-7-O-rhamnoside, quercetina-3-O-pentosyl-pentoside-7-O-rhamnoside, campferol-3-O-pentosil-pentosido-7-O-ramnósido, quercetina-3,7-di-O-ramosídeo e o kaempferol-3,7di-O-ramnosídeo (NEGRI; SANTI; TABACH, 2012).

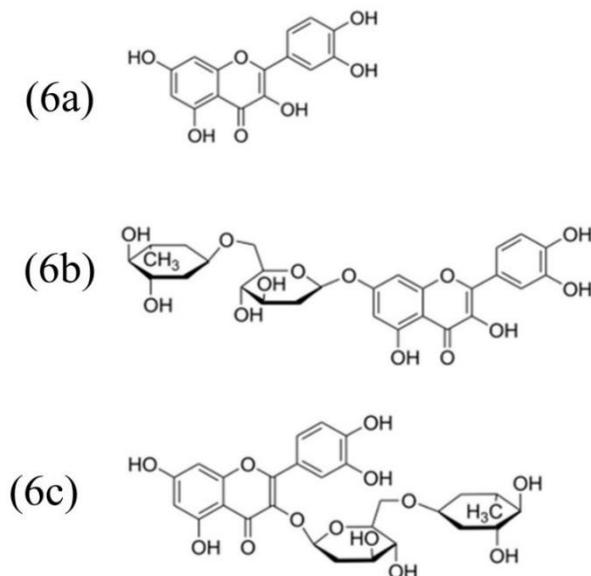
Figura 5 - Alcaloides isolados da *Siparuna guianensis*



Legenda: (5a) aporfina denominados fuseína; (5b) 1,2-metilenodióxido-5-oxoaporfina; (5c) liriodenina e (5d) cassamedina.

Fonte: Adaptado de Silva, Valentini e Barros (2015).

Figura 6 - Flavonoides presentes na espécie *Siparuna guianensis* isolados através da cromatografia em contracorrente (CCC)



Legenda: (6a) quercetina e dois de seus derivados glicosilados (6b) e (6c).

Fonte: Silva, Valentini e Barros (2015).

O rendimento do óleo essencial foi verificado em diversos trabalhos, Silva, Valentini e Barros (2015) relataram que a maior quantidade de óleo aromático extraída das folhas ocorreu nos períodos reprodutivos, quando as plantas estavam liberando botões florais, flores e frutos (TABELA 1). Castellani et al. (2006) verificaram que visando otimizar as operações de manejo a estação do outono é a melhor época para obter um alto rendimento. Segundo Valentini et al (2010) a *Siparuna guianensis* demonstrou variação do rendimento do óleo em função da fenologia e variações meteorológicas da cidade de Cuiabá, MT, apresentando melhor rendimento no período reprodutivo.

Tabela 1 - Rendimento percentual do óleo essencial extraído das folhas de *Siparuna guianensis*

Período da Coleta	Massa da folha utilizada (g)	Massa de óleo obtida (g)	Rendimento (%)
Nov/2007	53,80	0,060	0,1115
Dez/2007	31,50	0,106	0,3365
Jan/2008	58,69	0,1265	0,2155
Fev/2008	33,05	0,0330	0,0998
Mar/2008	52,04	0,0520	0,0999
Abr/2008	43,15	0,1081	0,2505
Mai/2008	45,74	0,1380	0,3017
Jun/2008	36,38	0,1730	0,4755

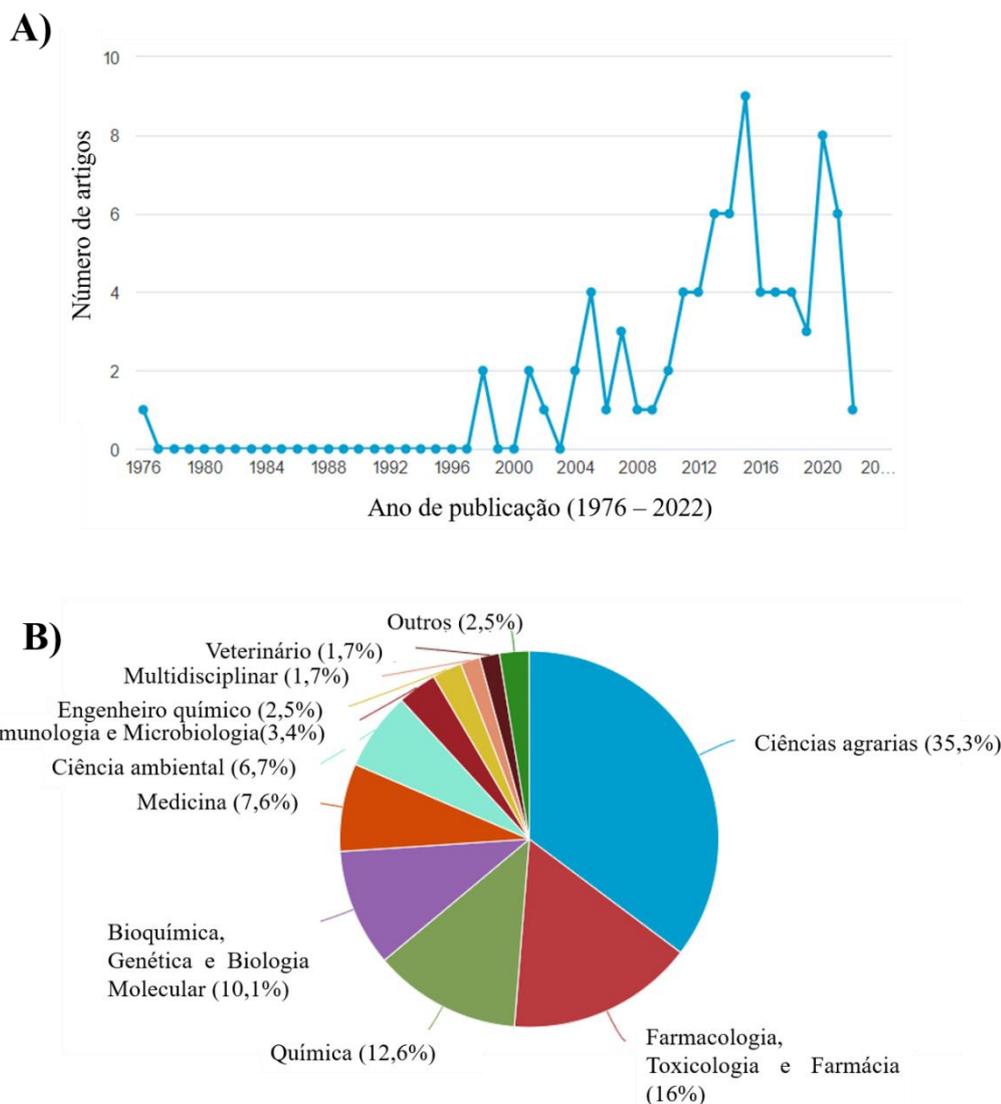
Fonte: Silva, Valentini e Barros (2015).

Óleos essenciais de *Siparuna guianensis* são extraídos para diferentes utilizações, sendo que sua composição química pode mudar conforme a região e as estações do ano. Óleos

extraídos com folhas coletadas em Moju no Pará apresentaram epi- α -bisabolol (25,1%) e espatulenol (15,7%), amostras coletadas em Rio Branco no Acre apresentaram espatulenol (22,0%), selin-11-en-4 α -ol (19,4%), β -eudesmol (10,0%) e elemol (10,0%). Enquanto amostras obtidas no Belém do Pará demonstram a presença de germacrona (23,2%), D-germacreno (10,9%), bicíclicomacreno (8,6%), B-germacreno (8,0%) e atractilona (31,4%) (ZOGHBI et al., 1998).

Sobre a bioatividade, o óleo essencial apresenta ação antibacteriana contra bactéria *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus aureus*, *Mycobacterium avium* e apresentou atividade moderada contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium kansasii* (BERSAN et al., 2014; BESSA et al., 2015; MELO et al., 2017); demonstrou alta atividade contra *Leishmania amazonenses*, citotoxicidade contra células L6 (ANDRADE et al., 2016) e ação repelente ao *Aedes Aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Galleria mellonella* e *Achroia grisella* (AGUIAR et al., 2015; FERREIRA et al., 2017). Em outro trabalho Andrade et al. (2013) verificaram a baixa atividade antioxidante do óleo pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e não sendo evidenciada pelo método de sequestro de radicais livres (ABIDIN), já o extrato foliar de diclorometano apresentou atividade antioxidante nos testes de DPPH, fosfomolibidênio e peroxidação lipídica utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA) (CONEGUNDES, 2017; CONEGUNDES et al., 2021). Os extratos etanólicos das folhas de *Siparuna guianensis* apresentaram atividade anti-tripanosoma, citostática e citotóxica na linha de células de câncer de mama SKBR3 (TAYLOR et al., 2013; TAYLOR et al., 2006; TEMPONE et al., 2005). E o extrato de diclorometano das folhas demonstrou atividade anti-inflamatória *in vivo*, pelo método do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em ratos (CONEGUNDES et al., 2021).

Nos últimos 46 anos, foram publicados somente 79 artigos científicos, de acordo com a base de dados Scopus (pesquisa realizada 08/03/2022) relacionada à palavra-chave “*Siparuna guianensis*”, onde o primeiro trabalho foi realizado em 1976 (FIGURA 7A). A principal área de pesquisa destes documentos é a Ciência Agrária e Biológicas (35,3%), seguida pela Farmacologia, Toxicologia e Farmácia (16%) (FIGURA 7B). Apesar de sua vasta aplicação terapêutica, são limitadas as pesquisas científicas com a espécie, fazendo-se necessário mais estudo para comprovar seus efeitos medicinais.

Figura 7 - Levantamento do número de artigos e a área de atuação com a *Siparuna guianensis*

Fonte: Scopus (Editora Elsevier).

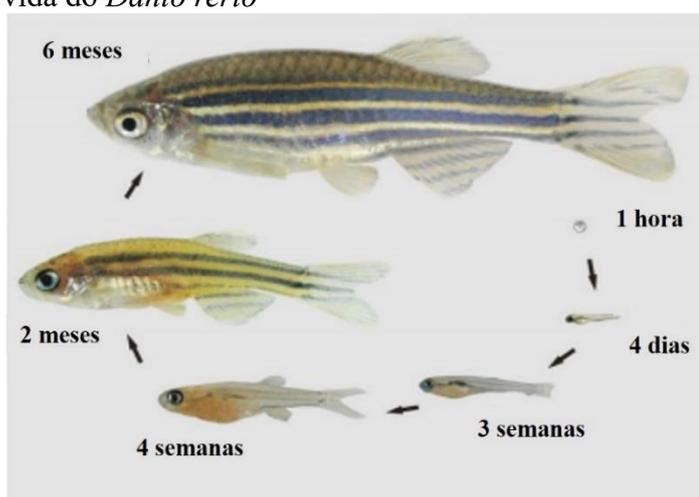
2.5. *Danio rerio* como modelo animal de pesquisa

O *Danio rerio* (sinônimas - *Brachydanio rerio*) é um peixe teleósteo pertencente à família Cyprinidae da ordem Cypriniformes, bastante utilizado com peixe ornamental, popularmente conhecido no Brasil como “zebrafish”, “paulistinha”, “bandeira-paulista” e “bandeirinha”, é um animal de água doce de regiões tropicais, oriundo do rio Ganges e seus afluentes no norte da Índia, sendo nativo do sul da Ásia (DAMMSKI et al., 2011; TEAME et al., 2019; CAMPOS-SÁNCHEZ; ESTEBAN, 2020). O zebrafish apresenta diferentes estágios de vida (Embrionário, larval; juvenil e adulto), com desenvolvimento rápido (TABELA 2) sofrendo modificações estruturais ao longo do tempo (FIGURA 8) (DAMMSKI et al., 2011).

Tabela 2 – Estágio de vida e suas diferenciações da espécie *Danio rerio* a partir da fase larval

Estágio (dias)	Comprimento (mm)	Descrição
Larva jovem (3)	3,5	Nada livremente; posicionamento vertical.
Larva (14)	6	Bexiga natatória cheia; procura de alimento; crescimento.
Juvenil (30)	10	Nadadeiras e padrão de pigmentação dos adultos
Adulto jovem (90)	20	Reprodução
Adulto (1000)	40-50	Final da vida.

Fonte: Adaptado de Dammski et al. (2011)

Figura 8 - Ciclo de vida do *Danio rerio*

Fonte: Adaptado de Nusslein-Volhard e Singh (2017).

O zebrafish, é um animal pequeno, atingindo em média de 2 a 3 cm de comprimento, podendo chegar ao tamanho de até 4 a 5 cm ao longo da vida. O gênero do zebrafish pode ser diferenciado através do formato, tamanho corporal e pigmentação. As fêmeas desta espécie são maiores que os machos, mais arredondadas, com a barriga esbranquiçada, exibem coloração alternada entre prata e azul e na frente da nadadeira anal encontra-se uma pequena papila genital, já os machos apresentam o corpo mais alongado com listras dourada e azul (FIGURA 9) (ENGESZER et al., 2007).

Figura 9 - Diferença física entre a fêmea (A) e o macho (B) da espécie *Danio rerio*.

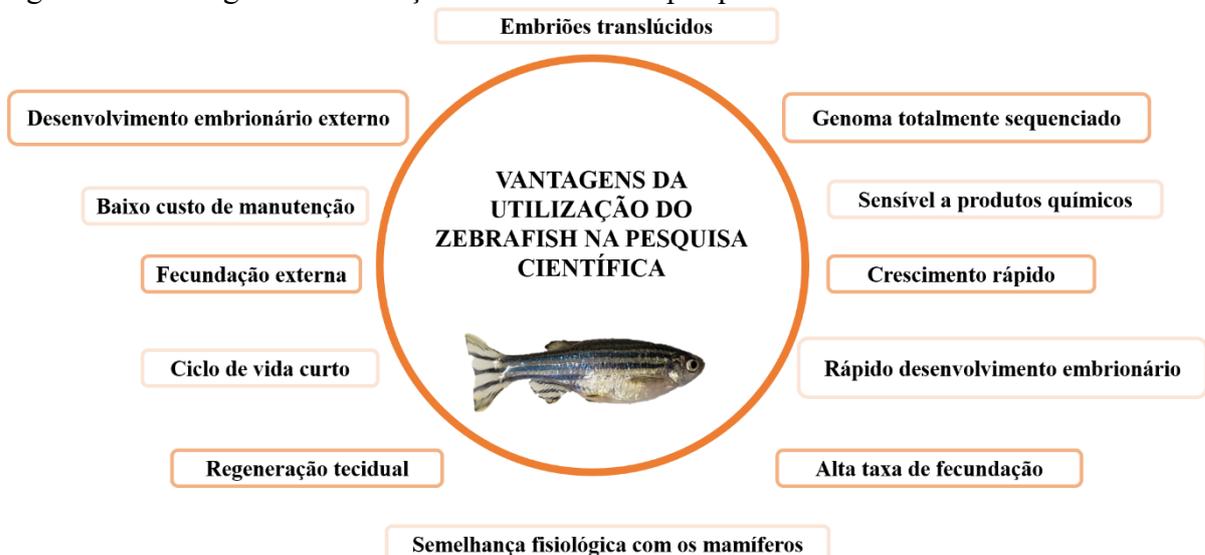


Fonte: Do autor (2022).

2.6 Vantagens da utilização do zebrafish na pesquisa científica

Esta espécie é considerada um organismo modelo vertebrado bastante empregado em pesquisas científicas devido à sua semelhança morfológica e fisiológica com os mamíferos, tendo o genoma totalmente sequenciado, é um animal sensível à produtos químicos, todos os seus estágios de vida são utilizados em diferentes análises e apresenta taxa de crescimento rápido (FIGURA 10) (HENRY et al., 2013; YANG et al., 2018; TEAME et al., 2019; XIONG et al., 2019).

Figura 10 - Vantagens da utilização do zebrafish na pesquisa científica

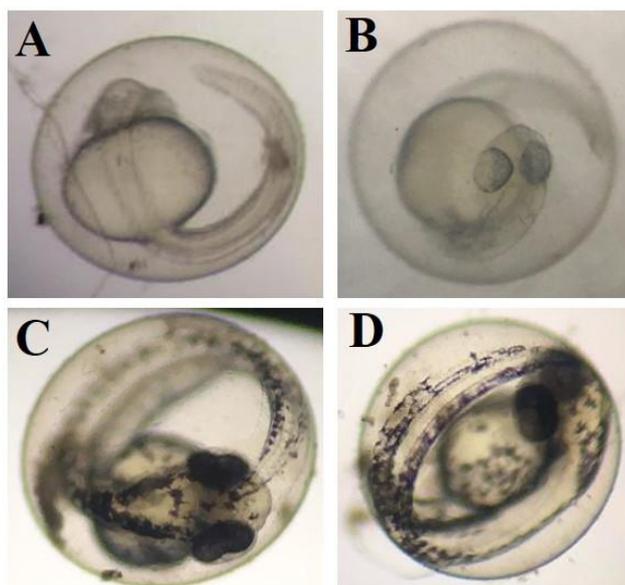


Fonte: Do autor (2022).

O zebrafish, exibe embriões translúcidos (FIGURA 11) originados de fertilização

externa, alta fecundidade, atinge rapidamente a idade adulta (60 a 90 dias), ciclo de vida curto, rápido desenvolvimento embrionário (24hpf), onde seus embriões demonstram sistemas de órgãos completos, como coração, intestino e vasos sanguíneos às 48hpf. Sua manutenção é de baixo custo e o animal apresenta acelerada capacidade de regeneração (tecidos e órgãos) (TEAME et al., 2019; XIONG et al., 2019).

Figura 11 - Embriões de zebrafish (*Danio rerio*) as 24 e 48 horas pós fertilização



Legenda: A e B) embriões em 24 horas pós fertilização (hpf); C e D) 48hpf
Fonte: Do autor (2022).

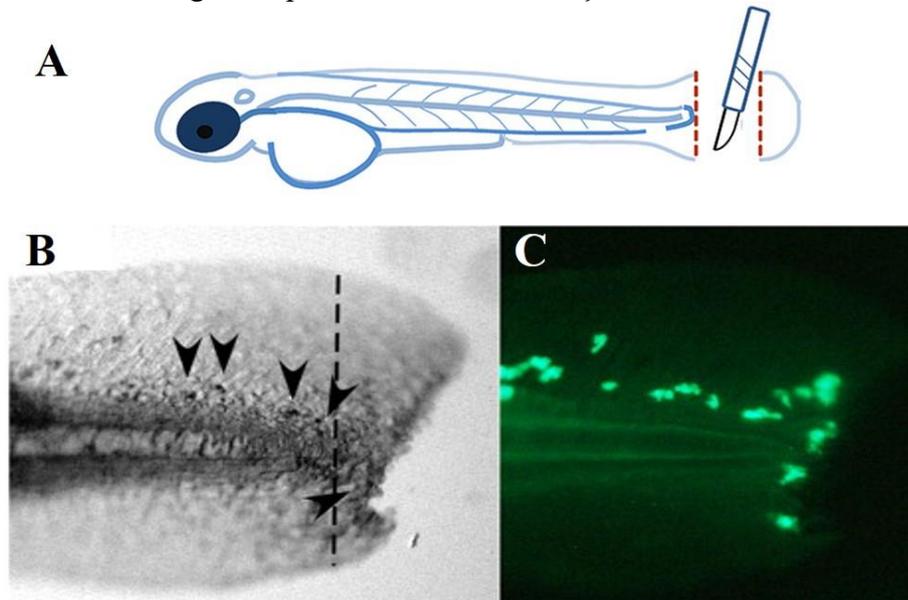
2.6.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória

O zebrafish apresenta parâmetros semelhantes com o sistema imunológico inato dos seres humanos, chegando a 87% à conservação dos genes, possuem células mieloides (células semelhantes a monócitos/macrófagos que apresentam a capacidade de fagocitar de 28 a 30hpf – horas pós fertilização) e linhagens granulocíticas (aparecendo por volta de 32 a 48hpf). Os neutrófilos ou heterófilos presentes no zebrafish exibe características bioquímicas, morfológicas e funcionais semelhante com os presentes em mamíferos (HENRY et al., 2013; YANG et al., 2018; XIONG et al., 2019). Devido aos embriões desta espécie serem transparentes, é possível a imagem dinâmica e não invasiva em testes inflamatórios *in vivo* (YANG et al., 2018).

As primeiras células imunológicas no zebrafish manifestam-se no primeiro dia pós fertilização já os macrófagos e neutrófilos aparecem no sistema imune no segundo dia (48hpf) (CAO et al., 2019; HE et al., 2018; PRATA et al., 2020). A indução da inflamação pode ser feita

usando o modelo de amputação (corte) da nadadeira caudal em larvas à 72hpf, onde a migração dos neutrófilos (FIGURA 12) podem ser marcadas para visualização com auxílio do corante *Sudan Black* e marcadores com fluoróforo utilizando diferentes linhagens transgênicas (GUYADER et al., 2008; POLEDNIK; KOCH; FELZIEN, 2018; RENSHAW et al., 2006; REN et al., 2015; HE et al., 2018).

Figura 12 - Neutrófilos migrando para o local da inflamação



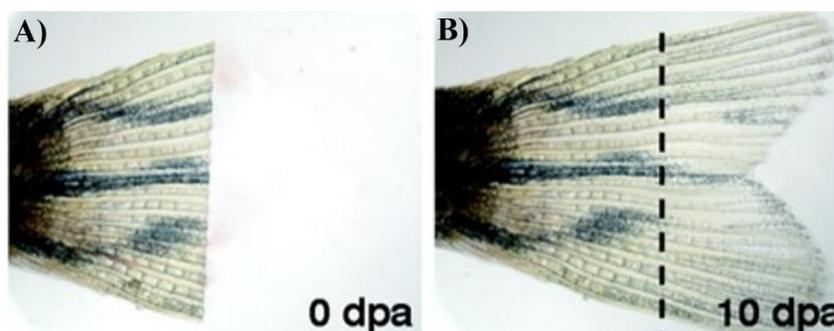
Legenda: A) Amputação da larva (72 hpf) com auxílio de um bisturi; B) Neutrófilos (seta) corados com *Sudan Black*; C) Neutrófilos fluorescentes em larva tg (PU1-Gal4-UAS-GFP).

Fonte: Aaptado de Boecke et al. (2012) e Gu et al. (2020).

2.6.2 Avaliação da regeneração de cauda

A regeneração da nadadeira caudal em peixe adulto é um processo rápido ocorrendo entre 1 à 2 semanas pós amputação, tendo capacidade de se regenerar em termos de tamanho original, arquitetura do tecido e funcionalidade (FIGURA 13), sendo este processo dividido em quatro etapas: a) 0-12hpa (horas pós amputação), fechamento da ferida; b) 12-24hpa, formação de blastema primário; c) 24-28hpa, maturação do blastema e d) mais de 48hpa, crescimento regenerativo (POSS; KEATING; NECHIPORUK, 2003; TEAME et al., 2019; XIONG et al., 2019; ABIDIN et al., 2020).

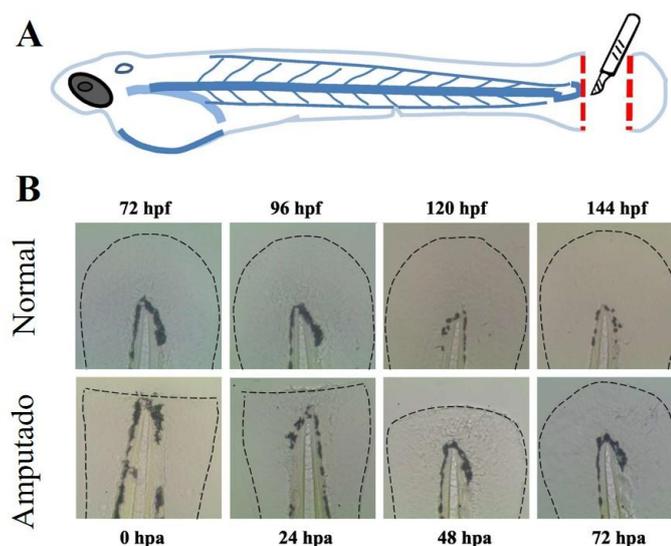
Figura 13 - Regeneração da nadadeira caudal em peixe adulto de *Danio rerio*



Legenda: dpa – Dias pós amputação. Imagem A) 0 dpa e B) nadadeira caudal regenerada no 10º dpa
 Fonte: Adaptado de Poss, Keating e Nechiporuk (2003).

Esta espécie leva apenas 48hpf para atingir o estágio de larva nadadora, como em peixe adulto nas larvas a nadadeira caudal é um tecido acessível e de fácil manusear no ensaio de regeneração. Após a amputação da nadadeira do zebrafish em estágio larval (podendo ser realizado o corte as 48 a 72hpf), ocorre o processo classificado como regeneração epimórfica, e o formato e tamanho da nadadeira são restaurados em três dias (72hpa) (FIGURA 14), sendo um processo mais rápido do que na nadadeira do peixe adulto, outra vantagem de utilizar a larva, é que nesta fase não precisa alimentar o animal até 120hpf, isto pode diminuir o efeito ambiental na regeneração (GU et al., 2020; YOSHINARI; KAWAKAMI, 2011; SUN et al. 2019; MATHEW; ANDREASEN; TANGUAY, 2006; OPPEDAL; GOLDSMITH, 2010).

Figura 14 - Regeneração da nadadeira caudal em larva de *Danio rerio* as 72 horas pós fertilização, sendo avaliado durante três dias pós amputação



Legenda: A) Esquema da amputação da nadadeira caudal da larva de zebrafish; B) Normal: imagens representando nadadeiras caudais sem amputação (normal) em diferentes horas pós fertilização (hpf). Amputado: imagens demonstrando nadadeiras caudais amputadas em diferentes horas pós amputação (hpa).

Fonte: Sun et al. (2019).

No trabalho desenvolvido por Abidin et al. (2020), foi verificada a capacidade regenerativa da nadadeira caudal do peixe adulto sobre a ação do extrato aquoso de *Piper sarmentosum* Roxb (Piperaceae), a regeneração deste membro pode estar relacionada à atividade antioxidante presente na planta que acelerou a cicatrização óssea.

2.6.3 Avaliação da toxicidade e apoptose celular

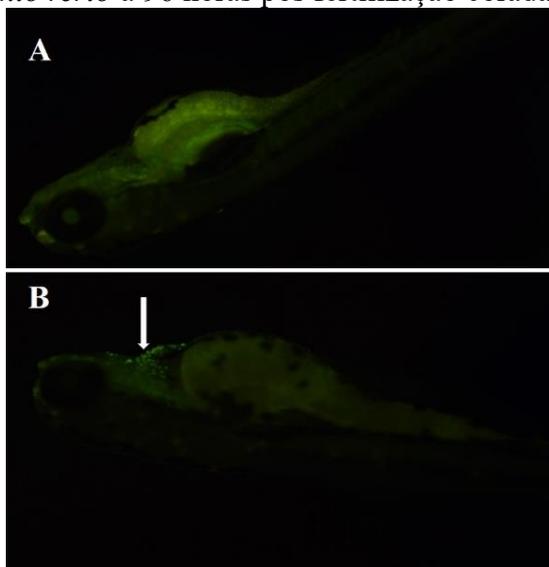
O modelo animal zebrafish também é empregado em análises de segurança, toxicologia e apoptose celular. O teste de toxicidade empregando embriões e larvas foi elaborado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), nº236, sendo criadas as diretrizes para o teste de toxicidade aguda ou *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test* (OECD, 2013), afim de avaliar os efeitos embriotóxicos nas primeiras 96 horas sobre embriões expostos à produtos químicos, mas existem alguns trabalhos científicos onde estão aumentando o horário de observação (120 e 144hpf) da análise de toxicidade aguda para verificar futuras alterações ao longo do tempo (ALAFIATAYO et al., 2019; RAGA et al., 2014; SINGULANI et al., 2018; TIAN et al., 2019). No FET são verificados os seguintes parâmetros a cada 24hpf: a) ovos coagulados; b) formação de somito; c) deslocamento da cauda do saco vitelino e d) falta de batimento cardíacos (OECD, 2013). Podendo ser observado também durante este teste a eclosão, otólito, circulação sanguínea, formação de edemas, mortalidade (embriões e larvas) e pigmentação (ALAFIATAYO et al., 2019). Um benefício da análise de toxicidade empregando embriões/larvas é a utilização de pequena quantidade do material testado (NGUYEN et al., 2020).

Outro ensaio empregando larvas e/ou embriões de zebrafish é a apoptose. Esta atividade é a principal forma de morte celular, ocorrendo naturalmente nas células. Este processo serve para eliminar células desnecessárias, sendo um sistema altamente programado. Neste procedimento, a célula para de crescer e dividir, e por consequência deste fenômeno ocorre sua morte de maneira controlada sem derramamento de conteúdo celular no ambiente circundante. Existem vários mecanismos que ativam a via apoptótica, entre elas: danos ao DNA ou proliferação descontrolada (PFEFFER; SINGH, 2018; D'ARCY, 2019). Este mecanismo acontece de forma natural durante a embriogênese e como resultado de dano ou estresse celular. A apoptose está envolvida em muitas ações de desenvolvimento, como: morfogênese, deleção de estruturas vestigiais, eliminação de células malélicas e regulação do número celular (XIA et al., 2017b).

Para observar células apoptóticas em larvas vivas de zebrafish pode-se utilizar o corante

laranja de acridina (FIGURA 15), um corante metacromático seletivo para ácido nucleico, esta substância não pode corar células normais, mais cora células necróticas ou apoptóticas tardias com permeabilidade de membrana plasmática modificada (ZHAO et al. 2019; XIA et al., 2017a).

Figura 15 - Larvas de *Danio rerio* a 96 horas pós fertilização coradas com laranja de acridina



Legenda: A) Larva controle; B) presença de células apoptóticas na região do coração (seta).
Fonte: Do autor (2022).

A utilização do FET já foi descrita para o óleo essencial de *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Apiaceae) e demonstrou em embriões/larvas avaliadas por 96hpf, forte efeito teratogênico, redução na taxa de sobrevivência, inibição da eclosão, retardo na frequência cardíaca. Este óleo provocou o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e eventos apoptóticos, sendo observado morte celular programada nas regiões do coração e dos olhos (KIM; SHARMA; KANG, 2017).

Foi identificado o efeito tóxico para fruto seco de *Carpesium abrotanoides* L. (Asteraceae) conhecido como carpesii fructus, apresentando à inibição da eclosão dos embriões, aumento na movimentação espontânea, inibição nos batimentos cardíacos, edema no pericárdio e saco vitelino, sendo observado as malformações as 24 a 96hpf nas maiores concentrações do extrato aquoso. Na análise de apoptose empregando o corante laranja de acridina (5 µg/mL) foi observado o aparecimento de células apoptose na região do coração (XIA et al., 2017a). Xia et al. (2017b), também verificou alterações semelhante no teste de toxicidade, teratogenicidade e apoptose para o extrato aquoso *Carthamus tinctorius* L (Asteraceae).

2.6.4 Avaliação das enzimas antioxidantes

Outra vantagem do modelo experimental zebrafish é na identificação do estresse oxidativo e da atividade antioxidante. O estresse oxidativo, é denominado como o desequilíbrio na formação e remoção das EROs, nitrogênio e enxofre entre outras. As EROs ou radicais livres são substâncias cujos elétrons localizam-se desemparelhados e centralizados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio. Há diversas EROs que afetam a estrutura celular, por exemplo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), um radical instável, devido à presença ímpar de elétrons na sua última camada de valência e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) um radical livre que apresenta a capacidade de atravessar membranas celulares por ser de pequeno porte, demonstra ação deletéria, pois participa da reação que origina o radical hidroxila (HO^{\cdot}) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BARBOSA et al., 2014; BOROSKI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2009).

No ambiente aquático, o estresse oxidativo é o primeiro sinal quando há algum contaminante ambiental, havendo assim, a produção de EROs, onde seu excesso pode modificar a integridade na membrana nuclear induzindo danos ao DNA (MUTHULAKSHMI et al., 2018; XIONG et al., 2019). Os peixes apresentam sistemas de enzimas homeostáticos igual aos dos mamíferos. De maneira específica, as EROs são produzidas durante o processo respiratório e podem interagir com substâncias orgânicas. As EROs também podem ser originadas por sistemas enzimáticos intracelulares como NADPH oxidase e xantina oxidase citoplasmática (HAGEDORN et al., 2012).

Para impedir os efeitos negativos provocados pelo estresse oxidativo, ele é neutralizado ou reparado através de enzimas antioxidantes com superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferases (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GSH). O nível do estresse oxidativo e das enzimas antioxidantes são biomarcadores moléculas importantes para o estudo de toxicologia durante a exposição do animal a uma substância tóxica (HUANG et al., 2020; MUTHULAKSHMI et al., 2018; XIONG et al., 2019).

A SOD é uma enzima de defesa primária contra o estresse oxidativo que pode agir convertendo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 . A CAT demonstra a capacidade de catalisar o H_2O_2 em água e oxigênio com alto desempenho (MUTHULAKSHMI et al., 2018; XIONG et al., 2019). A GST é uma enzima metabólica de desintoxicação de fase II, atuando catalisando a ligação de grupos eletrofílicos de xenobióticos com grupos sulfidríla de GSH (para ampliar sua hidrofobicidade; esta enzima também apresenta ação GPx, de inibir a peroxidação lipídica (HUANG et al., 2020).

O modelo zebrafish não é somente empregado para a identificação de estresse oxidativo

derivado de produtos químicos em ambientes aquáticos, também é utilizado para observar a atividade antioxidante de plantas medicinais. Foi observado o aumento significativo nas atividades das enzimas SOD-1 e CAT em larvas tratadas com óleo essencial de *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Apiaceae), estes efeitos mostram que as enzimas antioxidantes podem estar envolvidas na liberação de radicais livres produzidos pelo óleo essencial no zebrafish (KIM; SHARMA; KANG, 2017). No trabalho de Xiong et al. (2019), verificaram a propriedade antioxidante em larvas (72hpf) induzidos por LPS (lipopolissacarídeo) do extrato etanólico de *Salvia plebeia* R.Br. (Labiatae) e a inibição da atividade enzimática (CAT e SOD).

2.7 Zebrafish com modelo animal para estudos com plantas medicinais

Alguns trabalhos já foram realizados utilizando o zebrafish como modelo experimental em investigação, empregando extratos e os óleos essenciais de plantas medicinais, sendo demonstrado na tabela 3, apresentando a eficácia da utilização do zebrafish em pesquisas científicas com espécies vegetais (FIGURA 16).

Tabela 3 – Análises científicas com plantas medicinais utilizado modelo zebrafish

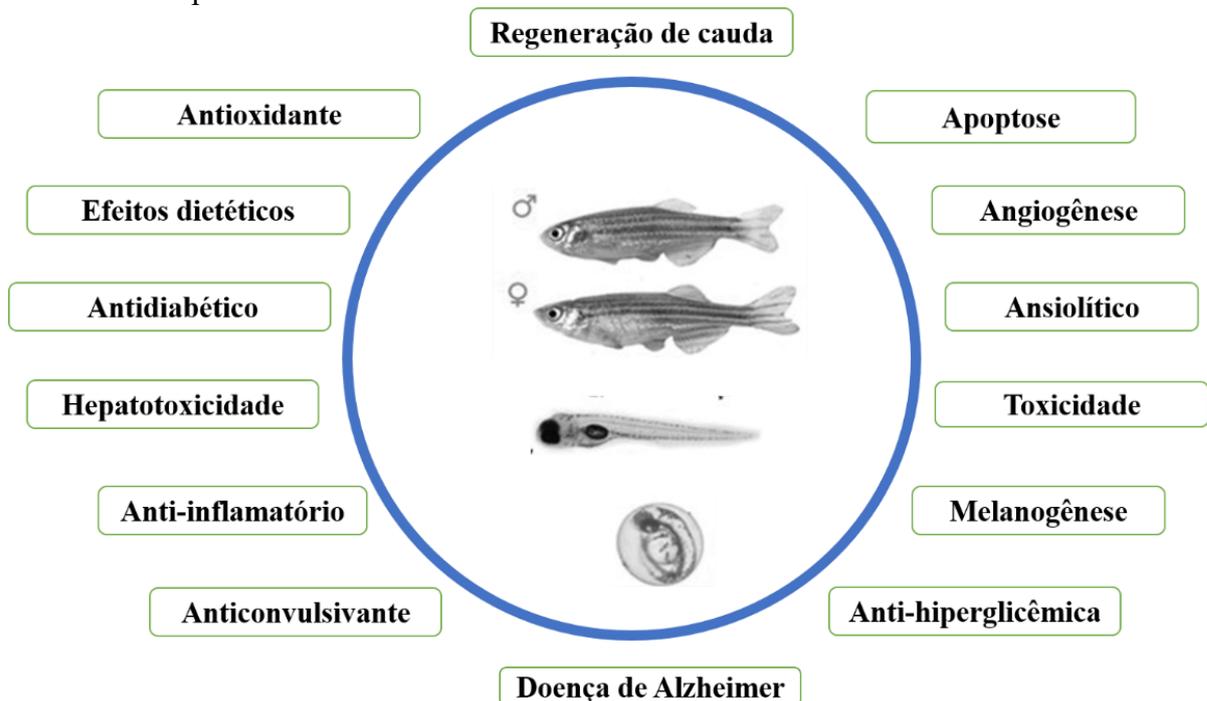
MECANISMO/DOENÇA	PLANTAS MEDICINAIS /AUTORES
Angiogênese	<i>Moricandia sinaica</i> Boiss. (FAROOQ et al., 2020); <i>Dalbergia odorífera</i> T.C. Chen (FAN et al. 2017) e <i>Thuja orientalis</i> L. (BREETA et al., 2018).
Ansiolítico	<i>Aloysia polystachya</i> (Griseb.) Moldenke (MELO et al., 2019) e <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (HACKE et al., 2020).
Doença de Alzheimer	<i>Streblus asper</i> Lour. (SINGSAI et al., 2021).
Melanogênese	<i>Ligusticum sinense</i> Oliv. (CHENG et al., 2018); <i>Eurya emarginata</i> (Thumb) Makino (KIM et al., 2014); <i>Arctium lappa</i> L. (PARK et al., 2013) e <i>Rhanterium suaveolens</i> Desf. (CHELLY et al., 2021).
Anti-hiperglicêmica	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb. (HAYATI et al., 2021).
Anticonvulsivante	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (HACKE et al., 2021) e <i>Magnolia officinalis</i> Rehder & E.H. Wilson (LI et al., 2020).
Hepatotoxicidade	<i>Prunus jamasakura</i> Siebold ex Koidz (KOMAKECH et al., 2020) e <i>Terminalia chebula</i> Retz. (FENG et al., 2021).
Antidiabético	<i>Urtica dioica</i> L., <i>Apium graveolens</i> L. e <i>Zingiber officinale</i> Roscoe (GUTIÉRREZ et al., 2021).
Dietético	<i>Origanum vulgare</i> L. (RASHIDIAN et al., 2021).

“continua”

Antioxidante	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (HACKE et al., 2021); <i>Salvia plebeia</i> R. Br. (XIONG et al., 2019) e <i>Trachyspermum ammi</i> (L.) Sprague (KIM; SHARMA; KANG, 2017).
Toxicidade	<i>Curcuma longa</i> L. (ALAFIATAYO et al., 2019); <i>Carpesium abrotanoides</i> L. (XIA et al., 2017a); <i>Carthamus tinctorius</i> L. (XIA et al., 2017b); <i>Trachyspermum ammi</i> (L.) Sprague (KIM; SHARMA; KANG, 2017); <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. (KHAN et al., 2021) e <i>Mangifera indica</i> L. (GANGULY; CHAKRABORTY; SENGUPTA, 2020).
Regeneração de cauda	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb (ABIDIN et al., 2020).
Apoptose celular	<i>Carpesium abrotanoides</i> L. (XIA et al., 2017a); <i>Carthamus tinctorius</i> L. (XIA et al., 2017b); <i>Trachyspermum ammi</i> (L.) Sprague (KIM; SHARMA; KANG, 2017) e <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq. (KHAN et al., 2021).
Anti-inflamatório	<i>Salvia plebeia</i> R. Br (XIONG et al., 2019); <i>Arnica montana</i> L., <i>Calendula officinalis</i> L., <i>Chamaemelum nobile</i> (L.) All., <i>Harpagophytum procumbens</i> DC. ex Meisn., <i>Matricaria recutita</i> L., <i>Capraria biflora</i> L., <i>Syzygium montanum</i> Aubrév., <i>Schefflera chimbuenensis</i> . (CORDERO-MALDONADO et al., 2013); <i>Naravelia zeylanica</i> (L.) DC. (EKAMBARAM; PERUMAL; PAVADAI, 2017) e <i>Thymus vulgaris</i> L. (POLEDNIK; KOCH; FELZIEN, 2018).

Fonte: Do autor (2022).

FIGURA 16 – Análises científicas realizadas utilizando o modelo zebrafish em pesquisas com plantas medicinais



Fonte: Adaptado de Trigueiro et al. (2020).

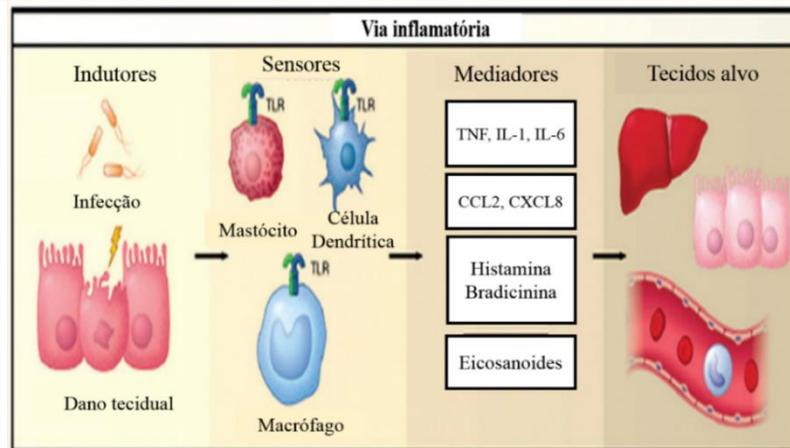
2.8 Processo inflamatório

A inflamação é uma sequência de resultados imunológicos à infecção e lesão, sendo, uma medida de proteção natural do corpo humano na defesa contra antigênicos estranhos, patógenos, toxinas ou lesões teciduais, afim de evitar a disseminação do mesmo para outras regiões do organismo. Durante o processo de inflamação, sinalizações moleculares determinam se as células inflamatórias sofreram migração, proliferação, reparo, diferenciação, ativação ou liberação (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; RIELLA et al., 2012). No processo inflamatório envolve alguns elementos como, células presente no tecido, vasos sanguíneos, proteínas e células imunológicas (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e fagócitos mononucleares) (BHATTACHARYA et al., 2013; CRUVINEL et al., 2010).

Existem dois tipos de inflamações a crônica e aguda, o primeiro tipo é um fenômeno persistente indesejável, que pode ocasionar o surgimento de doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide, câncer, asma e doenças autoimunes. A inflamação crônica é um processo longo que envolve linfócitos, macrófagos e plasmócitos. Entretanto, a inflamação aguda é um processo benéfico, estando relacionado a resposta contra patógenos infecciosos, apresentando como sintomas de defesa, vermelhidão, inchaço, dor e calor na região afetada (BARNES, 2006; CHIU et al., 2012; QAMAR et al., 2021).

A inflamação aguda se caracteriza por ser um processo rápido, acontecendo em horas ou dias com dominância do envolvimento dos neutrófilos. Esta inflamação ocorre seguindo quatro processos principais (FIGURA 17): (a) invasão de estímulos infecciosos provocados pelos indutores exógenos (Exemplo; patógenos, bactérias, vírus e compostos tóxicos) ou endógenos (cristais de urato monossódico e pirofosfato de cálcio di-hidratado); (b) identificação dos agentes contaminantes pelos sensores (receptores específicos, como exemplo o Toll-like). (c) ativação de mediadores inflamatórios (histamina, serotonina e os eicosanoides) e (d) modulação por meio dos mediadores dos tecidos-alvos (LON; LIU; JUSKO, 2012; SANTANA; SANTANA, 2001).

Figura 17 - Os quatro principais componentes da via inflamatória



Fonte: Adaptado de Lon, Liu e Jusko (2012).

O processo inflamatório é uma resposta altamente coordenada, como mencionado anteriormente na inflamação aguda. Este mecanismo envolve a liberação de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e células imunológicas, sendo estas etapas divididas em três fases, resumidamente: recrutamento, pico inflamatório e resolução. Durante o recrutamento, os macrófagos e neutrófilos migram em direção ao local da inflamação, após terem sido ativados por estímulos inflamatórios, respondendo a vários quimiocinas, por exemplo, a interleucina-8 (IL-8). Depois do recrutamento das células imunológicas para o local inflamado, os neutrófilos matam os patógenos invasores através do processo da fagocitose, liberando armadilhas extracelulares e gerando ERO (YANG et al., 2018).

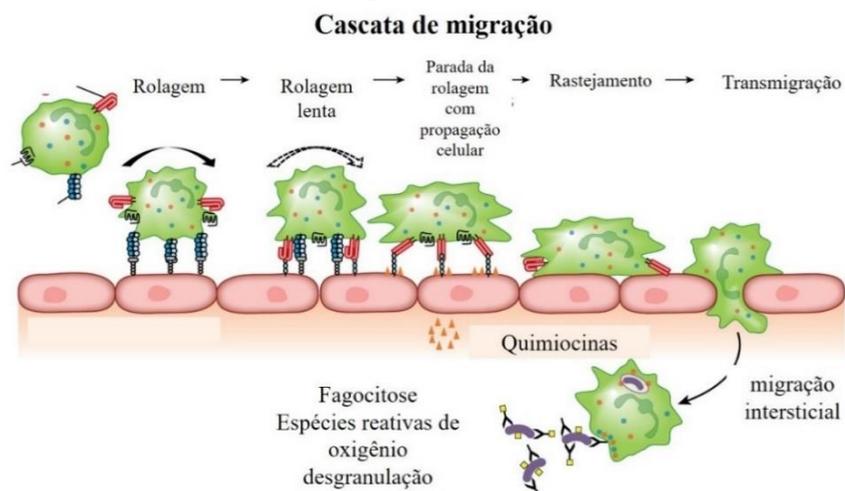
Assim sendo, o recrutamento dos macrófagos e neutrófilos para o local afetado é considerado o pico da inflamação aguda (WITKO-SARSAT et al., 2000). A migração dos neutrófilos é essencial para respostas fisiológicas a lesões e infecções do local afetado, no entanto sua ação descontrolada e excessiva conduz para a inflamação crônica (persistente) (YANG et al., 2018).

Durante a etapa de resolução, exige a eliminação dos neutrófilos, através da morte celular programada (apoptose) mediando a eliminação segura destas células, por meio do engolfamento de macrófagos e/ou mediante à migração de neutrófilo reserva ou remoção em exsudatos inflamatórios para fora do tecido inflamado; a apoptose também produz mensagens que tem a capacidade de anular o recrutamento de neutrófilos. Deste modo, acompanhar o número e a atividade de migração de macrófagos e neutrófilos é uma maneira eficiente para avaliar as respostas inflamatórias agudas. O processo de desativar os neutrófilos envolve a inativação de mediadores e mudança no padrão da produção de quimiocinas (AMULIC et al., 2012; HENRY et al., 2013; YANG et al., 2018; WITKO-SARSAT et al., 2000).

2.8.1 Papel dos neutrófilos na inflamação

Os neutrófilos são células imunológicas abundantes no sangue periférico e apresentam núcleos polimórficos. Atuam como vigilantes do sistema imunológico inato, e estão sempre prontos para serem recrutados para o local da infecção, uma das funções dos neutrófilos é fagocitar patógenos e destruição intracelular (FARRERA; FADEEL, 2013; HENRY et al., 2013). A cascata de recrutamento é mediada pela interação entre receptores encontrados nos neutrófilos com ligantes presentes na superfície inflamada, este processo segue os seguintes passos: (a) fixação dos neutrófilos ao endotélio ativado; (b) rolagem do neutrófilo; (c) interrupção na rolagem com o acompanhamento de propagação celular (d) rastejamento das células ao longo do endotélio e (e) transmigração dos neutrófilos para o tecido celular. Onde irá ocorrer em seguida, à ativação completa dos neutrófilos iniciando o processo da fagocitose do patógeno através EROs, degranulação e geração de armadilhas extracelulares (FIGURA 18) (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Figura 18 - Cascata de adesão em várias etapas de recrutamento de neutrófilos



Fonte: Adaptado de Mayadas, Cullere e Lowell (2014).

Após a neutralização do patógeno os neutrófilos devem ser removidos para que ocorra a finalização da inflamação, em caso de persistência dos neutrófilos como na inflamação crônica eles podem causar danos irreversíveis aos tecidos pela liberação de grânulos tóxicos (YANG et al., 2018). As células neutrofilicas, podem ser identificadas na circulação sanguínea de 6 a 12 horas antes de irem para o tecido e neste local podem sobreviver 1-2 dias, estando entre as células com vida mais curta do corpo humano. Sua meia-vida pode ser estendida devido a ação de microorganismo e da própria inflamação, podendo prolongar este ciclo por 2 a 6 dias

devido ao retardo da apoptose (AMALUC et al., 2012; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014; SILVA, 2015; SILVA; COSTA, 2020; ROSALES, 2018).

Os fármacos com atividade anti-inflamatória como os pertencentes a classe dos não-esteroidais e os glicocorticoides baseiam sua posologia na inibição da produção ou ação dos mediadores ou inibe o recrutamento e ativação dos neutrófilos (FREITAS et al., 2019).

2.9 Anti-inflamatório

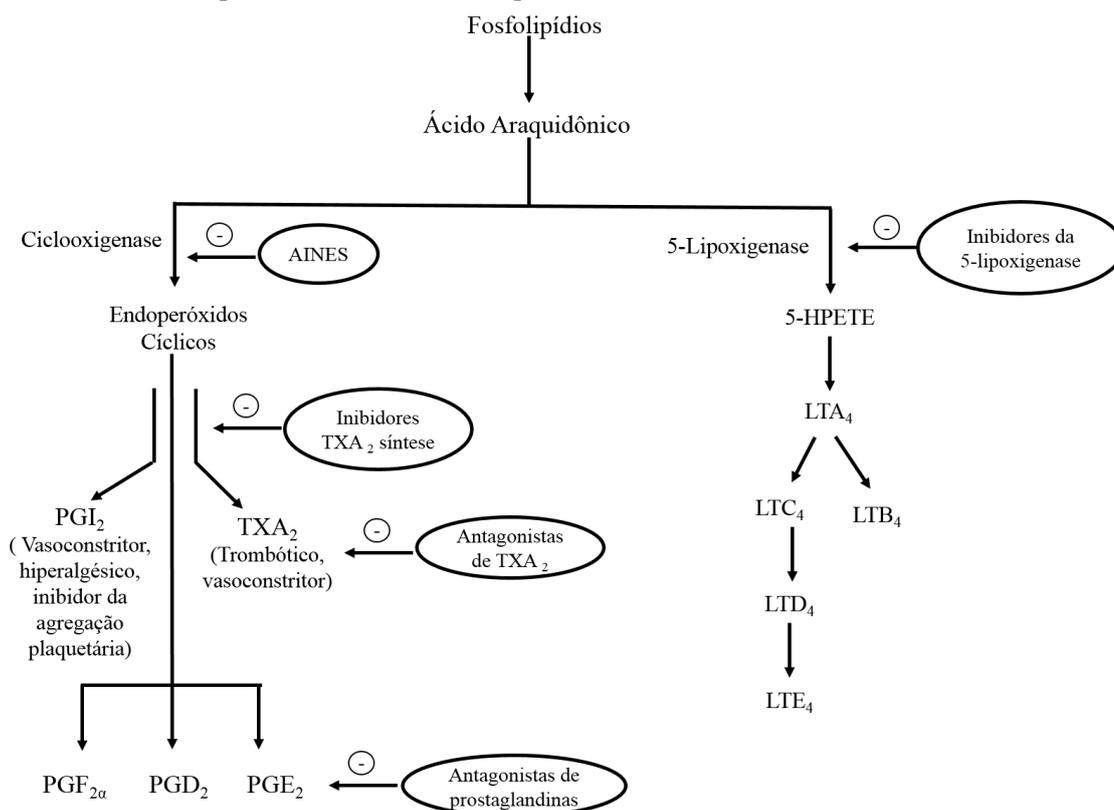
Os anti-inflamatórios são fármacos que impedem ou diminuem os sintomas da inflamação, sendo divididos em dois grupos, os anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais (AINEs). Os AINEs são constituídos por uma variedade de fármacos (TABELA 4), tendo como ação à inibição das sínteses de prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TX), por meio da interrupção das enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2), o que provoca a inibição da conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, regulando assim, a vasodilatação e a dor (SANTANA; SANTANA, 2001; SILVA; MENDONÇA; PARTATA, 2014). Estes fármacos também podem atuar na síntese de leucotrienos (LT) por meio da inativação da enzima 5-lipoxigenase (FIGURA 16) (MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009).

Tabela 4 - Classificação dos anti-inflamatórios não esteroidais

GRUPO QUÍMICO	DROGA
SALICILATOS	Ácido acetilsalicílico (aspirina) e diflumisal.
SALICILATOS NÃO ACETILADOS	Salicilato de sódio, trissalicilato de colina e magnésio, salsalato e ácido salicilsalicílico.
DERIVADOS DA PIRAZOLONA	Fenilbutazona, oxifenilbutazona, dipirona, bumadizona e feprazona.
ÁCIDOS INDOLACÉTICOS	Indometacina, sulindaco e etodolaco.
ACIDOS HETEROARILACÉTICOS	Tolmetina e diclofenaco.
ACIDOS ARILPROPIÔNICOS	Naproxeno, ibuprofeno, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno e oxaprozina.
ÁCIDOS ANTRANÍLICOS	Ácido mefenâmico e ácido meclofenâmico.
ÁCIDOS ENÓLICOS	Piroxicam, tenoxicam e meloxicam.
ALCANONAS	Nabumetona.
OUTROS	Azapropazona (Apazona) e nimesulida

Fonte: Santana e Santana (2001).

Figura 19 - Cascata simplificada da do ácido araquidônico



Fonte: Adaptado de Muri, Sposito e Metsavaht (2009).

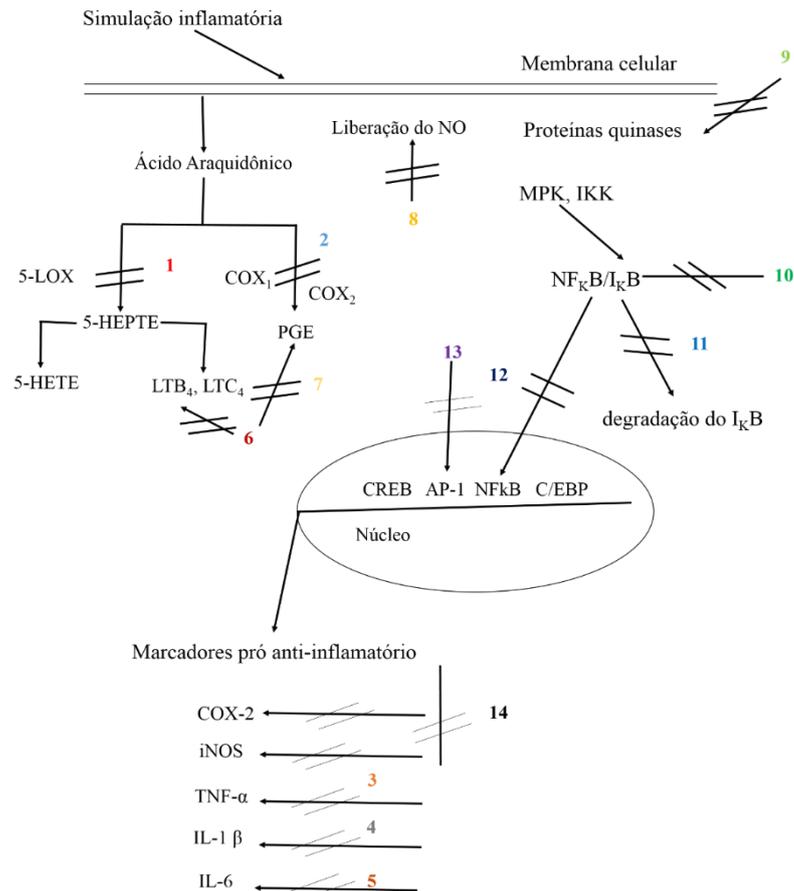
Os AINEs além de demonstrarem atividade anti-inflamatória, também atuam como: antipiréticos e analgésico (dependendo do fármaco) (SILVA; MENDONÇA; PARTATA, 2014). Mesmo diante destas ações curativas, eles exibem efeitos colaterais adversos como, gastrointestinais, inibição da agregação plaquetária, cardiovasculares e toxicidade hepática e renal (CHIU et al., 2012; LON; LIU; JUSKO, 2012). Diante destes efeitos colaterais, existem várias pesquisas *in vivo* utilizando plantas medicinais como anti-inflamatórios, sendo verificado à atividade anti-inflamatória do óleo essencial em testes de edema da pata de rato induzida por carragenina nas espécies *Psidium guineense* Sw. (Myrtaceae), *Nigella sativa* (Ranunculaceae) e *Bougainvillea glabra* (Nyctinaginacea); (DWITA; YATI; GANTINI, 2019; NASCIMENTO et al., 2018; OGUNWANDE et al., 2019). Realizando o mesmo teste mais induzido o edema com substâncias diferentes (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), lipopolissacarídeo e formalina foi verificada a atividade para *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Lamiaceae), *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae), *Duguetia furfuracea* (Annonaceae), *Gynura procumbens* (Asteraceae) e *Baccharis punctulata* (Annonaceae) (ASCARI et al., 2019; HUANG et al., 2019; LUO et al., 2019; SALDANHA et al., 2019).

O efeito anti-inflamatório dos óleos essenciais pode estar atribuído a sua interação como cascata de sinalização envolvendo as citocinas e atuando em fatores de regulação da transcrição

e da expressão gênica pró-inflamatória. Os óleos essenciais e/ou seus componentes majoritários isolados podem também atuar na inibição da lipoxigenase, COX-2, prostaglandinas (PGE₂) e na síntese de leucotrienos (MIGUEL, 2010).

Por exemplo, (FIGURA 20), os óleos essenciais de *Aloe barbadensis* Miller (Asphodelaceae), *Illicium verum* Hook f. (Illiciaceae), *Citrus aurantium* subsp. bergamia (Risso) Wight & Arn. (Rutáceas), *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae), *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae), *Juniperus communis* L. (Cupressaceae), *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt (Lamiaceae), *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) e *Cananga odorata* (Lam.) Hook. F. et Thomson (Annonaceae) mostraram fortes efeitos inibidores da lipoxigenase. O óleo de *Torreya nucifera* Siebold et Zucc, (Taxaceae), sendo principalmente constituído por limoneno, δ -3-careno e α -pineno apresentou a capacidade de inibir a COX-2 e PGE₂ (MIGUEL, 2010).

Figura 20 - Óleos essenciais e seus principais constituintes na modulação da resposta anti-inflamatória



Legenda: Elementos presente em cada número: (1) *Aloe barbadensis* Miller; *Illicium verum*; *Citrus bergamia*; *Cinnamomum zeylanicum*; *Eucalyptus globulus*; *Juniperus communis*; *Lavandula officinalis*; *Thymus vulgaris*; *Cananga odorata*; *Alpinia murdochii*; *Alpinia scabra*; *Alpinia pahagensis*; *Helichrysum* spp.; limoneno; acetato de linalilo; trans-β-cariofileno; 1,8-cineol; p-cimeno; timol; eugenol; camazuleno; α-bisabolol; β-pineno; sabineno; γ-selineno; α-selineno; α-panasineno. (2) *Torreya nucifera*; limoneno; δ-careno; α-pineno. (3) *Melaleuca alternifolia*; *Cinnamomum osmophloeum*; *Cordia verbenácea*; *Cryptomeria japônica*; *Syzygium aromaticum*; terpineno-4-ol; cinamaldeído α-humuleno; kaureno; elemol; γ-eudesmol; sabineno; *Artemisia fukudo*; α-tujona; β-tujona; cânfora; cariofileno; eugenol; *Taxandria fragrans*; 1,8-cineol; α-pineno; linalol; *Pterodon amarginatus*; β-elemeno; germacreno-D; miristicina. (4) *Cleistocalyx operculatus*; *Melaleuca alternifolia*; *Cinnamomum osmophloeum*; *Cordia verbenácea*; *Artemisia fukudo*; *Cryptomeria japônica*; *Cymbopogon citrurus*; *Pterodon amarginatus*; *Syzygium aromaticum*; terpineno-4-ol; santolino; espatulenol; óxido de cariofileno; cinamaldeído; α-humuleno; kaureno; elemol; γ-eudesmol; sabineno; α-tujona; β-tujona; cânfora; cariofileno; citral; β-elemeno; germacreno-D; eugenol; p-cimeno+timol; carvacrol. (5) *Cinnamomum osmophloeum*; *Cryptomeria japonica*; *Artemisia fukudo*; *Cymbopogon citrurus*; *Rosmarinus officinalis*; *Taxandria fragrans*; santolino; espatulenol; óxido de cariofileno; kaureno; elemol; γ-eudesmol; sabineno; α-tujona; β-tujona; cânfora; cariofileno; citral; 1,8-cineol; α-pineno; p-cimeno; linalol; p-cimeno+timol; carvacrol. (6) 1,8-cineol. (7) terpineno-4-ol; eugenol; (-) – linalol. (8) *Teucrium montbreti*; *Teucrium brevifolia*; *Fortunella japonica*; *Citrus sinki*; espatulenol; δ-cadineno; carvacrol; óxido de cariofileno; limoneno. (9) *Artemisia fukudo*; cinamaldeído; anetol. (10) *Cordia verbenácea*; *Pimpinella corymbosa*; *Pimpinella tragiun*; *Pimpinella rhodanta*. (11) *Artemisia fukudo*; citral; anetol; eugenol; isoeugenol. (12) *Artemisia fukudo*; *Cleistocalyx operculatus*; *Juniperus oxycedrus*. (13) anetol. (14) *Cryptomeria japônica*; *Abies koreana*; *Farfugium japonicum*; *Illicium anisatum*; linalol; acetato de bornil; limoneno; α-pineno; 1-undeceno; 1-noneno; β-cariofileno; 1,8-cineol.

Fonte: Adaptado de Miguel (2010).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Siparuna guianensis* possui uma ampla utilização etnofarmacológica, como anti-inflamatórios, carminativas, estimulantes, antidiarréicas, antitúberculose, estimulante e diurética. Seus possíveis efeitos terapêuticos podem estar relacionados aos compostos químicos presente na folha desta espécie. No entanto, investigações *in vivo* sobre suas aplicações medicinais e dados toxicológicos são escassos. Portanto, este estudo fornece base científica para trabalhos de toxicidade, compostos químicos e possível efeito terapêutico dos extratos e óleo essencial de *S. guianensis* em zebrafish.

REFERÊNCIAS

- ABIDIN, I. Z. Z. et al. The effects of *Piper sarmentosum* aqueous extracts on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and caudal fin tissue regeneration. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14165, 2020.
- AGUIAR, R. W. S. et al. Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negrámina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.
- ALAFIATAYO, A. A. et al. Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of curcuma longa extract on zebrafish (*Danio rerio*). **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2019, n.3807207, p. 1-10, 2019.
- ALVES, C. A. B. et al. Comercialização de plantas medicinais: um estudo etnobotânico na feira livre do município de Guarabira, Paraíba, nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, p. 390-407, 2016.
- ALMEIDA, M. A. de et al. Avaliação do perfil fitoquímico e do potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.17, n.2, 252-270, abr./jun. 2021.
- AMARAL, L.A. et al. Use of topsoil for restoration of a degraded pasture area. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 11, p. 1080-1090, 2017.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459-489, 2012.
- ANDRADE, M. A. et al. Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 444, p.1-8, 2016.
- ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.1, p.189-194, Jan./Mar. 2015.

ANDRADE, M. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *cinnamodendron dinisii schwacke* and *siparuna guianensis* aublet. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 384-397, Nov. 2013.

ANTONIO, T. M. Systematics of *Siparuna* (Monimiaceae) in Panama. **American Journal of Botany**, Oklahoma, v. 72, n. 6, p. 939-939, 1985.

ASCARI, J. et al. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of the essential oils from male and female specimens of *Baccharis punctulata* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 234, p. 1-7, 2019.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 385-406, Sept. 2012.

BARBOSA, M. R. et al. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n.3, p. 453-460, Mar. 2014.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 245-254, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, Fev. 2006.

BERSAN, S. M. F. et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, 2014.

BESSA, N. G. F. D. et al. Antimicrobial activity and medicinal biomass of *Siparuna guianensis* in Brazilian Cerrado forest, a global hotspot **Journal Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 37, p. 968, 2015.

BOBEK, V. B. et al. Comparative analytical micrographs of “vassouras” (*Baccharis*, Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 665-672, 2016.

BRAGA, A. J. T.; BORGES, E. E. de L. e; MARTINS, S. V. Influência dos fatores edáficos na variação florística de floresta estacional semidecidual, em Viçosa, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 623-633, 2015.

BRAZ FILHO, R. et al. Oxoaporphine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna guianensis*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 7, p. 1187-1188, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(76\)85135-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(76)85135-7). Acesso em: 02 mar. 2022.

BRIZZOLLA, J. C. et al. Promoção da saúde e o uso de plantas medicinais no contexto escolar: um relato de caso. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 14, n. 26, p. 281-292, 2018. Disponível em: http://www2.reitoria.uri.br/~vivencias/Numero_026/artigos/pdf/Artigo_23.pdf. Acesso em: 12 mar. 2022.

BREETA, R. E. et al. Non-toxic and non teratogenic extract of *Thuja orientalis* L. inhibited

angiogenesis in zebra fish and suppressed the growth of human lung cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 699-706, Oct. 2018.

BHATTACHARYA, K. et al. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on pulmonary inflammation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 15, p. 2087-2097, 2013.

BOECKE, A. et al. Factor associated with neutral sphingomyelinase activity mediates navigational capacity of leukocytes responding to wounds and infection: live imaging studies in zebrafish Larvae. **Journal of Immunology**, v. 189, p. 1559-1566, 2012.

BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed. Curitiba: Appris, 2015. 141 p.

CARVALHO, V. F. et al. *In vitro* anthelmintic activity of *Siparuna guianensis* extract and essential oil against *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of helminthology**, v. 94, p. e50, Apr. 2020.

CAMPOS-SÁNCHEZ, J. C.; ESTEBAN, M. A. Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model. **Journal of Fish Diseases**, v. 44, n. 2, p. 123-139, 2020.

CAO, Z. et al. Exposure to diclofop-methyl induces immunotoxicity and behavioral abnormalities in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 214, p. 105253, 2019.

CASTELLANI, D. C. et al. Produção de óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 62- 65, 2006. Disponível em: https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiradePlantasMediciniais/artigo12_v8_n4_p062-065.pdf. Acesso em: 12 mar. 2022.

CHANDA, S. Importance of pharmacognostic study of medicinal plants: an overview. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** v. 2, n. 5, p. 69-73, 2014.

CHELLY, S. et al. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and antityrosinase potential of extracts from different aerial parts of *Rhanterium suaveolens* from Tunisia. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 8, p. e2100316, 2021.

CHENG, M.-C. 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**, v. 19, n. 12, p. 3994, 2018.

CHIU, Y.-J. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both *in vitro* and *in vivo*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 11, 2012.

CONEGUNDES, J. L. M. **Caracterização química, estudo farmacológico e toxicológico de *Siparuna guianensis***. 2017. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/7887>. Acesso em: 12 mar. 2022.

CONEGUNDES, J. L. M. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Siparuna guianensis* Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113344, Jan. 2021.

CORDERO-MALDONADO, M. L. et al. Optimization and pharmacological validation of a leukocyte migration assay in zebrafish larvae for the rapid *in vivo* bioactivity analysis of anti-inflammatory secondary metabolites. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75404, 2013.

COUTINHO, P. R. de O. dos S. et al. Restauração passiva em pastagens abandonadas a partir de núcleos de vegetação na Mata Atlântica, Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n.3, p. 1307-1323, jul./set. 2019.

CRUVINEL, W. M. et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

D'ARCY, M. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582-592, 2019.

DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish**: manual de criação em biotério. 1ed. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2011. 106 p. Disponível em: <https://gia.org.br/portal/wp-content/uploads/2013/06/ZEBRAFISH.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2022.

DINIZ, J. A. et al. Chemical composition of essential oils of different *Siparuna guianensis* chemotypes and their acaricidal activity against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): influence of α -bisabolol. **International Journal of Acarology**, v.48, n.1, p.36-42, 2022.

DWITA, L. P.; YATI, K.; GANTINI, S. N. The anti-inflammatory activity of *Nigella sativa* balm sticks. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 1, Jan. 2019.

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**, v.25, n. 1, p. 147-158, 2017.

ENGESZER, R. E. e al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, 4, n. 1, p. 21-40, 2007.

FACUNDO, V. A. et al. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1134-1139, Sept./Oct. 2012.

FAN, Z.-M. et al. *Dalbergia odorifera* extract promotes angiogenesis through upregulation of VEGFRs and PI3K/MAPK signaling pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 204, p. 132-141, 2017.

FAROOQ, M. et al. The phytochemical screening and antiangiogenic activity of audthan al himar (*Moricandia sinaica* Boiss.) extracts in zebrafish embryos and human umbilical vein endothelial cells. **Journal of King Saud University**, v. 32, n. 4, p. 2370-2376, June 2020.

FARRERA, C.; FADEEL, B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a

silente process. **Journal of Immunology**, v. 191, n. 5, p. 2647-2656, 2013.

FENG, X.-H. et al. *In vivo* hepatoprotective activity and the underlying mechanism of chebulinic acid from *Terminalia chebula* fruit. **Phytomedicine**, 83, p.1-10, 2021.

FERREIRA, R. M. dos A. et al. Nano-emulsification enhances the larvicidal potential of the essential oil of *Siparuna guianensis* (Laurales: Siparunaceae) against *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v.57, n.3. 788-796, May 2020.

FERREIRA, T. P. et al. Potential use of negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) essential oil to control wax moths and its selectivity in relation to honey bees. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 151-157, Dec. 2017.

FISCHER, D. C. H. et al. Essential oils from fruits and leaves of *Siparuna guianensis* (aubl.) tulasne from southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 1, p. 101-102, 2005.

FREITAS, P. R. et al. Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias: uma revisão. **Revista Interfaces**, v. 7, n. 2, p.318-324, 2019.

GANGULY, N.; CHAKRABORTY, T.; SENGUPTA, A. Evaluation of toxicity and teratogenicity of anti-psychotic drugs followed by determination of anti-psychotic property of *Mangifera indica* bark through behavioral assay on *Danio rerio* model. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v.11, n. 3, p. 4908-4918, 2020.

GU, L. et al. Inhibitory effects of polystyrene microplastics on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. **Environmental Pollution**, v. 266, n. 3, p. 114664, 2020.

GUYADER, D. L. et al. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. **Blood**, v. 111, n. 1, p.132–141, 2008.

GUTIÉRREZ, R. M. P. evaluation of the antidiabetic potential of extracts of *Urtica dioica*, *Apium graveolens*, and *Zingiber officinale* in mice, zebrafish, and pancreatic β -cell. **Plants**, v. 10, n. 7, p. 1438, 2021.

HACKE, A. C. M. et al. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, citral and geraniol exhibit anticonvulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 275, p. 1-8, July 2021.

HACKE, A. C. M. et al. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, p. 113036, Oct. 2020.

HAGEDORN, M. et al. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39397, 2012.

HALL, C. F.; MEIRELLES, J. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Siparunaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 3spe, p. 1151-1153, 2017.

HAYATI, F. et al. Antihyperglycemic activity of *Centella asiatica* (L.) Urb. leaf ethanol extract snedds in zebrafish (*Danio rerio*). **Open Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 184-188, 2021.

HE, M. et al. The difference between white and red ginseng: variations in ginsenosides and immunomodulation. **Planta Medica**, v. 84, n. 12/13, p. 845-854, 2018.

HE, M. et al. Ginsenoside rg1 acts as a selective glucocorticoid receptor agonist with anti-inflammatory action without affecting tissue regeneration in zebrafish larvae. **Cells**, v. 9, n. 5, p.1107, 2020.

HENRY, K. M. et al. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 4, p. 633-642, Oct. 2013.

HUANG, X. et al. Evaluation of the oxidative stress status in zebrafish (*Danio rerio*) liver induced by three typical organic UV filters (BP-4, PABA and PBSA). **International Journal of Environmental Research Public Health**, v. 17, n. 2, p. 651, 2020.

HUANG, X. L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of active ingredients in the essential oils from *Gynura procumbens*, a traditional medicine and a new and popular food material. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 239, 2019.

KHAN, M. F. et al. The reproductive toxicity associated with *Dodonaea viscosa*, a folk medicinal plant in Saudi Arabia. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1-9, 2021.

KIM, J. H. et al. Modulation of melanin synthesis by renygolone isolated from the root of *Eurya emarginata* in melan-a cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 6, p. 940-945, 2014.

KIM, S. H.; SHARMA, C.; KANG, S. C. Ajowan oil potentiates ros-mediated teratogenic effect in zebrafish embryos. **Journal of essential oil bearing plants**, v. 20, n.4, p.883–896, 2017.

KOMAKECH, R. *In vitro* antiosteoporosis activity and hepatotoxicity evaluation in zebrafish larvae of bark extracts of *Prunus jamasakura* medicinal plant. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. 1-9, 2020.

LECANTE, A. et al. Inhibitive effect of *Siparuna guianensis* extracts on the corrosion of low carbon steel in acidic media. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, n. 11, p. 5249-5264, 2011. Diponivel em: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol6/6115249.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2022.

LEITÃO, G. G. et al. Separation of free and glycosylated flavonoids from *Siparuna guianensis* by gradient and isocratic CCC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 28, n. 12-13, p. 2041-2051, 2005. <https://doi.org/10.1081/JLC-200063669>

LI, J. et al. Zebrafish-based screening of antiseizure plants used in traditional chinese medicine: *Magnolia officinalis* extract and its constituents magnolol and honokiol exhibit potent anticonvulsant activity in a therapy-resistant epilepsy model. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 730–742, 2020.

LON, H.-K.; LIU, D.; JUSKO, W. J. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in inflammation. **Critical reviews in biomedical engineering**, v. 40, n. 4, p. 295-312, 2012.

LOURENÇO, A.M. et al. Essential oil of *Siparuna guianensis* as an alternative tool for improved lepidopteran control and resistance management practices. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p.7215, 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

LUO, W. et al. Phytochemical composition and bioactivities of essential oils from six Lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 357-364, 2019.

MACHADO, S. M. F. et al. Seasonal variation of (E)-nerolidol in *Siparuna guianensis* Aublet and ¹³C-NMR spectral assignments of (E)- and (Z)-nerolidol. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 6, p. 708-710, 1998.

MAGALHÃES, V. B. et al. Secondary seed dispersal by ants in neotropical cerrado savanna: species-specific effects on seeds and seedlings of *Siparuna guianensis* (Siparunaceae). **Ecological Entomology**, v. 43, n. 5, p. 665-674, 2018.

MARTINS, R. M. G. et al. Impact on cholinesterase-inhibition and in silico investigations of sesquiterpenoids from Amazonian *Siparuna guianensis* Aubl. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 252, p. 119511, 2021.

MATHEW, L. K.; ANDREASEN, E. A.; TANGUAY, R. L. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits regenerative growth. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 257-265, Jan. 2006.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MELO, D. C. D. et al. Anticariogenic and antimycobacterial activities of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). **Orbital**, v. 9, n. 1, p. 55-60, 2017.

MELO, N. C. de. Anxiolytic and antidepressant effects of the hydroethanolic extract from the leaves of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke: a study on zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 3, p. 1-21, 2019.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, 2010.

MOURA, W. de S. et al. Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, London, v.146, p. 112142, Apr. 2020.

MOURA, W. S. et al. Cassava starch-based essential oil microparticles preparations: Functionalities in mosquito control and selectivity against non-target organisms. **Industrial Crops and Products**, London, n.162, p.113289, Apr. 2021

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. D. M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiátrica**, v. 16, n. 4, p. 186-190, 2009.

MUTHULAKSHMI, S. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. **Chemosphere**, v. 198, p.111-121, May 2018.

NASCIMENTO, K. F. D. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 351-358, 2018.

NEGRI, G.; SANTI, D. de; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p.1024-1034, Oct. 2012.

NGUYEN, T. H. et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of the ethanol extract of *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish. **Antioxidants**, v. 9, n. 3, p. 192, 2020.

NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; SINGH, A. P. How fish color their skin: a paradigm for development and evolution of adult patterns. **BioEssays**, v. 39, n. 3, p. 1-11, 2017.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2013 <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>

OGUNWANDE, I. A. et al. Chemical composition, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of *Bougainvillea glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, p. 188-192, 2019.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, M. S. de et al. Chemical composition, antimicrobial properties of *Siparuna guianensis* essential oil and a molecular docking and dynamics molecular study of its major chemical constituent. **Molecules**, v.25, n. 17, p. 3852, 2020.

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

PARK, H. et al. Inhibitory effect of arctigenin from fructus arctii extract on melanin synthesis via repression of tyrosinase expression. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

PEIXOTO, A. L., LIRIO, E. J., PIGNAL, M. Siparunaceae in Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2020. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB88026>>. Acesso em: 12 mar. 2022

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Apoptosis: a target for anticancer therapy. **International**

Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 2, p. 2-10, 2018.

POLEDNIK, K. M.; KOCH, A. C.; FELZIEN, L. K. Effects of essential oil from *Thymus vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. **Zebrafish**, v.15, n. 4, p. 361-371, Aug. 2018.

PORTELLA, A. C. F. et al. Physical and chemical characterization of essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, São Paulo, v.37, n.5, p.844-849, 2014.

POSS, K. D.; KEATING, M. T.; NECHIPORUK A. Tales of regeneration in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 226, n. 2, p. 202-210, 2003.

PRATA, M. N. L. et al. Anti-inflammatory and immune properties of the peltatoside, isolated from the leaves of *Annona crassiflora* Mart., in a new experimental model zebrafish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 101, p. 234-243, 2020.

QAMAR, M. et al. *Syzygium cumini* (L.), Skeels fruit extracts: *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 271, p. 113805, 2021.

RAGA, D. et al. Effects of triterpenes from *Ardisia cf. elliptica* (subgenus tinus) and sterols from *Ardisia pyramidalis* Cav Pers on *Artemia salina* and *Danio rerio* toxicity and caudal fin regeneration. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.6, n. 3, p.1014-1022, 2014.

RASHIDIAN, G. et al. Oregano (*Origanum vulgare*) extract enhances zebrafish (*Danio rerio*) growth performance, serum and mucus innate immune responses and resistance *Against aeromonas hydrophila* challenge. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 299, 2021.

REN, D.-L. et al. Melatonin regulates the rhythmic migration of neutrophils in live zebrafish. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 4, p. 452-460, 2015.

RENSHAW, S. A. et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. **Blood**, v. 108, n.13, p. 3976–3978, 2006.

RIELLA, K. R. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, Sept. 2012.

ROSALES, C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types?. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 113, 2018.

SALDANHA, A. A. et al. Chemical composition and evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Duguetia furfuracea* essential oil: effect on edema, leukocyte recruitment, tumor necrosis factor alpha production, iNOS expression, and adenosinergic and opioidergic systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 325-336, 2019.

SANTANA, G. D. C.; SANTANA, M. D. C. P. **Farmacologia da dor e da inflamação**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 83 p.

SANTOS, M.de F.; IORI, P. Plantas medicinais na introdução da educação ambiental na

escola: uma revisão. **Conexão Ciência**, v. 12, n. 2, p. 132-138, ago. 2017.
<https://doi.org/10.24862/ccco.v12i2.591>

SANTOS, M. de F. et al. Stomatal analysis in leaves of *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae). **Research, Society and Development**, v.11, n.1, p. e17111124722, 2022.

SILVA, A. L. M. de O. M. da; COSTA, A. P. R. da. Principais alterações qualitativas e distúrbios benignos dos neutrófilos: uma revisão de literatura. **Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT - Pernambuco**, v. 4, n. 3, p.1-18, 2020. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/facipesaude/article/view/9872>. Acesso em: 04 fev. 2022.

SILVA, I. C. Neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory functions. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 7, p. 35-46, 2015.

SILVA, Í. F., OLIVEIRA, F. F.de, OLIVEIRA, R. A. de. *Siparuna* Aublet genus (Siparunaceae): From folk medicine to chemical composition and biological activity. **Trends in Phytochemical Research**, v.5, n. 4, p. 168-189, 2021.

SILVA, J. A. C. D.; SILVA, M. F. D. Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil - II: famílias Myristicaceae, Siparunaceae e Monimiaceae. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 2, p. 207-212, 2008.

SILVA, J. M. D.; MENDONÇA, P. P.; PARTATA, A. K. Anti-inflamatórios não esteroides e suas propriedades gerais. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v. 7, n. 4, p. 1-15, 2014.

SILVA, L. E. D.; VALENTINI, C. M. A.; BARROS, W. M. D. *Siparuna guianensis*: obtenção do óleo essencial e avaliação do potencial farmacológico. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 59, 2015.

SILVA, M. D. P.; MARINI, F. S.; MELO, R. S. Levantamento de plantas medicinais cultivadas no município de Solânea, agreste paraibano: reconhecimento e valorização do saber tradicional. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 881-890, 2015.

SINGSAL, K. et al. Effect of streblus asper leaf extract on scopolamine-induced memory deficits in zebrafish: the model of alzheimer's disease. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 2021, p. 6666726, 2021.

SINGULANI, J. L. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiology**, v. 13, n. 15, p. 1637, 2018.

SUN, L. et al. Effects of 17 α -ethinylestradiol on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. **Science of The Total Environment**, v. 653, p. 10-22, Feb. 2019.

TAYLOR, P. et al. Screening of venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 4, p. 530-539, 2013.

TAYLOR, P. et al. Evaluation of Venezuelan medicinal plant extracts for antitumor and antiprotease activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 5, p. 349-362, 2006.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

TEAME, T. et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 3, p. 68-77, 2019.

TIAN, L. et al. Preliminary safety assessment of oridonin in zebrafish. **Pharmaceutical Biology**, v. 57, n. 1, p. 632-640, 2019.

THOMÉ, R. G. et al. Evaluation of healing wound and genotoxicity potentials from extracts hydroalcoholic of *Plantago major* and *Siparuna guianensis*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 12, p. 1379-1386, Dec. 2012.

TRIGUEIRO, N.S.de S. et al. Zebrafish as an emerging model system in the global south: two decades of research in Brazil. **Zebrafish**, v.17, n.6, p.412-425, 2020.

VALENTINI, C. M. A.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet ("negramina"): a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2010.

VALENTINI, C. M. A. et al. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1506-1509, 2010.

VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

WITKO-SARSAT, V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory investigation**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. PROGRAMME ON TRADITIONAL MEDICINE. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review. **World Health Organization**, 1998, 45 p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801> Acesso em: 12. mar. 2022.

XIA, Q. et al. A developmental toxicity assay of Carpesii Fructus on zebrafish embryos/larvae. **Toxicology Research**, v. 6, n. 4, p. 460-467, July 2017a.

XIA, Q. et al. Assay for the developmental toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to zebrafish embryos/larvae. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 71-81, Jan. 2017b.

XIONG, G. et al. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 95, p. 399-410, Dec. 2019.

YANG, Y. et al. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an *in vivo* zebrafish model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 496, n. 2, p. 763-769, Feb. 2018.

YOSHINARI, N.; KAWAKAMI, A. Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. **The Biological Bulletin**, v. 221, n. 1, p. 62-78, Aug. 2011.

ZHAO, C. et al. Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 62, p. 152959, Sept. 2019.

ZOGHBI, M. D. G. B. et al. Essential oils of *Siparuna guianensis* aubl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 5, p. 543-546, 1998.

SEGUNDA PARTE- ARTIGOS

**ARTIGO 1 - Análise estomática em folhas de *Siparuna guianensis* Aubl.
(Siparunaceae)**Stomatal analysis in leaves of *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae)Análisis estomático de hojas de *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae)

Recebido: 13/12/2021 | Revisado: 17/12/2021 | Aceito: 22/12/2021 | Publicado: 04/01/2022

Maria de Fátima SantosORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1092-9062>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: mariadefatimasmf@gmail.com**Natalia Ritter Ruas**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1337-4736>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: natiiruas@gmail.com**Aline Norberto Ferreira**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6527-9693>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: nf_aline@hotmail.com**Marcos Ferrante**ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6979-2956>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: marcos.ferrante@ufla.br**Manuel Losada Gavilanes**ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7480-6582>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: mlgavilanes@ufla.br**Elisângela Elena Nunes Carvalho**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1124-8066>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: elisangelacarvalho@ufla.br**Artigo publicado na revista Research, Society and Development no dia 04 de janeiro de
2022**

Resumo

Os estômatos são importantes estruturas anatômicas presentes principalmente nas folhas das plantas, sendo responsáveis na regulação de trocas gasosas. Estas estruturas são utilizadas na ciência para a identificação de mudanças climáticas sofridas pelo vegetal, além de ser um indicador no controle de qualidade de drogas vegetais. Este trabalho teve como objetivo quantificar e caracterizar os estômatos em folhas de *Siparuna guianensis* empregando-se dois métodos diferentes de captura de imagens. Para tanto utilizou-se a Microscopia eletrônica de varredura e Microscopia óptica por meio da técnica de impressão da epiderme, sendo avaliados a densidade estomática, índice estomático, diâmetro polar (DP) e equatorial (DE) dos estômatos e a relação entre DP/DE. Foi observado a presença de estômatos na epiderme nas duas faces foliares com predominância na abaxial, permitindo classificar as folhas como anfihipoestomática. Notou-se também diferença significativa nos testes avaliados da densidade estomática entre as faces abaxial e adaxial. Os estômatos desta espécie são classificados com paracítico. **Palavras-chave:** Negramina; Anatomia Foliar; Estômato; Anfihipoestomática; Impressão da Epiderme.

Abstract

The stomata are important anatomical structures present mainly in the plant leaves, being responsible for the regulation of gas exchange. These structures are used in science to identify the climate changes suffered by the plant, as well as being an indicator in the quality control of plant drugs. This work aimed to quantify and characterize the stomata in *Siparuna guianensis* leaves using two different image capture methods. To do so, scanning electron microscopy and optical microscopy was used, using the epidermis imprinting technique. Stomatal density, stomatal index, polar diameter (PD) and equatorial diameter (ED) of the stomata and the relation between PD/ED were evaluated. The presence of stomas was observed in the epidermis on both leaf faces with predominance on the abaxial side, allowing the leaves to be classified as anfihipoestomatics. There was also a significant difference in the evaluated tests of stomatal density between the abaxial and adaxial faces. The stomata of this species are classified as paracytic.

Keywords: Negramina; Leaf Anatomy; Stoma; Anfihipoestomatics; Epidermis Impression.

Resumen

Los estomas son importantes estructuras anatômicas presentes principalmente en las hojas de las plantas, siendo responsables de la regulación del intercambio de gases. Estas estructuras se utilizan en la ciencia para identificar los cambios climáticos sufridos por la planta, además de ser un indicador en el control de calidad de los medicamentos vegetales. Este trabajo tuvo como objetivo cuantificar y caracterizar los estomas en las hojas de *Siparuna guianensis* utilizando dos métodos diferentes de captura de imágenes. Para ello, se utilizó la microscopía electrónica de barrido y la microscopía óptica, utilizando la técnica de impresión epidérmica. Se evaluó la densidad estomática, el índice estomático, el diámetro polar (DP) y el diámetro ecuatorial (DE) de los estomas y la relación entre DP/DE. La presencia de estomas en la epidermis se observó en ambas caras de la hoja, con predominio en la abaxial, lo que permitió clasificar las hojas como anfihipostomatica. También se observó una diferencia significativa en las pruebas evaluadas de densidad estomática entre las caras abaxial y adaxial. Los estomas de esta especie se clasifican como paracíticos.

Palabras clave: Negramina; Anatomía de La Hoja; Estomas; Anfihipostomatica; Impresión de la Epidermis.

1. Introdução

Os estômatos são estruturas morfológicas microscópicas, encontradas na camada epidérmica de órgãos vegetais principalmente nas folhas, compostas por duas células estomáticas (células-guarda) que circundam uma abertura, o ostíolo (poro ou fenda). São importantes para a regulação das trocas gasosas da planta, devido à abertura dos ostíolos em resposta as mudanças no ambiente. Os estômatos, além de serem o local responsável pelas trocas de oxigênio e gás carbônico (CO₂) é também onde ocorre a difusão d'água na transpiração vegetal (Barbosa, Porto, & Bertolde, 2018; Zoulias et al., 2020).

Estas estruturas são bastante sensíveis às variações ambientais, como luz, água, temperatura e a concentração de gás carbônico. A presença de luz, por exemplo, regula positivamente o desenvolvimento estomático, podendo levar à alterações na densidade e índice estomático (Zoulias et al., 2020). Uma baixa densidade estomática restringe a difusão vertical de CO₂ por meio da folha e reduz as taxas fotossintéticas, no

entanto, a alta densidade estomática provoca a diminuição da difusão de CO₂ causando a baixa assimilação de carbono (Simon et al., 2020).

É importante conhecer a morfologia e as características dos estômatos, pois estes permitem ao vegetal otimizar e balancear a fotossíntese como no uso e disponibilidade da água ajustando-se as condições ambientais (Calvo et al., 2020), e na utilização de características epidérmicas das plantas como indicadores de poluição ambiental (Gahlot & Khanna, 2019), além de ser um parâmetro utilizado para identificar espécies, morfologicamente parecidas, empregadas em medicamentos à base de folhas (Bashir et al., 2020)

Mesmo diante do exposto sobre a importância do conhecimento dos estômatos existem espécies vegetais com escassez de estudos, entre elas a *Siparuna guianensis* Aubl., (Siparunaceae), um arbusto ou arvoreta aromática, conhecida popularmente como “negramina”, “folha-santa”, “marinheiro”, “limão-bravo” e “capitiú”. É uma planta neotropical, sendo encontrada em diferentes domínios fitogeográficos no Brasil, como no bioma Cerrado, Amazônia, Pantanal, Caatinga e Mata Atlântica. As folhas de *S. guianensis* possuem indicações etnobotânicas/etnofarmacológicas como carminativas, estimulantes, anti-dispépticas, diuréticas, dores no corpo, sinusite, febre, reumatismo, distúrbios inflamatórios e enxaqueca (Almeida et al., 2021; Carvalho et al., 2020; Ferreira et al., 2020; Peixoto, Lirio & Pignal, 2020; Moura et al., 2020; Valentini, Rodríguez-Ortíz, & Coelho, 2010).

Devido à escassez de trabalhos morfo-anato-ecológicos realizados com esta espécie vegetal, este trabalho teve como objetivo quantificar e caracterizar os estômatos em folhas de *Siparuna guianensis*.

2. Metodologia

Neste trabalho, foram utilizadas duas técnicas de capturas de imagem: microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folhas de *Siparuna guianensis*. O material vegetal utilizado foi identificado pela doutora Ariane Luna Peixoto e o doutor Manuel Losada Gavilanes e uma amostra (exsicata) de material fértil foi depositada no Herbário PAMG, (Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, Belo Horizonte, MG), que é considerado herbário fiel depositário, com o número de registro 58647.

As folhas foram coletadas no período da manhã em Remanescente de Floresta Estacional Semidecidual localizado no Horto de Plantas Medicinais da Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL) do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras - UFLA (21° 14' 42" S; 45° 0' 00" W, 919 metros de altitude). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura – DAG, ESAL/UFLA, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia – DFP, ESAL/UFLA e no Laboratório de Anatomia Vegetal do setor de Botânica Estrutural do Departamento de Biologia (DBI) do Instituto de Ciências Naturais ICN/UFLA.

Microscopia óptica (MO)

Utilizou-se a técnica de impressão da epiderme, em 12 folhas plenamente desenvolvidas, que foram coletadas no 4º e 5º nó, a partir do ápice do ramo; as folhas foram fracionadas, em terço apical, mediano e basal e fixadas em etanol 70% por 72 horas (Jensen, 1962). Foram obtidas impressões das epidermes das faces adaxial e abaxial, utilizando-se adesivo instantâneo (TEK® BOND); as impressões foram utilizadas para a montagem de lâminas semipermanentes (Segatto et al, 2004) que foram observadas em microscópio de luz (Olympus CX 31, Olympus Optical) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Eureka 3.0, Bel Engineering).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram coletadas 12 folhas plenamente desenvolvidas no 4º e 5º nó, a partir do ápice do ramo; foram retirados fragmentos na região mediana entre a nervura primária e o bordo da lâmina foliar, fixadas em solução de *Karnovsky* modificado (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,05M, pH 7,2 e Cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,001 m) por 24 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas em cacodilato por 3 vezes, durante 10 minutos e desidratadas em uma série de soluções de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%, este último por 3 vezes) durante 10 minutos. As amostras foram secadas com dióxido de carbono em um secador de ponto crítico (CPD Bal-tec 30), e, em seguida, montadas em suportes (*stubs*) com fita dupla face de carbono. Posteriormente, foram revestidos com uma camada de ouro de 20 nm por evaporação a vácuo (Bal-TEC SDC 50). Os *stubs* prontos foram observados no microscópio eletrônico de varredura Leo Evo40 XVP (Carl Zeiss, Germany) (Alves & Perina, 2012).

Análise dos estômatos

A partir destas técnicas foram obtidas eletromicrografias e fotomicrografias das faces adaxial e abaxial das folhas, sendo mensurados os seguintes parâmetros: diâmetro polar dos estômatos (µm); diâmetro equatorial dos estômatos (µm); a relação entre diâmetro polar/equatorial (DP/DE); densidade estomática (mm⁻²) e porcentagem do índice estomático. As contagens e medições foram feitas utilizando software de análise de imagem ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) (Martin et al., 2013) calibrado com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotografias (Gavilanes et al, 2020).

O cálculo do índice estomático foi realizado de acordo com a fórmula: % Índice Estomático = número de estômatos / (número de estômatos + número de células epidérmicas) X 100 e a Densidade Estomática = estômatos totais/mm² (Zoulias et al., 2020).

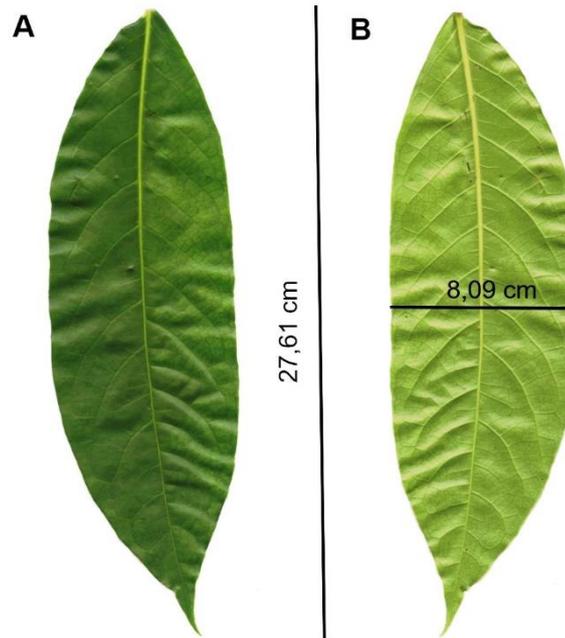
Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste *Scott-Knott* com nível de significância de 5% usando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

3. Resultados

As folhas de *Siparuna guianensis* possuem lâminas foliares simples, de consistência membranácea, de margens lisas, dispostas em filotaxia oposta; pecíolo de 0,5-1,5 cm de comprimento, são alongadas a elípticas ou lanceoladas, com 10,0-22,0 (-30) x 4,0-10,0 (-11) cm, base obtusa, ápice acuminado, inclinado 0,5-1,0 cm de comprimento, a superfície inferior com 9-12 pares de nervuras secundárias levemente salientes (Rennes & Hausner, 2005), apresentando características visuais que facilitam a diferenciação da face adaxial da abaxial. A superfície adaxial apresenta uma coloração esverdeada mais escura (Figura 1A), enquanto a abaxial é mais clara (Figura 1B).

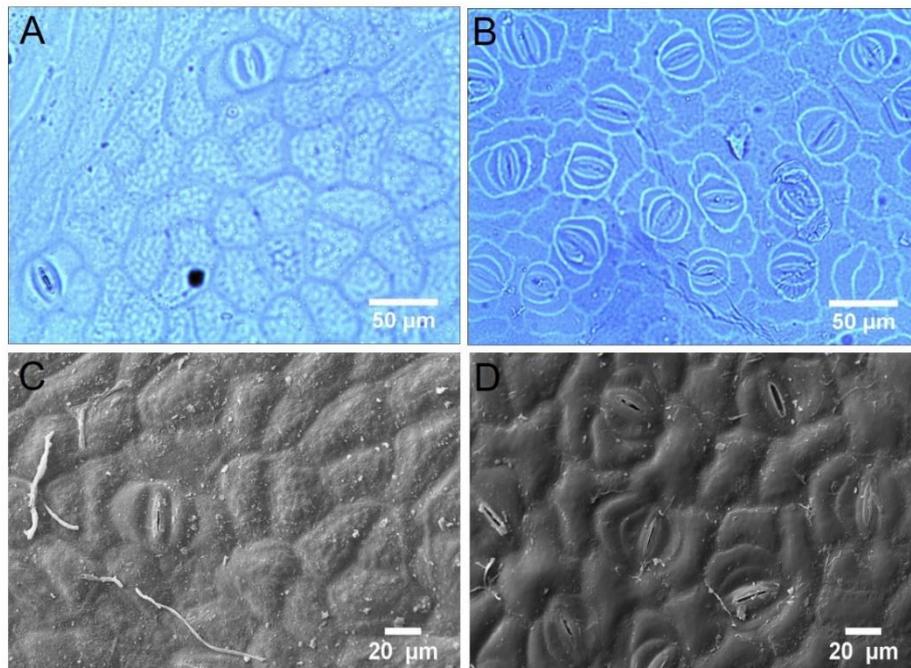
Figura 1. Superfície adaxial (A) e abaxial (B) da lâmina foliar de *Siparuna guianensis*



Fonte: Autores (2021).

A *Siparuna guianensis*, apresenta estômatos na epiderme das duas faces foliares: adaxial (Figura 2A e C) e abaxial (Figura 2B e D), mais frequentes na face abaxial o que permite classificar a folha como anfihipoestomática. Os estômatos são classificados como paracíticos.

Figura 2. Imagens dos estômatos da folha de *Siparuna guianensis*.



Legenda: Impressões da epiderme - Microscopia Óptica: **A.** face adaxial, **B.** face abaxial; Microscopia eletrônica de varredura: **C.** face adaxial e **D.** face abaxial.

Fonte: Autores (2021).

Na análise estomática, ambos os testes verificados apresentaram diferenças significativas entre as faces, pois como mencionado anteriormente esta espécie apresenta maior número de estômatos na face abaxial, sendo em média observados 8 a 14 estômatos por área (μm^2); também foi averiguada diferenças entre os métodos de captura, mas isto já era esperado, pois cada microscópio atinge aumentos diferentes. No MEV os estômatos foram avaliados em aumento de 1.000 vezes (apresentado à área da eletromicrografia de $25,52 \mu\text{m}^2$) e no MO utilizou-se um aumento de 200 vezes (obtendo-se uma área de $12,39 \mu\text{m}^2$ na fotomicrografia).

A densidade estomática, que é representada pelo número de estômatos por mm^2 , exibiu na face abaxial das eletromicrografias obtidas pelo MEV o valor de $204,16 \pm 7,04 \text{ mm}^2$ e na impressão de epiderme foi de $162,08 \pm 8,94 \text{ mm}^2$; não havendo, diferença significativa entre os tratamentos na face adaxial (Tabela 1).

Tabela 1. Densidade estomática, diâmetro polar, equatorial e DP/DE da folha de *Siparuna guianensis* sobre diferentes técnicas histológicas.

Técnicas histológicas	Face foliar	Densidade estomática (mm^2)	Diâmetro polar (μm)	Diâmetro equatorial (μm)	DP/DE (μm)
MEV	Adaxial	$27,85 \pm 2,14\text{c}$	$22,37 \pm 0,88\text{c}$	$14,39 \pm 0,76\text{c}$	$1,6 \pm 0,10\text{a}$
Impressão epidérmica		$15,48 \pm 1,62\text{c}$	$24,54 \pm 0,90\text{b}$	$17,86 \pm 0,59\text{a}$	$1,39 \pm 0,07\text{b}$
MEV	Abaxial	$204,16 \pm 7,04\text{a}$	$19,57 \pm 0,58\text{d}$	$12,16 \pm 0,39\text{d}$	$1,65 \pm 0,08\text{a}$
Impressão epidérmica		$162,08 \pm 8,94\text{b}$	$27,80 \pm 0,75\text{a}$	$16,14 \pm 0,29\text{b}$	$1,73 \pm 0,05\text{a}$
	CV (%)	25,24	13,65	13,05	19,82

Média \pm erro padrão, seguidas de mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de $p \leq 0,05$ segundo o teste de *Scott-Knott*. (face abaxial $n=24$ e adaxial $n=12$).

Fonte: Autores (2021).

Os diâmetros polar e equatorial (Tabela 1) foram mensurados em estômatos que apresentaram ostíolo fechado. Estas variáveis demonstraram resultados diferentes nas faces da folha de *Siparuna guianensis*, exibindo diâmetro maior nos estômatos obtidos na técnica da impressão de epiderme, sendo de $27,80 \pm 0,75 \mu\text{m}$ (abaxial) e $24,54 \pm 0,9 \mu\text{m}$ (adaxial) para o diâmetro polar; $17,86 \pm 0,59 \mu\text{m}$ (abaxial) e $16,14 \pm 0,29 \mu\text{m}$ (adaxial) no equatorial. Na relação entre DP/DE somente a face adaxial obtida por impressão da epiderme apresentou variação entre os tratamentos ($1,39 \pm 0,07 \mu\text{m}$).

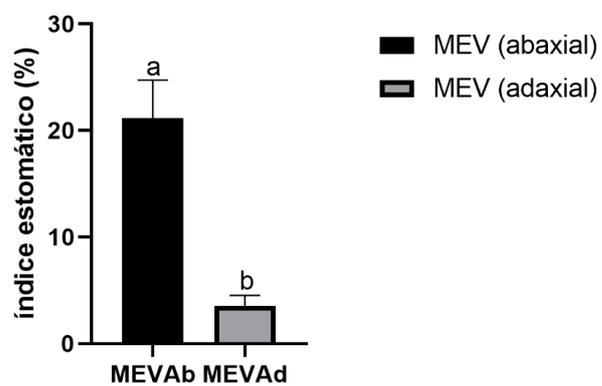
Nas eletromicrografias obtidas no MEV, foi possível realizar a contagem das células comuns da epiderme para calcular a porcentagem de índice estomático (I.E). Já a técnica de impressão da epiderme obtida no MO não foi um método viável para a *Siparuna guianensis*, pois impossibilitou a visualização nítida das células comuns da epiderme em algumas fotomicrografias (Figura 3). O I.E (%) apresentou diferença entre as faces da folha de $21,2 \pm 0,72$ (abaxial) e $3,5 \pm 0,28$ (adaxial) (Gráfico 1).

Figura 3. Estômatos obtido por impressão da epiderme



Fonte: Autores (2021).

Gráfico 1. Índice estomático (%) da região mediana da folha de *Siparuna guianensis*



Média seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si ao nível de $p \leq 0,05$ segundo o teste de *Scott-Knott*.

Fonte: Autores (2021).

Avaliou-se também a presença de estômatos nas porções ápice, meio e base da folha de *Siparuna guianensis* em suas diferentes faces, pelo método de impressão da epiderme; os resultados estão demonstrados na Tabela 2. Foi verificada diferença significativa entre as faces foliares, mas não havendo diferença entre os tratamentos na análise da densidade estomática; apresentando somente variações no diâmetro polar na área localizada na base foliar da face abaxial ($30,79 \pm 0,89 \mu\text{m}$) e no diâmetro equatorial na base da face adaxial ($19,36 \pm 0,79 \mu\text{m}$).

Tabela 2. Densidade estomática, diâmetro polar, equatorial e DP/DE da folha de *Siparuna guianensis* pela técnica de impressão da epiderme.

Região foliar	Face foliar	Densidade estomática (mm ²)	Diâmetro polar (µm)	Diâmetro equatorial (µm)	DP/DE (µm)
Ápice		15,47±1,62b	22,71±1,03c	17,57±0,34b	1,29±0,06c
Meio	Adaxial	15,48±1,62b	24,53±0,90c	17,86±0,59b	1,34±0,07c
Base		15,43±1,61b	25,82±1,37c	19,36±0,79a	1,38±0,07c
Ápice		167,64±12,51a	28,20±0,73b	15,21±0,29c	1,87±0,07b
Meio	Abaxial	162,08±8,94a	27,80±0,75b	16,14±0,29c	1,73±0,05b
Base		172,85±9,39a	30,79±0,89a	15,34±0,34c	2,03±0,08a
	CV (%)	35,98	14,15	10,43	17,35

Média±erro padrão seguidas de mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de $p \leq 0,05$ segundo o teste de *Scott-Knott*. (face abaxial n=24 e adaxial n=12).

Fonte: Autores (2021).

4. Discussão

As folhas da espécie *Siparuna guianensis*, apresentam estômatos em ambas a faces foliares abaxial e adaxial, com predominância na face abaxial, sendo a folha classificada com anfigipostomática. Os estômatos são classificados como paracíticos, denominados desta maneira por apresentarem em torno de sua estrutura duas células subsidiárias (anexas), localizadas de forma que seu eixo longitudinal fica paralelo ao da célula-guarda (Alquini et al., 2006). No trabalho desenvolvido por Bieras e Sajo (2009), realizado por meio de seções transversais da região mediana do ápice foliar e clarificado com hipoclorito de sódio (20%) de lâminas da folha de *Siparuna guianensis*, esses autores verificaram a presença de estômatos somente na face abaxial classificando as folhas como hipostomáticas, resultado diferente foi obtido neste trabalho, sendo verificado em média 1,25 estômatos por unidade de área nas eletromicrografias da face adaxial.

Na análise da densidade estomática de acordo Barbosa, Porto e Bertolde (2018), a maior densidade pode estar relacionada quando as folhas são expostas à alta incidência de luz ou quantidade baixa de água, estando relacionado ao controle da condutividade estomática. Isto se justifica porque a *Siparuna guianensis* apresentou poucos estômatos devido ao ambiente onde ela se encontra um Remanescente de Floresta Estacional Semidecidual, com ausência de irradiação solar diretamente sobre a planta, devido ao sombreamento ocasionado por outras espécies. Este aumento de sombra da planta provoca a diminuição no número de estômatos, mas apresenta aumento na área foliar (Gobbi et al., 2011; Lima Jr. et al., 2006). Diante de alguns trabalhos científicos a *Siparuna guianensis* é classificada como clímax tolerante à sombra (Nunes et al., 2003; Pinto et al., 2005).

A relação entre os DP e DE fornece um indicativo da forma como é o formato dos estômatos, quanto maior a relação DP/DE, mais elipsoide é seu formato, sendo maior sua função; ao contrário, quanto menor for esta relação menor será seu formato e função (Grisi et al., 2008; Oliveira & Miglioranza, 2013). Mesmo utilizando métodos diferentes de captura das imagens dos estômatos da *Siparuna guianensis*, eles apresentaram mesmo formato nas faces abaxial de acordo com a relação DP/DE.

5. Considerações Finais

Os estudos que envolvem caracterização dos estômatos são importantes e auxiliam na identificação das espécies e podem ajudar nos critérios de análise do controle de qualidade de produtos vegetais, considerados medicinais, a base de folhas, além de compreender os impactos das mudanças ambientais na planta.

A *Siparuna guianensis* é uma espécie anfigiostomática e os estômatos presentes nas folhas são do tipo paracítico.

Faz-se necessário a realizações de mais estudos, futuros, no aspecto botânico da *Siparuna guianensis* em relação aos tecidos constituintes das suas folhas, da estrutura da venação foliar e de seus frutos, sementes e casca do caule.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela bolsa de estudo; ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA e a doutora Ariane Luna Peixoto por ajudar na identificação da espécie estudada.

Referências

- Almeida, M. A. de., Conegundes, J. L. M., Evagelista, M. de R., Freitas, P. H. de, & Scio, E. (2021). Avaliação do perfil fitoquímico e do potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Siparuna guianensis* Aublet. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 17(2), 252-270.
- Alves, E., & Perina, F. J. (2012). *Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios x*. Lavras: UFLA, 63 p.
- Alquini, Y., Bona, C., Boeger, M. R. T., Costas, C. G. da, & Barra, C.F.B. (2006). Epiderme. In: Appezato-Da-Glória, B., & Carmello-Guerreiro, S.M. (Ed.), *Anatomia Vegetal*. Viçosa, MG: UFV: 2. ed. 438p.
- Barbosa, L. C., Porto, S. M., & Bertolde, F. Z. (2018). Análise estomática de duas espécies arbóreas nativas de mata atlântica. *Revista Pindorama*, 8(8), 1-9.
- Bashir, K., Sohail, A., Ali, U., Ullah, A., Ui Haq, Z., Gul, B., Sunera, & Asghar, M. (2020). Foliar micromorphology and its role in identification of the Apocynaceae taxa. *Microscopy Research and Technique*, 83(7), 755-766. doi: 10.1002/jemt.23466.
- Bieras, A. C., & Sajo, M. de G. (2009). Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. *Trees*, 23(3), 451-471. Doi:10.1007/s00468-008-0295-7.
- Calvo, C. R., Reyes, C. M. P., Armas, I. A., & Tamargo, A. P. (2020). Characterization of stomata in the species *Juglans jamaicensis* ssp. insularis (Griseb.) H. Schaarschm. (walnut tree). *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 8(1), 122-128.
- Carvalho, V. F., Ramos, L. dos A., Silva, C. A. da, Nebo, L., Moraes, D., Silva, F. F. A. da, ... & Rodrigues, R. M. (2020). *In vitro* anthelmintic activity of *Siparuna guianensis* extract and essential oil against *Strongyloides venezuelensis*. *Journal of Helminthology*, 94(e50), 1-5. doi: 10.1017/S0022149X19000282.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042. doi: 10.1590/S1413-70542011000600001.
- Ferreira, R. M. dos A., D'Haveloose, N. P., Cruz, R. A. S., Araújo, R. S., Carvalho, J. C. T., Rocha, L., ... & Souto, R. N. P. (2020). Nanoemulsification enhances the larvicidal potential of the essential oil of *Siparuna guianensis* (Laurales: Siparunaceae) Against *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 57(3), 788-796. doi: 10.1093/jme/tjz221
- Gavilanes, M. L., Silva, A. M. da, Dias, M. V. de F., Oliveira, J. A. de, Corrêa, F. F., & Rodrigues, L. C. de A. (2020). Estrutura foliar de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae) em ambiente de cerrado e campo rupestre. *Research, Society and Development*, 9(12), e149912100777. doi: 10.33448/rsd-v9i12.10077
- Gahlot, L., & Khanna, V. (2019). Stomatal Index of a few common tree species in the Kishangarh Marble Slurry Dump-yard area, Ajmer (Rajasthan): A case study. *Journal of Applied and Natural Science*, 11(1), 193-198. doi: 10.31018/jans.v11i1.1977.

- Gobbi, K. F., Garcia, R., Ventrella, M. C., Neto, A. F. G., & Rocha, G. C. (2011). Área foliar específica e anatomia foliar quantitativa do capim-braquiária e do amendoim-forrageiro submetidos a sombreamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(7) p. 1436-1444. doi: 10.1590/S1516-35982011000700006.
- Grisi, F. A., Alves, J. D., Castro, E. M. de, Oliveira, C. de, Biagiotti, G., & Melo, L. A. (2008). Leaf anatomical evaluations in 'Catuai' and 'Siriema' coffee seedlings submitted to water stress. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(6), 1730-1736. doi: 10.1590/S1413-70542008000600008.
- Jensen, W.A. (1962). *Botanical histochemistry*. Principles and practices. Freeman, San Francisco, 408 p.
- Lima Jr., É. de C., Alvarenga, A. A. de, Castro, E. A. de, Vieira, C. V., & Barbosa, J. P. R. A. D. (2006). Aspectos fisionômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore*, 30(1), 33-41. doi: 10.1590/S0100-67622006000100005.
- Martin, T. N., Marchese, J.A., Sousa, A. K. F. de, Curti, G. L., Fogolari, H., Santos, V. da C. dos (2013). Uso do software Imagej na estimativa de área foliar para a cultura do feijão. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnologia de América*, 38(12), p.843-848.
- Moura, W. de S., Souza, S. R. de, Campos, F. S., Cangussu, A. S. R., Santos, E. M. S., Andrade, B. S., ... & Aguiar, R. W. de S.(2020). Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products*, 146, 1-10. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112142.
- Nunes, Y. R. F., Mendonça, A. V. R., Botezelli, L., Machado, E. L. M., & Oliveira-Filho, A. T. de. (2003). Variações da fisionomia, diversidade e composição de guildas da comunidade arbórea em um fragmento de floresta semidecidual em Lavras, MG. *Acta Botanica Brasilica*, 17(2), 213-229. doi: 10.1590/S0102-33062003000200005
- Oliveira, E. C.de, Miglioranza, É. (2013). Dimensões e densidade estomática em diferentes variedades de mandioca. *Cultivando o Saber*, 6(4), 201-213.
- Peixoto, A. L., Lirio, E. J. & Pignal, M. (2020). *Siparunaceae in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Pinto, L. V. A., Botelho, S. A., Oliveira-Filho, A. T., & Davide, A. C. (2005). Estudo da vegetação como subsídios para propostas de recuperação das nascentes da bacia hidrográfica do ribeirão Santa Cruz, Lavras, MG. *Revista Árvore*, 29(4), 775-793. doi: 10.1590/S0100-67622005000500013.
- Renner, S. S.; Hausner, G. (2005). *Siparunaceae: Flora Neotropica Monograph 95*. New York: New York Botanical Garden, 256p.
- Segatto, F. B., Bisognin, D. A., Benedetti, M., Costa, L. C. da, Rampelotto, M. V., & Nicoloso, F. T. (2004). Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. *Ciência Rural*, 34(5), 1597-1601. doi: 10.1590/S0103-84782004000500042.
- Simon, N. M. L., Sugisaka, J., Honjo, M. N., Tunstad, S. A., Tunna, G., Kudoh, H., Dodd, & A. N. (2020). Altered stomatal patterning accompanies a trichome dimorphism in a natural population of *Arabidopsis*. *Plant Direct*, 4(9), 1-6. doi: 10.1002/pld3.262.
- Valentini, C. M. A., Rodríguez-Ortiz, C. E., & Coelho, M. F. B. (2010). *Siparuna guianensis* Aublet ("negramina"): A review. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(1), 96-104. doi: 10.1590/S1516-05722010000100014.
- Zoulias, N., Brown, J., Rowe, J., & Casson, S.A., (2020). HY5 is not integral to light mediated stomatal development in *Arabidopsis*. *Plos One*, 15(1), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0222480.

**ARTIGO 2 - Morfoanatomia e histoquímica da lâmina foliar de *Siparuna guianensis*
(Siparunaceae)**

ARTICLE 2 - Morphoanatomy and histochemistry of the leaf lamina of *Siparuna guianensis* (Siparunaceae)

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações**

RESUMO

Siparuna guianensis Aubl. (Siparunaceae) é uma planta aromática, popularmente conhecida como “negramina”, “folha-santa” e “capitiú”; é uma espécie lenhosa que ocorre em diferentes domínios fitogeográficos no Brasil. As folhas desta espécie possuem indicações etnobotânicas/etnofarmacológicas como no combate a flatulência, dores reumáticas, febre e anti-inflamatória. Neste sentido, objetivou-se identificar a presença de substâncias químicas e as características morfoanatômicas das folhas de *S. guianensis*. Foram utilizadas diferentes técnicas histoquímicas na identificação de lipídios totais, alcaloides, compostos fenólicos, tanino, amido, lignina e cristais de oxalato de cálcio e na análise morfológica foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de luz (ML). Foi identificada a existência de tricomas do tipo tectores estrelados na epiderme abaxial e a presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, alcaloide, tanino e lignina pelo método histoquímico. Desta forma, o presente estudo contribui de forma significativa para a identificação da espécie, bem como fornece dados para o controle de qualidade dos produtos fitoterápicos produzidos a partir desta espécie medicinal.

Palavras chaves: Compostos fenólicos. Tricoma estrelado. Negramina. Planta medicinal.

ABSTRACT

Siparuna guianensis Aubl. (Siparunaceae) is an aromatic plant, popularly known as "negramina", "folha-santa" and "capitiú"; it is a woody species that occurs in different phytogeographic domains in Brazil. The leaves of this species have ethnobotanical/ethnopharmacological indications such as to combat flatulence, rheumatic pain, fever, and anti-inflammatory. In this sense, the objective was to identify the presence of chemical substances and the morphoanatomical characteristics of *S. guiansensis* leaves. Different histochemical techniques were used in the identification of total lipids, alkaloids, phenolic compounds, tannin, starch, lignin and calcium oxalate crystals and in the morphological analysis, scanning electron microscopy (SEM) and light microscopy (LM) were used. The existence of stellate tector trichomes was identified in the abaxial epidermis and the presence of secondary metabolites, such as phenolic compounds, alkaloid, tannin and lignin by the histochemical method. Thus, the present study contributes significantly to the identification of the species, as well as providing data for the quality control of herbal products produced from this medicinal species.

Keywords: Phenolic compounds. Stellate trichome. Negramina. Medicinal plant.

1. INTRODUÇÃO

Siparunaceae é uma família desmembrada da família Monimiaceae; nela encontram-se plantas de hábito arbóreo ou arbustivo, com folhas simples, elípticas (exceto em *Siparuna monogyna* (Poepp. & Endl.) A. DC), verticiladas ou opostas, margens inteiras, denteadas ou serreadas sem estípulas. Algumas espécies são glabras enquanto outras apresentam vários tipos de tricomas nas folhas ou/e ramos, sendo tricomas simples, estrelados ou escamosos (SILVA; SILVA, 2008). As inflorescências são cimosas apresentando flores não vistosas, actinomorfas ou assimétricas, monoclamídeas e receptáculo floral bem desenvolvido. No Brasil, a família Siparunaceae não está presente somente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (HALL; MEIRELLES, 2017; SILVA; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2021).

O gênero *Siparuna* é composto por espécies aromáticas, sendo encontradas na forma de arbustos sarmentosos, arvoretas ou árvores, monoicas ou dioicas, com folhas decussadas ou vericuladas e isófilas. Flores unissexuais, frutos carnosos, normalmente globosos, ocorrendo sua abertura a partir do ápice, apresentando cheiro pungente. São identificadas no Brasil as espécies: *Siparuna bifida* (Poepp. & Endl.) A.DC., *Siparuna guianensis* Aubl., *Siparuna krukovii* A.C.Sm., *Siparuna poeppigii* (Tul.) A.DC., e *Siparuna ficoides* S.S. Renner & Hausner (HALL; MEIRELLES, 2017).

A espécie *Siparuna guianensis* (sinónimas *Citriosma discolor* Poepp & Endl.; *Citriosma guianensis* Aublet; *Citriosma glubrescens* Mart, *Siparuna discolor* (Poepp. & Endl.) A.DC.; *Siparuna arianae* M.V.L. Pereira; *Siparuna cavalcantei* Jangoux e *Siparuna panamensis* A.DC.) é uma planta aromática, conhecida vulgarmente como “capitiú”, “negramina”, “catingueira-de-paca”, “fedegoso”, “limão-bravo” e “erva-santa”, sendo suas folhas empregadas na medicina tradicional como carminativas, diuréticas, distúrbios inflamatórios, enxaqueca, dores do corpo, sinusite, febre, dores reumáticas e inseticida (ALMEIDA et al., 2021; CARVALHO et al., 2020; FERREIRA et al., 2020; MOURA et al., 2020; SANTOS et al., 2022; VALENTINI et al., 2010).

Diante do fato das plantas medicinais serem utilizadas popularmente no tratamento de diversas enfermidades como no caso da *Siparuna guianensis*, estas plantas podem ser empregadas de maneira errônea devido à falta de identificação correta e, em algumas situações as espécies apresentam semelhanças morfológicas o que impede o reconhecimento destas, Assim, se faz indispensável o estudo anatômico para facilitar a comprovação das espécies, bem como realização de análises histoquímicas para detectar substâncias químicas presentes em tecidos e células na estrutura vegetal (caule, semente, fruto e folha) (BETIM et al., 2020;

CONCEIÇÃO; AOYAMA, 2016).

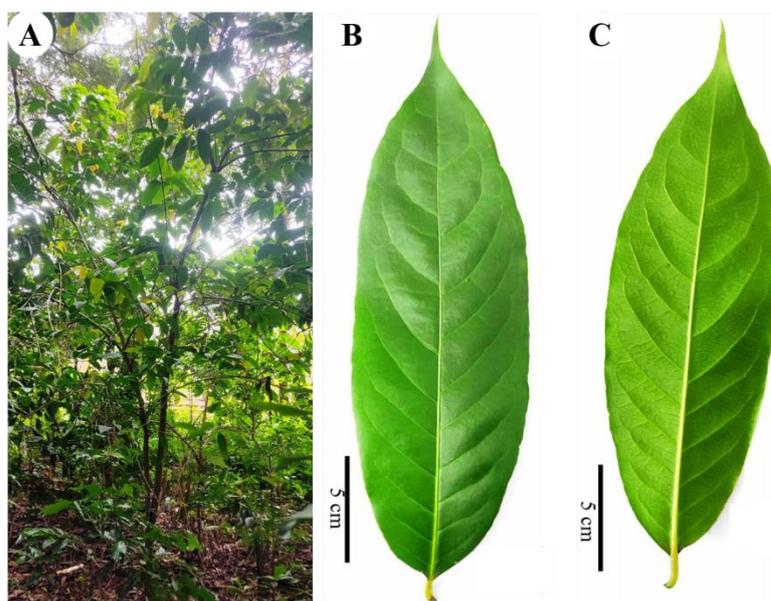
A caracterização dos aspectos anatômicos de órgãos vegetais pode oferecer informações para a melhor descrição botânica, especialmente, quando a espécie apresenta potencial farmacológico e atividade inseticida (BRITO et al., 2011). A identificação correta dos tricomas contribui na descrição detalhada do fármacógeno, principalmente quando está estrutura se encontra fragmentada, triturada ou mesmo pulverizada auxiliando no controle de qualidade do material vegetal (GUERREIRO et al., 2016).

Portanto, objetivou-se identificar a presença de substâncias químicas através de testes histoquímicos e à identificação morfoanatômica das folhas de *Siparuna guianensis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com lâminas foliares de *Siparuna guianensis* (registro da exsicata – PAMG 58647 - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais – EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) (FIGURA 1), obtidas do quarto e quinto nó de ramos plenamente desenvolvidos, coletadas em um Remanescente de Floresta Estacional Semidecidual localizado no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura – DAG da Escola de Ciências Agrárias - ESAL da Universidade Federal de Lavras -UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil (21° 13' 48.8" S; 44° 58' 28.5" W).

Figura 1 - Fotografia de indivíduo de *Siparuna guianensis* localizado em um Remanescente de Floresta Estacional Semidecidual.



Legenda: Fotografia A) arvoreta de *S. guianensis*; B) folha na face adaxial e C) folha na face abaxial.
Fonte: Do autor (2022).

2.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para caracterizar o tipo de tricoma presente nas folhas de *Siparuna guianensis* foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura Leo Evo40 XVP (Carl Zeiss, Germany). As folhas coletadas (n=12) inicialmente foram fixadas em solução de *Karnovsky* modificado (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,05M, pH 7,2 e Cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,001 m) durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas em cacodilato (3 vezes por 10 minutos) e desidratadas em uma série de soluções de acetona (25, 50, 75, 90 e 100% durante 10 minutos). A secagem das amostras foi completada com dióxido de carbono em um aparelhador de ponto crítico (CPD Bal-tec 30), e, em seguida, as amostras foram montadas em suportes de alumínio (*stubs*) com fita dupla face de carbono. Por fim, os espécimes foram revestidos com uma camada de ouro de 20nm por evaporação, em vácuo em aparelho SDC 50 (Bal-TEC) (ALVES; PERINA, 2012).

Após a obtenção das eletromicrografias (n=36) da face abaxial foi realizada a contagem do número, medição do comprimento e largura das hastes do tricoma com auxílio do software *Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) (MARTIN et al., 2013) calibrado com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotografias (GAVILANES et al., 2020), posteriormente calculado o erro padrão.

2.2. Corte em nitrogênio líquido

As amostras da região mediana da nervura central, depois de fixadas em solução de *Karnovsky* modificado, foram transferidas para glicerol 30% por 30 minutos. Em seguida imersas em nitrogênio líquido e cortadas com um bisturi. Após este processo as amostras da nervura foram desidratadas em uma série de soluções de acetona, secadas em ponto crítico, montadas em *stubs* com fita de carbono dupla face, revestidas com uma camada de ouro e observadas (ALVES; PERINA, 2012).

2.3. Microscopia Luz (ML)

Para verificar a presença dos tricomas nas folhas de *Siparuna guianensis* também foi realizada a técnica de impressão da epiderme. Neste processo as folhas (n=12) foram fixadas em etanol 70% durante 72 horas (JENSEN, 1962). Foram obtidas impressões das epidermes da face abaxial, utilizando-se adesivo instantâneo (TEK® BOND); as impressões foram utilizadas

para a montagem de lâminas semipermanentes (SEGATTO et al., 2004) que foram observadas em microscópio de luz (Olympus CX 31, Olympus Optical) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Eurekam 3.0, Bel Engineering).

2.3. Histoquímica

Os testes histoquímicos foram realizados por meio de cortes transversais de lâminas foliares frescas de *Siparuna guianensis* obtidas pelas seguintes metodologias demonstradas na tabela 1. As lâminas provisórias foram observadas em microscópio de luz Primo Star (Carl Zeiss) e Olympus CX 31 (Olympus Optical).

Tabela 1. Metodologias utilizadas nas análises histoquímicas das lâminas foliares de *Siparuna guianensis*

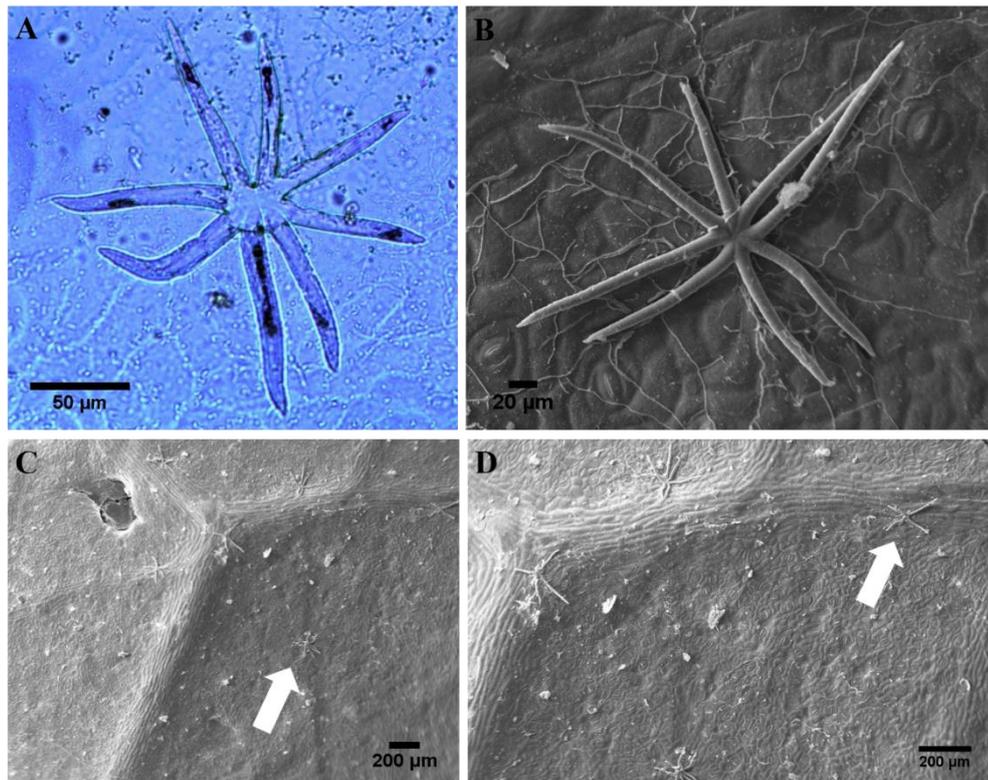
Substâncias identificadas	Reagentes	Coloração/reação	Referência
Lipídios totais	Sudan III	Alaranjado	Pearse (1972)
Alcaloides	Reagente de Wagner	Castanho avermelhado	Furr e Mahlberg (1981)
Compostos fenólicos	Azul de toluidina	Compostos fenólicos estruturas coram de verde claro; compostos não estruturais coram de verde escuro	O'Brien et al. (1964)
Composto fenólico	Dricomato de potássio 10%	Castanho avermelhado/castanho escuro	Gabe (1968)
Composto fenólico	Cloreto férrico III	Marrom a negro	Johansen (1940)
Tanino	Vanilina clorídrica	Rosa/vermelho	Mace e Howell (1974)
Grânulos de amido	Reagente de Lugol	Marrom, roxo, negro ou azul negro	Johansen (1940)
Lignina	Floroglucinol	Vermelho	Johansen (1940)
Cristais de oxalato de cálcio	Ácido clorídrico 10%	Dissolução dos cristais	Jensen (1962)

Fonte: Do autor (2022).

3. RESULTADOS

Através de seções paradémicas da região mediana de folhas adultas de *Siparuna guianensis* utilizando-se o MEV e ML foram identificadas a presença de tricomas do tipo tectores estrelados sobre a epiderme abaxial (FIGURA 2A e B), sendo verificada a presença desta estrutura próxima a nervura central (FIGURA 2C e D).

Figura 2 – Imagens de tricomas tectores estrelados através do microscópio eletrônico de varredura e do microscópio de luz.



Legenda: A) Fotomicrografia da lâmina foliar de *Siparuna guianensis* com a presença de tricomas tectores estrelados; B, C e D). Eletromicrografias de varredura das mesmas estruturas observadas em A. A seta mostra tricomas tectores estrelados em C e D.

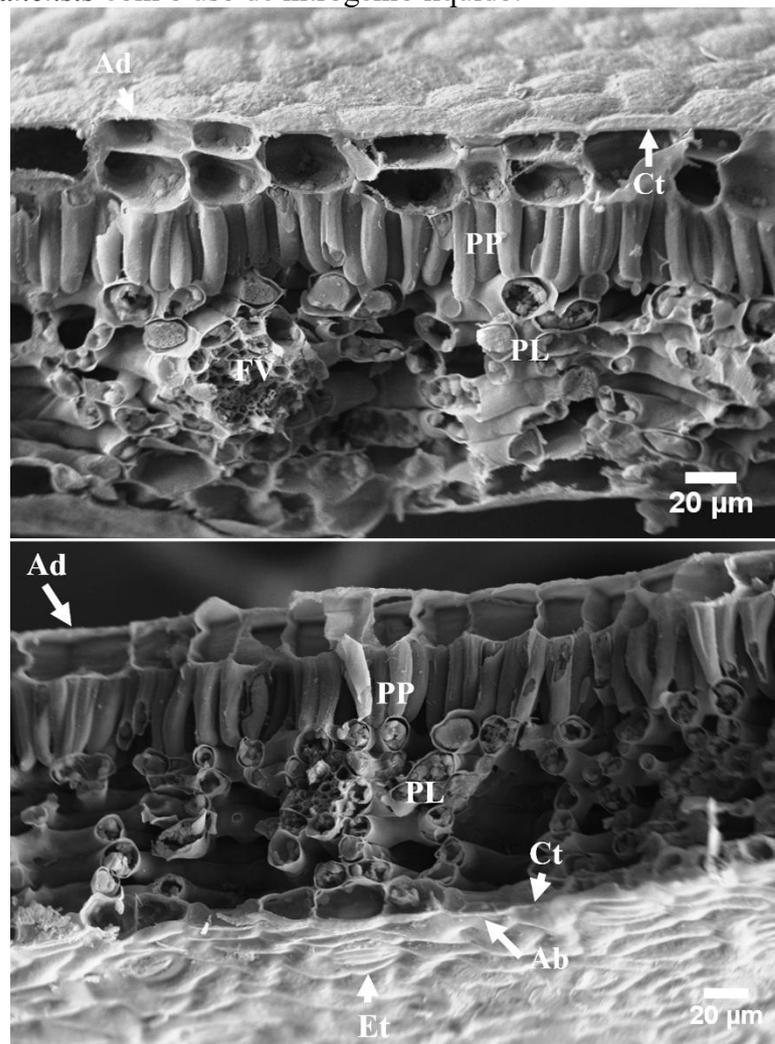
Fonte: Do autor (2022).

Devido à pequena quantidade de tricomas observadas nas eletromicrografias as folhas desta espécie são denominadas como glabrescentes. A análise detalhada dos tricomas demonstrou que em média foram detectadas $9,94 \pm 0,43$ hastes unicelulares, reunidas pela base, com comprimento de $88,25 \pm 4,61 \mu\text{m}$, largura $10,11 \pm 0,34 \mu\text{m}$ e formato de ponta aguda.

Por meio do corte em nitrogênio (FIGURA 3) pode-se verificar que a epiderme da face adaxial é unisseriada, porém em determinadas regiões foram observadas grupos de duas camadas, intercaladas; a epiderme apresenta na parede periclinal externa cutícula delgada; no

material coletado e examinado, na área de estudo não foram observados tricomas nesta face, porém foram verificados estômatos em número muito reduzido, quando comparado ao número de ocorrência na face abaxial. A epiderme da face abaxial é unisseriada e apresenta estômatos e tricomas; nesta face da folha, a cutícula é mais delgada, do que na face adaxial. Em relação a presença de estômatos, estes foram observados com mais frequentes na face abaxial da folha, o que permite a espécie ser classificada como anfihipoestomática e os estômatos como paracíticos (SANTOS et al., 2022).

Figura 3 - Eletromicrografias de varredura de cortes transversais da folha de *Siparuna guianensis* com o uso de nitrogênio líquido.



Legenda: Ad: Face adaxial; Ab: Face abaxial; PP: Parênquima paliçádico; PL: Parênquima lacunoso; Et: Estômato; Ct: Cutícula e FV: Feixe vascular.

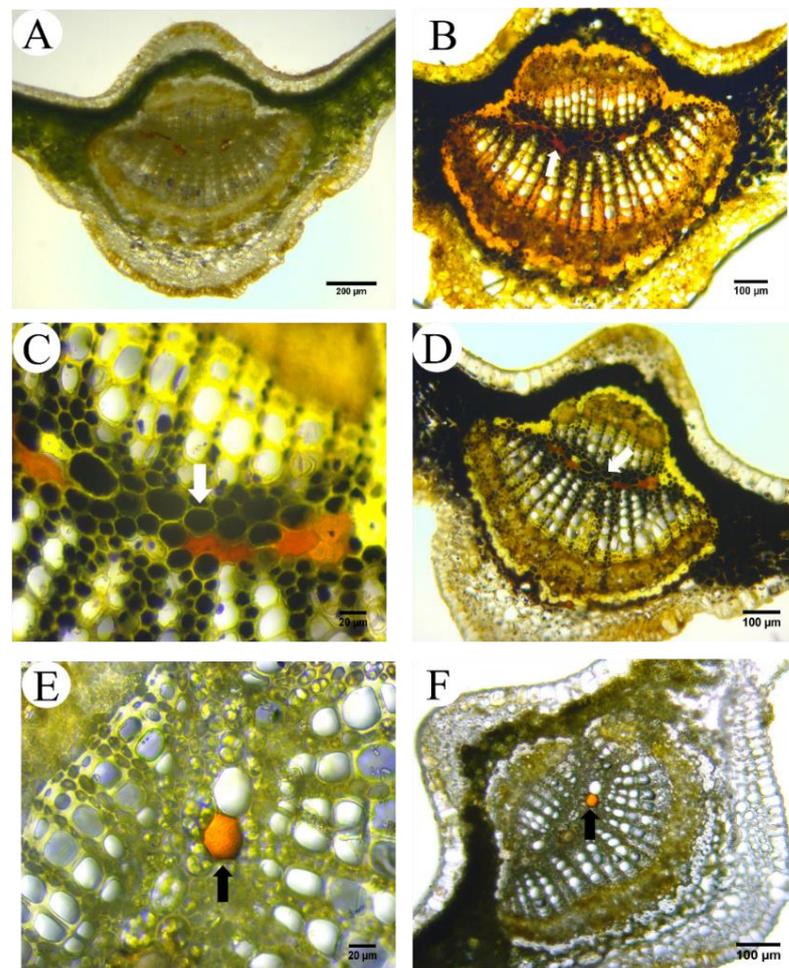
Fonte: Do autor (2022).

Na seção transversal da lâmina foliar de *Siparuna guianensis* observou-se que o mesofilo é do tipo dorsiventral, com a presença do parênquima paliçádico, imediatamente

abaixo da epiderme adaxial, sendo formado por uma camada de células mais altas do que largas e de um tecido lacunoso constituído de várias camadas de células de formatos, e tamanhos, irregulares que deixam entre si espaços intercelulares com diferentes dimensões. As eletromicrografias mostraram que as células epidérmicas na face superior da lâmina foliar apresentam paredes anticliniais retas.

Neste trabalho, foram utilizados diferentes métodos histoquímicos, sendo evidenciados grânulos de amido (FIGURA 4C e D) nos parênquimas lacunoso e paliçádico, em células isoladas da região medular e entre os feixes vasculares; alcaloides (FIGURA 4B) e taninos (FIGURA 4E e F) foram identificado em células da região medular, os lipídeos totais foram observados na cutícula e em algumas células do parênquima medular (FIGURA 5B e C) e a lignina foi encontrada presente nas paredes de componentes dos vasculares (FIGURA 5A).

Figura 4 - Fotomicrografias do corte transversal da folha de *Siparuna guianensis* submetidas a diferentes corantes e reagentes na análise histoquímica.

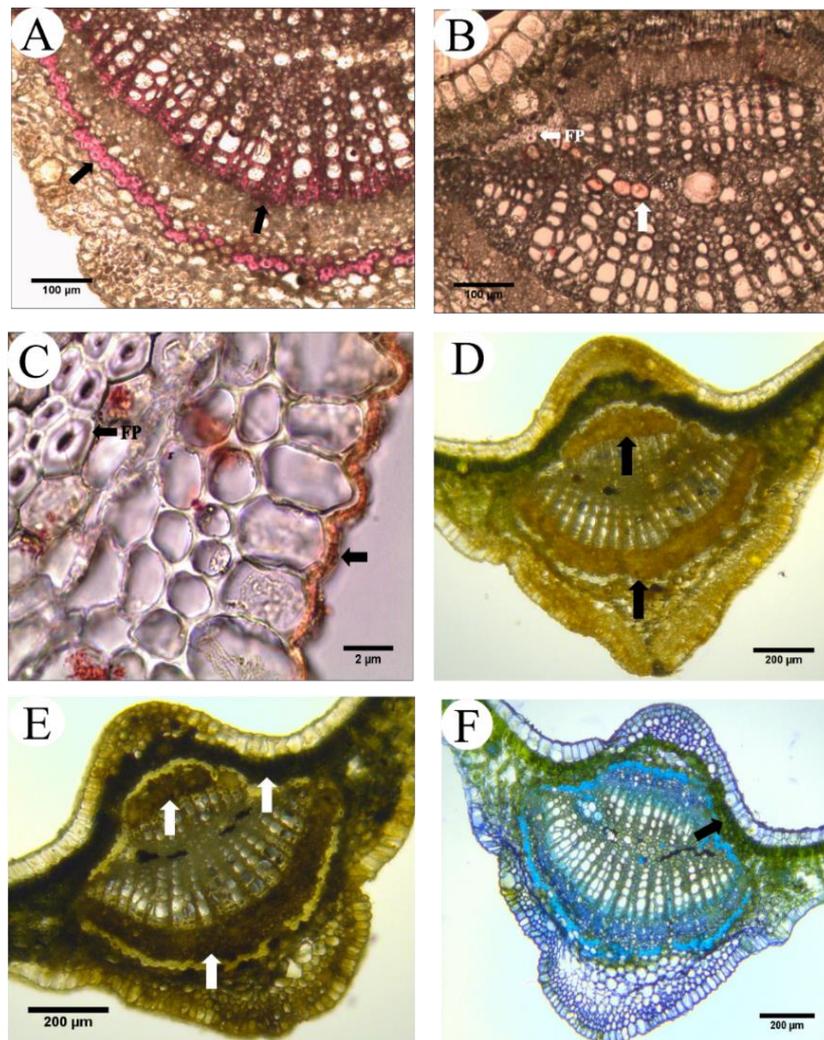


Legenda: A) Controle; B) seta indica a presença de alcaloides – Reagente de Wagner, C e D) seta indica a presença de grânulo de amido – Reagente de lugol; E e F); seta indica a presença de tanino – Reagente Vanilina clorídrica.

Fonte: Do autor (2022).

Para a identificação de compostos fenólicos foram realizados três testes diferentes, com Dicromato de potássio 10% (FIGURA 5D); Cloreto férrico (FIGURA.5E) e Azul de toluidina (FIGURA 5F), verificando-se a presença destas substâncias nos parênquimas lacunosos e paliçádicos. Através da reação de Ácido clorídrico à 10% constatou-se à ausência do cristal de oxalato de cálcio na folha de *Siparuna guianensis*.

Figura 4 - Fotomicrografias do corte transversal da folha de *Siparuna guianensis* submetidas a diferentes corantes e reagentes na análise histoquímica.



Legenda: FP: Fibra perivascular. Fotomicrografias A) seta indica a presença de lignina – reagente floroglucinol; B e C) seta indica a presença de lipídios totais – reagente sudan III; D) seta indica a presença de compostos fenólicos – Dicromato de potássio 10%; E) seta indica a presença de compostos fenólicos – reagente cloreto férrico; F) seta indica a presença de compostos fenólicos – reagente azul de toluidina.

Fonte: Do autor (2022).

4. DISCUSSÕES

Os tricomas do tipo tectores estrelados apresentam nas suas conformações uma haste, originada por uma ou mais células na base e no ápice, com ramificações num único plano em forma de candelabro (ALQUINI et al., 2006). Resultado semelhante à caracterização dos tricomas foi observado por Bieras e Sajo (2009), sendo verificada em eletromicrografias a presença de tricomas estrelados não-glandulares (tectores).

Portella et al. (2014) observaram, na folha adulta de *Siparuna guianensis*, a presença de outros tricomas como, glandulares do tipo capitado e peltado, em ambas as faces e, tricomas não glandulares tectores, unisseriados, multicelulares, não ramificados predominantes na epiderme abaxial que não foram detectados no presente estudo esses tipos de estruturas, sendo constatada somente a presença dos tricomas tectores estrelados nas duas técnicas de captura de imagens MEV e ML utilizadas.

O tricoma do tipo estrelado já foi identificado em outras espécies como *Croton linearifolius* Müll.Arg. (Euphorbiaceae), *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae), *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. (Hypericaceae), *Virola surinamensis* (Rol. Ex Rottb.) Warb (Myristicaceae), *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae), e de espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae) – *S. macrocarpon* L., *S. melanocerasum* All., *S. taeniotrichum* Correll., *S. caripense* Dunal (BRITO et al., 2011; DUARTE et al., 2011; PALMA et al., 2002; REIS et al., 2021; WATTS; KARIYAT, 2021).

No aspecto morfoanatômico de espécies do gênero *Siparuna*, a *Siparuna apiosyce* (Mart. ex Tul.) A. DC. (Siparunaceae) apresenta em ambas as faces uma epiderme unisseriada, possuindo uma cutícula delgada e lisa, sendo a cutícula da face adaxial mais evidente. O mesofilo desta espécie é constituído por uma camada de parênquima paliçádico encontrado imediatamente abaixo da epiderme superior, e vários estratos do parênquima lacunoso (SIMÕES; SOARES JÚNIOR, 2011).

Bieras e Sajo (2009) observaram em fotomicrografias da face adaxial de *Siparuna guianensis* células epidérmicas com paredes anticlinais retas e na face abaxial as células epidérmicas apresentaram paredes anticlinais sinuosas, em corte transversal da lâmina foliar a epiderme é composta por duas camadas na superfície adaxial e verificaram um parênquima paliçádico com idioblastos contendo compostos fenólicos. Estas características anatômicas também foram identificadas neste trabalho, exceto as observações da epiderme adaxial, onde no material examinado este apresentar uma camada de células, com intercalação de grupos de duas camadas, sendo aspectos importantes para identificação da espécie.

As propriedades medicinais atribuídas as *Siparuna guianensis* podem estar associadas à distribuição dos metabólitos secundários nos diferentes órgãos vegetais da espécie. Neste sentido, as técnicas histoquímicas são utilizadas para detectar as substâncias presentes em lâminas foliares, por meio de reações colorimétricas, sendo métodos rápidos e de baixo custo (MATIAS et al., 2016; SEIXAS; PALERMO; RODRIGUES, 2021). Assim, através dos testes histoquímicos adotados verificou-se a presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, alcaloide, tanino e lignina, sendo possível descrever a nível tecidual, a localização de síntese e/ou armazenamento dos metabolitos de uso farmacológicos nas folhas de *Siparuna guianensis*.

A interpretação dos resultados histoquímicos permite comparar órgãos vegetais, espécies e/ou matérias oriundos de diferentes ambientes ou estações do ano em que estes são produzidos pela planta como forma de adaptação climática. Assim, a triagem histoquímica prévia pode diminuir a realização de análises laboratoriais de alto custo financeiro na busca por compostos químicos em plantas (MATIAS et al., 2016).

A existência de compostos fenólicos e taninos nas plantas estão relacionados, especialmente a forma de proteção contra patógenos e na regulação do crescimento vegetativo (AMEDE et al., 2015; MAHENDRA; SUDARSHANA; JAGANNATH, 2021). Na espécie *siparuna guianensis* foi identificado durante a análise fitoquímica do extrato etanólico das folhas e na fração aquosa a presença de compostos fenólicos, taninos e flavonoides (CARVALHO et al., 2020). Já no extrato hidroetanólico obtido da parte aéreas fresca, verificou-se a presença vicenina-2 (apigenina-6,8-di-C-glicosídeo), quercetina 3-O-rutinoside-7-O-rhamnoside, quercetina-3-O-pentosyl-pentoside-7-O-rhamnoside, campferol-3-O-pentosil-pentosido-7-O-ramnósido, quercetina-3,7-di-O-ramosídeo e o kaempferol-3,7di-O-ramnosídeo (NEGRI et al., 2012).

As ligninas e seus derivados são classificados como polímeros orgânicos complexos que auxiliam especialmente na formação de espessamentos da parede celular de espécies vasculares (MAHENDRA; SUDARSHANA; JAGANNATH, 2021). Estas substâncias foram identificadas no presente estudo, através do teste calorímetro, utilizado o reagente floroglucinol. Foi observanda a presença de grande quantidade de lignina em componentes dos feixes vasculares e fibras perivasculares.

Desta forma, as informações obtidas no presente trabalho contribuem para o conhecimento dessa espécie, pouco investigada, sob os aspectos morfoanatômico. Além disso, a partir dos estudos histoquímicos, verificou-se a presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, alcaloide, tanino e lignina. Apesar destes resultados, ainda são necessários

vários outros estudos adicionais levando-se em conta aspectos estruturais e fisiológicos do caule, flores, frutos e raízes, para facilitar a identificação da espécie, em outros ambientes que ela possa ser encontrada.

5. CONCLUSÃO

Foi observado na lâmina foliar de *Siparuna guianensis* tricomas do tipo tectores estrelados, sendo verificado a presença de metabólitos secundários através de métodos colorimétricos, como compostos fenólicos, alcaloide, tanino e lignina.

Os resultados do presente estudo contribuem de forma significativa para a identificação da espécie e dos seus metabólitos secundários, bem como fornece dados para o controle de qualidade dos produtos fitoterápicos produzidos a partir desta espécie medicinal.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig); Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela bolsa de estudo e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.A. de et al. Avaliação do perfil fitoquímico e do potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 2, p.252-270, abr./jun. 2021.

ALQUINI, Y. et al. **Epiderme**. In: APPEZZATO-Da-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.), Anatomia Vegetal. 2ªed., Viçosa, UFV, 2006, 438p.

ALVES, E.; PERINA, F. J. **Apostila do curso introdutório à microscopiaeletrônica de varredura e microanálise de raios x**. Lavras, UFLA, 2012, 63 p.

AMEDE, S. C. et al. Morfo-anatomia e histoquímica foliar de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem)(Meliaceae), cultivadas em Goiás. **Revista Uniaraguaia**, Goiânia, v. 7, n.7, p.65-89, 2015.

BETIM, F. C. M. et al. Microscopy and histochemistry of *Ocotea nutans* (Nees) Mez (Lauraceae). **Flora**, v. 273, p. 151708, 2020.

BIERAS, A. C., SAJO; M. das G. Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. **Trees**, v. 23, n.3, 451-471, 2009.

BRITO, M. et al. Anatomia foliar de *Croton linearifolius* Mull. Arg. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 13, p.77-83, 2011.

CARVALHO, V. F. et al. *In vitro* anthelmintic activity of *Siparuna guianensis* extract and essential oil against *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. e50, Apr. 2020.

CONCEIÇÃO, L. O.; AOYAMA, E. M. Leaf anatomy and histochemistry of species known as stonebreaker (*Euphorbia prostrata* Aiton, *Euphorbia hyssopifolia* L., *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn, and *Phyllanthus tenellus* Roxb.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 571-581, 2016.

DUARTE, M. R.; DRANKA, E. R. K.; YANO, M. Microscopic analysis of the leaf of west indian elm (*Guazuma ulmifolia* Lam., Malvaceae), **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 12, n. 2, p.7-17, jul./dez. 2011.

FERREIRA, R. M. dos A. et al. Nano-emulsification enhances the larvicidal potential of the essential oil of *Siparuna guianensis* (Laurales: Siparunaceae) Against *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 3, p. 788-796, May 2020.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical Analyses of Laticifers and Glandular Trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 44, 2, p.153-159, 1981.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson, 1968, 113 p.

GAVILANES, M. L. et al. Leaf structure of *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae) in a savannah and rupestrian field environment. **Research, Society and Development**, v. 9, p. e14991210077, 2020.

GUERREIRO, K. K. et al. Pharmacobotanical analysis of leaf and stem of *Tanacetum vulgare* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 89-95, 2016.

HALL, C. F.; MEIRELLES, J. Flora of the cangas of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Siparunaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 3spe, p.1151-1153, 2017.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. Francisco: Freeman, 1962, 408 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940, 523 p

MACE, M. E.; HOWELL, C. R.. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 52, n. 11, p.2423-2426, 1974.

MAHENDRA, C.; SUDARSHANA, M.; JAGANNATH, S. Histochemical localization of secondary metabolites *in vivo*, *in vitro* leaf and leaf derived callus of *Salacia macrosperma*

Wight. **Tropical Plant Research**, v. 8, n. 1, p. 13-21, 2021.

MARTIN, T. N. et al. Uso do software Imagej na estimativa de área foliar para a cultura do feijão. **Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América**, v. 38, n. 12, p. 843-848, Dec. 2013.

MATIAS, L. J. et al. Structure and histochemistry of medicinal species of *Solanum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 147-160, 2016.

MOURA, W. de S. et al. Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, London, v. 146, p. 112142, Apr. 2020.

NEGRI, G.; SANTI, D. de; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1024-1034, Oct. 2012.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by *toluidine blue O*. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, 368-373, 1964.

PALMA, S. et al. Design of *Peumus boldus* tablets by direct compression using a novel dry plant extract. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1, p. 191-198, 2002.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. 3 ed. The Williams & Wilkins Company: Baltimore, v. 2, 1972, 456 p.

PORTELLA, A. C. F. et al. Physical and chemical characterization of essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 844-849, 2014.

REIS, A. R. S.; SILVA, K. P. da; CHAGAS, D. R. da. Analysis of leaf surface and clustering of 10 tree species: a tool in the identification of Amazonian species. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e58810212961, 2021.

SANTOS, M. de F et al. Stomatal analysis in leaves of *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae). **Research, Society and Development**, v. 11, n.1, e17111124722, 2022.

SEGATTO, F. B. et al. A technique for the anatomical study of potato leaf epidermis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1597-1601, set./out. 2004.

SEIXAS, D. P.; PALERMO, F. H.; RODRIGUES, T. M. Leaf and stem anatomical traits of *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) emphasizing the production sites of bioactive compounds. **Flora**, v. 278, p. 151802, 2021.

SILVA, I. F.; OLIVEIRA, F. F. de; OLIVEIRA, R. A. de. *Siparuna* genus Aublet (Siparunaceae): from folk medicine to chemical composition and biological activity. **Trends in Phytochemical Research**, v. 5, n. 4, 168-189, 2021.

SILVA, J. A. C. D.; SILVA, M. F. D. Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil - II: famílias Myristicaceae, Siparunaceae e Monimiaceae. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 2, p. 207-212, 2008.

SIMÕES, M.; SOARES JÚNIOR, F. J. Anatomia foliar de *Siparuna apiosyce* (Mart. Ex Tul.) A.DC. (Siparunaceae). **Pesquisas, botânica**, São Leopoldo, n. 62, p. 371-380, 2011.

VALENTINI, C. M. A. et al. Annual variation of yield and chemical composition of volatile components of *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1506-1509, 2010.

WATTS, S.; KARIYAT, R. Morphological characterization of trichomes shows enormous variation in shape, density and dimensions across the leaves of 14 *Solanum* species. **AoB PLANTS**, v. 13, n. 6, p. 1-32, 2021.

**ARTIGO 3 - Estimativa da área foliar de *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae)
utilizando método não destrutivo**

**ARTICLE 3 - Estimation of the leaf area of *Siparuna guianensis* aubl. (Siparunaceae)
using a non-destructive method**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o
Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações**

RESUMO

A análise da área foliar é um parâmetro bastante utilizado para estimar o crescimento e desenvolvimento vegetativo, que pode ser obtido através de modelos matemáticos, sendo uma técnica eficaz, barata, rápida e não destrutiva. Objetivou-se determinar uma equação para estimar a área foliar da *Siparuna guianensis* Aubl. a partir do comprimento e/ou largura das lâminas foliares. Neste trabalho, foram utilizadas 300 folhas frescas de *S. guianensis* escaneadas e analisadas com auxílio do software *Imagej*[®] para a obtenção do comprimento, largura e a área foliar observada. A estimativa foliar foi determinada a partir de dimensões lineares através de análises das equações de regressão linear, quadrática e potencial do comprimento, largura e o produto entre estes fatores como variáveis independentes e a área foliar observada como variável dependente. Do ponto de vista prático, recomenda-se a equação matemática obtida através da regressão linear por meio da relação comprimento e largura, utilizado o modelo $Y=3,5833+0,6715x$, com coeficiente de determinação de 0,9677. Portanto, o modelo alométrico que utiliza o produto das dimensões lineares do comprimento e largura é mais adequado para estimar a área foliar não destrutiva da *S. guianensis*, uma vez que demonstra maior correlação.

Palavras chaves: Negramina. Biometria. Plantas medicinais. Regressão linear. Equações matemáticas.

ABSTRACT

The analysis of leaf area is a widely used parameter for estimating vegetative growth and development, which can be obtained through mathematical models, being an effective, cheap, fast and non-destructive technique. The objective was to determine an equation to estimate the leaf area of *Siparuna guianensis* Aubl. from the length and/or width of the leaf blades. In this work, 300 fresh leaves of *S. guianensis* were scanned and analyzed with the software Imagej® to obtain the length, width and the observed leaf area. The leaf estimate was determined from linear dimensions through analysis of linear, quadratic and potential regression equations of length, width and the product between these factors as independent variables and the observed leaf area as the dependent variable. From a practical point of view, we recommend the mathematical equation obtained through linear regression by means of the length and width relationship, using the model $Y=3.5833+0.6715x$, with a determination coefficient of 0.9677. Therefore, the allometric model that uses the product of the linear dimensions of length and width is more suitable for estimating the non-destructive leaf area of *S. guianensis*, since it shows greater correlation.

Keywords: Negramina. Biometry. Medicinal plants. Linear regression. Mathematical equations.

1. INTRODUÇÃO

Siparuna guianensis Aubl. é uma planta aromática pertencente à família Siparunaceae, popularmente conhecida como “capitiú”, “negramina” e “limão-bravo”. Esta espécie vegetal encontra-se geograficamente distribuída no Brasil nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, localizando-se na região Sul somente no Paraná (FERREIRA et al., 2017; PEIXOTO; LIRIO; PIGNAL, 2020; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

As folhas de *Siparuna guianensis* são comumente utilizadas na medicina popular como, carminativas, antitérmicas, analgésicas, antigripais e anti-inflamatórias, sendo também usadas como estimulantes, em distúrbios estomacais, pressão alta, dores reumáticas e cólicas (CONGUNDDES et al., 2021; FACUNDO et al., 2012; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010).

Considerando-se a importância da *Siparuna guianensis* na medicina tradicional, e na recuperação ambiental (AMARAL et al., 2017; BRAGA; BORGES; MARTINS, 2015; COUTINHO et al., 2019; VALENTINI; RODRÍGUEZ-ORTÍZ; COELHO, 2010) e à escassez de trabalhos científicos com esta espécie, a necessidade de estudos básicos envolvendo a relação na exigência nutricional, reprodução, crescimento, desenvolvimento, produção vegetal e sistema de defesa contra patógenos, estas análises básicas estão relacionadas a área foliar.

Neste sentido, o conhecimento da área foliar de espécies vegetais com propriedades medicinais é importante para obter diversas informações sobre a planta. Sendo assim, a área foliar é um parâmetro relevante na avaliação do crescimento vegetal podendo ser possível analisar o crescimento, desenvolvimento, eficiência fotossintética e a produtividade além de permitir estimar a área foliar da planta em diferentes épocas do ano (BIANCO; PITELLI; CARVALHO, 2002; CARVALHO; BIANCO; BIANCO, 2011; GOERGEN et al., 2021).

Entretanto, a área foliar é um parâmetro que apresenta certo grau de dificuldade de ser obtida, pois normalmente, necessita de equipamentos que nem sempre são encontrados em laboratórios de pesquisa (tais como: integrador manual de área foliar e paquímetro digital de precisão), ou utilizam-se métodos destrutivos. Além disso, técnicas empregando imagens a partir de escaneamentos e/ou fotografias das folhas, e software para calcular a área podem constituir um modelo experimental mais prático, pois as medições lineares de folhas apresentam menor custo, boa precisão, de fácil e rápida execução (BIANCO; PITELLI; CARVALHO, 2002; CARVALHO; BIANCO; BIANCO, 2011; CANDIDO et al., 2013; LEITE et al., 2021). Outra vantagem desta técnica é que a amostragem pode ser executada na mesma planta ao longo do seu desenvolvimento vegetativo, reduzindo assim o erro experimental (GOERGEN et al.,

2021).

Uma alternativa para obter o valor da área foliar de maneira não destrutiva é através da utilização de equações matemáticas que possibilitam estimar por meio de parâmetros de medição da folha que exibem correlações com a superfície foliar da planta. Esta técnica pode ser realizada utilizando-se equações de regressão da área foliar real e das medidas lineares das folhas, como comprimento (C), largura (L) e sua combinação (CxL) (CASTRO et al., 2021; TOFOLI et al., 1998). Para o desenvolvimento deste modelo alométrico, é necessário inicialmente coletar folhas da planta (método destrutivo) para determinar a área dessas estruturas através de processamento de imagens. Entretanto, depois da criação da equação matemática, o modelo pode ser empregado para determinar a área por meio da técnica não destrutiva, visto que medidas lineares podem ser obtidas diretamente das folhas (MACÁRIO et al., 2020).

Essa análise não destrutiva já foi utilizada com sucesso para outras plantas medicinais, como *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae), *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae), *Turnera subulata* Sm. (Passifloraceae), *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae), *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae), *Talinum fruticosum* (L.) Juss. (Sin. *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd (Talinaceae), *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn., *Plectranthus ornatus* Codd (Lamiaceae), *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (Lamiaceae), *Cissampelos glaberrima* A. St.-Hil. (Menispermaceae), *Bauhinia monandra* Kurz (Fabaceae: Cercidoideae), *Myrcia variabilis* DC. (Myrtaceae) e de espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) – *P. alata* Curtis, *P. cristalina* Vanderpl. & Zappi, *P. edulis* Sims, *P. foetida* L., *P. suberosa* L., e *P. morifolia* Mast. (CANDIDO et al., 2013; CASTRO et al., 2021; SILVA et al., 2018; GOERGEN et al., 2021; MACÁRIO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019; SILVA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2020; BISPO et al., 2017; BIANCO; PITELLI; CARVALHO, 2002; SCHMILDT et al., 2016; SALIMENA et al., 2021). No entanto, não foram encontrados na literatura estudos que envolvam este modelo matemático para estimar a área foliar da espécie *Siparuna guianensis*.

Desta forma, objetivou-se validar e indicar uma equação matemática para estimar a área foliar de *Siparuna guianensis* de maneira não destrutiva em função de parâmetros dimensionáveis do comprimento (C), largura (L) e a relação entre estes fatores (CxL).

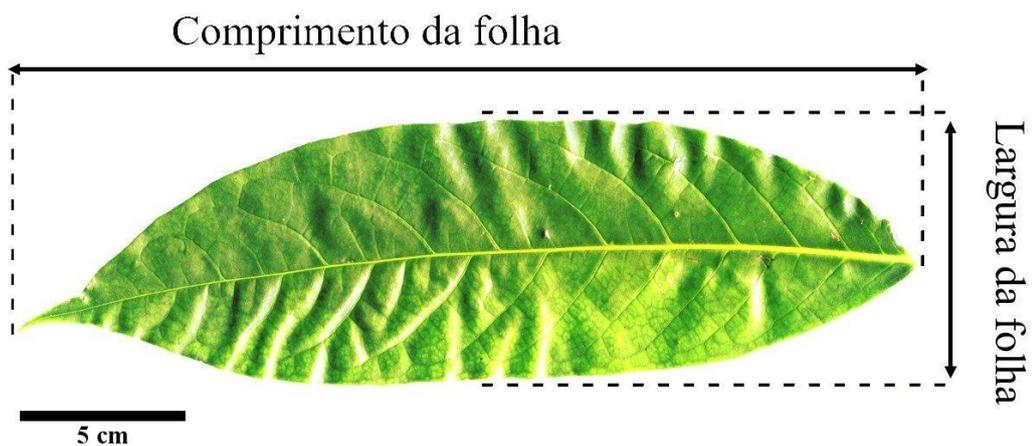
2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com folhas de *Siparuna guianensis* (registro da exsicata – 58647 - Herbário PAMG) coletadas no dia 28 de janeiro 2019 em Remanescente de Floresta Estacional Semidecidual localizado na Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais Brasil (21°

13° 48.8' S; 44° 58' 28.5' W). Foram coletadas 300 folhas inteiras de dez espécimes (FIGURA 1) obtidas do quarto e quinto nó de ramos plenamente desenvolvidos que não apresentavam danos ou ataques de doenças ou pragas. Em laboratório, foram realizadas as medidas lineares: comprimento (C) e largura (L) das lâminas foliares (excetuando o pecíolo), a partir de imagens escaneadas.

Para a obtenção dos dados C e L as lâminas foliares da *Siparuna guianensis* foram escaneadas em scanner de mesa (Scanner A4 CanoScan LiDE 300) (SALIMENA et al., 2021) onde foi obtido a integração da área; as imagens obtidas foram analisadas usando-se o Software *Imagej*® (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) (MARTIN et al., 2013), para a determinação das medidas lineares: comprimento e largura da lâmina foliar. Após este procedimento, foi calculado o produto do comprimento pela largura (CxL) cm² (RIBEIRO; BARBOSA; ALBUQUERQUE, 2018).

Figura 1 - Imagem escaneada da folha de *Siparuna guianensis* demonstrado o comprimento e largura.



Fonte: Do autor (2022).

A partir dos dados C, L e CxL, foram elaborados histogramas de frequência e gráficos de dispersão (n=300) utilizando-se de regressões: linear ($Y = a + bx$), quadrática ($Y = a + bx + cx^2$) e potencial ($Y = ax^b$) para determinação da área foliar estimada (AFE), utilizando o comprimento, a largura e o produto do comprimento pela largura como variável independente, e a área foliar observada (AFO) como variável dependente (CARGNELUTTI FILHO et al, 2012).

Através da C, L, CxL e AFO das 300 lâminas foliares, realizou-se uma análise descritiva dos dados calculando-se os valores: mínimo, máximo, amplitude, média, mediana e coeficiente

de variação para cada variável determinada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As lâminas foliares de *Siparuna guianensis*, exceto a região do pecíolo, apresentaram comprimento médio de 18,49 cm, largura de 6,67 cm e área foliar igual a 88,76 cm² (TABELA 1). Das 300 folhas analisadas observou-se uma variação no comprimento entre 5,17 a 29,07 cm, largura 3,68 a 10,32 cm e na área foliar observada (AFO) 34,5 a 196,32 cm². Foram verificados altos valores no coeficiente de variação (CV) para C, L, CxL e AFO. O aumento do CV é a resposta da diversidade em relação aos tamanhos das folhas, quando maior a variabilidade dos resultados da amplitude total, desvio padrão e CV melhor será a representação dos modelos matemáticos, deste modo permitirá a aplicação em diferentes estádios de crescimento da espécie estudada (CASTRO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020).

Tabela 1 - Valores mínimo, máximo, amplitude, média, mediana e coeficiente de variação (CV), do comprimento (C), da largura (L), do produto comprimento vezes largura (C×L) e da área foliar observada (AFO) de 300 folhas de *Siparuna guianensis*

Estatística	C (cm)	L (cm)	CxL (cm ²)	AFO (cm ²)
Mínimo	5,17	3,68	19,02	34,50
Máximo	29,07	10,32	283,71	196,32
Amplitude	23,90	6,64	264,69	161,82
Média	18,49	6,67	126,84	88,76
Mediana	18,24	6,67	120,73	85,64
CV(%)	20	18	36	35

Fonte: Do autor (2022).

A partir dos modelos matemáticos apresentados na Tabela 2, verifica-se que o valor do coeficiente de determinação (R²) variou entre 0,7715 a 0,9677, onde o menor valor de R² corresponde ao modelo potência da variável independente C e o maior valor observado de R² foi do modelo linear da variável independente CxL (0,9677).

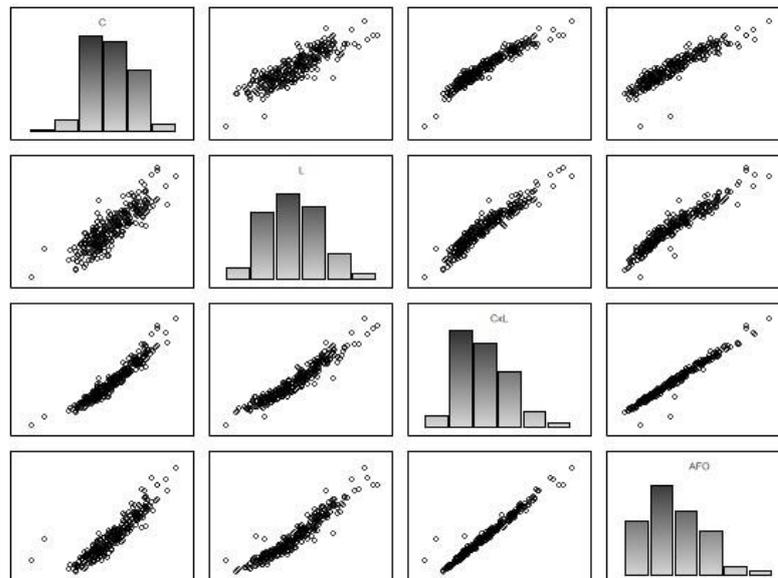
Tabela 2 - Equações para a determinação da área foliar por fotos digitais (Y), utilizando o comprimento (C), a largura (L) e o produto comprimento vezes largura (C×L) como variáveis independentes (x) e coeficiente de determinação, com base em 300 folhas de *Siparuna guianensis*

Modelo	Variável independente (x)	Equação	Coefficiente de determinação (R ²)
1) Linear	C	$Y = -56,494 + 7,8579x$	0,8512
2) Linear	L	$Y = -78,491 + 25,086x$	0,9098
3) Linear	C x L	$Y = 3,5833 + 0,6715x$	0,9677
4) Quadrática	C	$Y = 56,022 - 4,7138x + 0,338x^2$	0,8925
5) Quadrática	L	$Y = -2,0464 + 1,9753x + 1,6943x^2$	0,9199
6) Quadrática	C x L	$Y = 10,199 + 0,5654x + 0,0004x^2$	0,9688
7) Potência	C	$Y = 1,1798x^{1,4711}$	0,7715
8) Potência	L	$Y = 2,4716x^{1,8714}$	0,9123
9) Potência	C x L	$Y = 1,1448x^{0,8981}$	0,9088

Fonte: Do autor (2022).

As equações que possibilitaram determinar a área estimada foliar, a partir do R² superior a 0,95, foram a regressão linear e quadrática utilizado CxL das folhas de *Siparuna guianensis*. Este resultado pode ser explicado no histograma (Figura 2) devido à alta correlação.

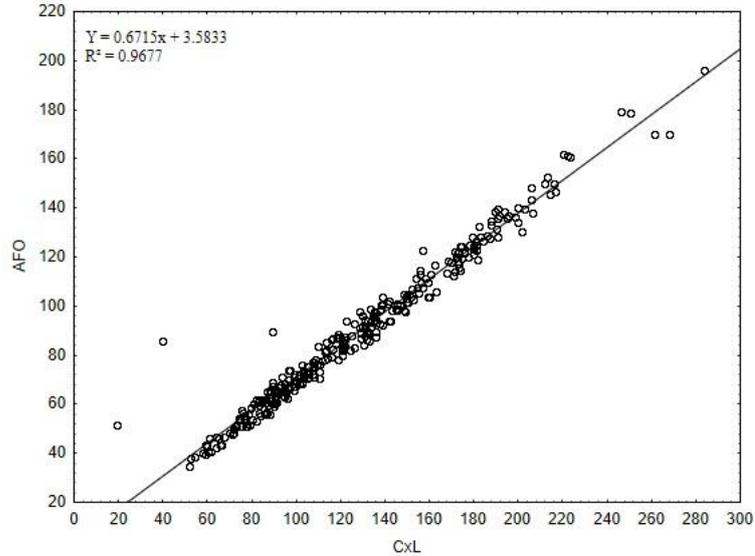
Figura 2 - Matriz com o histograma de frequência (na diagonal) e gráficos de dispersão entre o comprimento (C), em cm, a largura (L), em cm, o produto comprimento x largura (CxL), em cm² e a área foliar observada (AFO), em cm² de 300 folhas de *Siparuna guianensis*.



Fonte: Do autor (2022).

A partir das equações matemáticas, o modelo que melhor se ajusta para estimar a área foliar da espécie *Siparuna guianensis* foi o modelo de regressão linear ($Y = 3,5833 + 0,6715x$) com R² de 0,9677 (FIGURA 3).

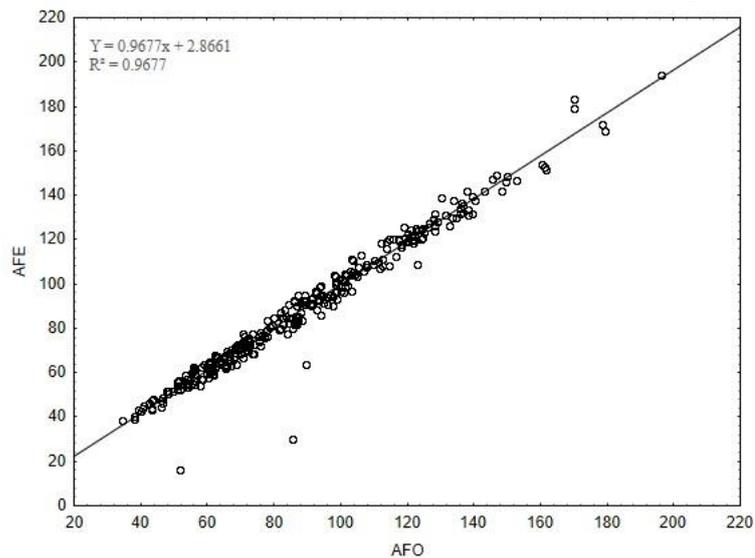
Figura 3 - Modelo linear, da área foliar determinada por fotos digitais (em cm^2) em função do produto comprimento x largura (em cm^2), com base em 300 folhas de *Siparuna guianensis*.



Fonte: Do autor (2022).

Ressaltar que as dispersões dos dados foram mínimas, observando o valor de R^2 semelhante (0,9677) para o gráfico linear entre AFO e o produto CxL e AFE e CxL (Figura 4), o que demonstra que a equação é recomendável para retratar de maneira mais satisfatória a área foliar real. Portanto, o modelo proposto foi validado para a espécie *S. guianensis* como apresentado na Figura 4, onde se comparam os valores de AFE e AFO apresentado um R^2 de 0,9677.

Figura 4 - Relação entre os valores de área foliar observada (cm^2) (determinada) por meio do método de fotos digitais e a área foliar estimada em função do comprimento x largura (cm^2), através do modelo linear, em 300 folhas de *Siparuna guianensis*.



Fonte: Do autor (2022).

Diferentes autores verificaram que a aplicação de modelos matemáticos envolvendo o produto entre CxL se tornam a melhor equação para analisar a área foliar como modelo não destrutivo, sendo verificado na espécie *Turnera subulata* Sm. (Passifloraceae) ($R^2=0,99$) (CASTRO et al., 2021), *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) ($R^2=0,99$) (GOERGEN et al., 2021), *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) ($R^2=0,941$) (HOLGUÍN et al., 2019), *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (Lamiaceae) ($R^2=0,9971$) (RIBEIRO et al., 2020), *Erythroxylum simonis* Plowman (Erythroxylaceae) ($R^2=0,9936$) (RIBEIRO; BARBOSA; ALBUQUERQUE, 2018), *Pouteria caimito* (Ruiz & Pav.) Radlk. (Sapotaceae) ($R^2=0,84$) (SILVA et al., 2014), *Bauhinia monandra* Kurz (Fabaceae) ($R^2=0,9967$) (SCHILDT et al., 2016), *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg (Brassicaceae) ($R^2=0,9862$) (CARGNELUTTI FILHO et al., 2012) e *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) ($R^2=0,9526$) (CANDIDO et al., 2013).

Esta seleção pelo CxL deve-se ao maior número de informações das dimensões foliares, considerando até mesmo o efeito da variação métrica do comprimento e largura, decorrendo que a folha é uma estrutura vegetal altamente plástica, mostrando diferença nas suas proporções em resposta ao local onde se encontra (BOEGER; BIU; GOLDENBERG, 2009; OLIVEIRA et al., 2019).

4. CONCLUSÃO

A área foliar de *Siparuna guianensis* pode ser determinada de maneira simples e precisa por meio do modelo matemático linear $Y=3,5833+0,6715x$ através do produto do CxL, com coeficiente de determinação de 0,97. Com isto, o presente trabalho colabora de forma significativa para o estudo da espécie *Siparuna guianensis*, pois não se faz mais necessário realizar a coleta das folhas para realizar a estimativa da área foliar, empregando os métodos destrutivos. Além do mais, o modelo linear apresentou um bom ajuste, sendo uma ferramenta ideal e confiável para estimar a área foliar desta espécie.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA)

pela bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. A. et al. Use of topsoil for restoration of a degraded pasture área. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 11, p. 1080-1090, 2017.
- BIANCO, S.; PITELLI, R. A.; CARVALHO, L. B. Estimativa da área foliar de *Cissampelos glaberrima* usando dimensões lineares do limbo foliar. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 20, n. 3, p. 353-356, 2002.
- BISPO, R. B. et al. Comparação entre métodos na estimativa da área foliar de *Passifloras* ssp (*Passifloraceae*). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.14, n.25, p.334-343, 2017.
- BOEGER, M. R. T.; BIUZ, C.; GOLDENBERG, R. Arquitetura foliar comparativa de *Miconia sellowiana* (DC.) Naudin (*Melastomataceae*) em diferentes fitofisionomias no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v.23, n.3, p.657-665, set. 2009.
- BRAGA, A. J. T.; BORGES, E. E. de L. e; MARTINS, S. V. Influência dos fatores edáficos na variação florística de floresta estacional semidecidual, em Viçosa, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 623-633, 2015.
- CANDIDO, W. dos S. et al. Modelo para estimar a área foliar de *Combretum leprosum* Mart. **Acta agrônômica**, v. 62, n. 1, p.37-41, 2013.
- CARGNELUTTI FILHO, A. et al. Estimativa da área foliar de nabo forrageiro em função de dimensões foliares. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 1, p.47-51, 2012.
- CARVALHO, L. B.; BIANCO, M. S.; BIANCO, S. Estimativa da área foliar de *Synedrellopsis grisebachii* usando método não destrutivo. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 29, p. 1023-1027, 2011.
- CASTRO, A. Q. et al. Método não destrutivo para determinação da área foliar de *Turnera subulata*. **Revista Ifes Ciência**, v. 7, n.1, p.1-9, 2021.
- CONEGUNDES, J. L. M. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Siparuna guianensis* Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113344, Jan.2021.
- COUTINHO, P. R. de O. dos S. et al. Restauração passiva em pastagens abandonadas a partir de núcleos de vegetação na Mata Atlântica, Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, n.3, p. 1307-1323, jul./set. 2019.
- FACUNDO, V. A. et al. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1134-1139, Sept./Oct. 2012. doi:
- FERREIRA, T. P. et al. Potential use of Negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) essential oil to control wax moths and its selectivity in relation to honey bees. **Industrial Crops and**

Products, v. 109, p. 151-157, Dec. 2017.

GOERGEN, P.C.H. et al. Allometric relationship and leaf area modeling estimation on chia by non-destructive method. **Brazilian Journal of Agricultural and Environmental Engineering**, Campina Grande, v. 25, n.5, p.305-311, May. 2021.

HOLGUÍN, V. A. et al. Estimation of leaf area of *tithonia diversifolia* using allometric equations. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.22, p. 231-238, 2019.

LEITE, M. L. de M. et al. Comparison of methods for estimating leaf area in pornuça (*Manihot* sp.). **Brazilian Journal of Agricultural and Environmental Engineering**, v. 25, n.11, p.733-740, 2021.

MACÁRIO, A. P. S. et al. Allometric models for estimating *Moringa oleifera* leaflets area. **Ciência e Agrotecnologia**, v.44, p. e005220, 2020.

MARTIN, T. N. et al. Uso do software Image J na estimativa de área foliar para a cultura do feijão. **Interciencia**, v. 38, n. 12, p.843-848, Dec. 2013.

OLIVEIRA, R. F. et al. Utilização de modelos alométricos para estimar a área foliar de *Talinum triangulare* e *Talinum paniculatum*. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.9, n.1, p.112-119, mar. 2019.

PEIXOTO, A. L.; LIRIO, E. J.; PIGNAL, M. **Siparunaceae in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em:
<<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14548>>. Acesso em: 16 nov. 2021

RIBEIRO, J. E. da S.; BARBOSA, A. J. S.; ALBUQUERQUE, M. B. de. Leaf area estimate of *Erythroxylum simonis* plowman by linear dimensions. **Revista Floresta e Ambiente**, v. 25, n.2, p. e20170108, 2018.

RIBEIRO, J. E. da S. et al. Estimativa da área foliar de *Mesosphaerum suaveolens* a partir de relações alométricas. **Rodriguésia**, v. 71, p. e02952018, 2020.

SALIMENA, J. P. et al. Modelo matemático para estimativa da área foliar de *Myrcia variabilis* (Myrtaceae). **Recima21 – Revista Científica Multidisciplinar**, v.2, n. 10, p. e210814, 2021.

SCHMILDT, E. R. et al. Modelos alométricos na determinação da área foliar de *Bauhinia monandra* Kurz. **Comunicata Scientiae**, v. 7, n.3, p. 415-419, 2016.

SILVA, J. R. de et al. Estimativa da área foliar da camomila com o uso do IMAGEJ. **Revista da jornada da pós-graduação e pesquisa – Congrega**, v.15, n.15, p.1141-1150, 2018.

SILVA, S. F. da et al. Estimativas da área foliar de abieiros (*Pouteria caimito*) por meio de modelos alométricos. **Agrarian academy**, Goiânia, v. 1, n. 1, p.202-209, 2014.

SILVA, S. F. da et al. Modelos alométricos para estimativa da área foliar de boldo pelo método não destrutivo. **Revista Agrarian**, v.10, n.37, p.193-198, 2017.

VALENTINI, C.M.A.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C.E.; COELHO, M.F.B. *Siparuna guianensis* Aublet ("negramina"): a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n.1, p. 96-104, 2010.

TOFOLI, G. R. et al. Estimativa da área foliar de plantas daninhas: *Solanum americanum* Mill. **Planta Daninha**, Viçosa, v.16, n. 2, p. 149-152, 1998.

ARTIGO 4 - Efeito anti-inflamatório, antioxidante, anti-apoptótico e embriotoxidade de extratos foliares de *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae) em zebrafish (*Danio rerio*).

ARTICLE 4 - Anti-inflammatory, antioxidant, anti-apoptotic and embryotoxic effects of leaf extracts of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae) in zebrafish (*Danio rerio*).

RESUMO

Siparuna guianensis Aublet (Siparunaceae) é uma planta aromática, conhecida popularmente como negramina. Suas folhas são utilizadas tradicionalmente no tratamento de diversas enfermidades, como anti-inflamatória, antiflatulenta, analgésica e antipirética. Objetivou-se com essa pesquisa investigar a toxicidade, potencial anti-inflamatório, regeneração da nadadeira caudal, atividade das enzimas antioxidantes e efeito antioxidante *in vitro* dos extratos aquoso, hidroetanólico e metanólico das folhas *S. guianensis* em embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*). A partir das folhas foram elaborados três tipos de extratos empregados diferentes solventes sendo, metanol (EM), álcool etílico 70° (EH) e água destilada (EA). Os principais compostos presentes nos extratos foram determinados usando análise HPLC e foi realizado o ensaio para identificar o índice de atividade antioxidante (IAA). A toxicidade e teratogenicidade foram investigadas usando o modelo zebrafish. Embriões de zebrafish foram tratados com concentrações entre 0,08 a 10mg/ml dos extratos durante um período de 120 horas, sendo avaliadas à mortalidade, taxa de eclosão e malformações. As concentrações não letais e teratogênicas foram utilizadas para a realização das análises de migração de neutrófilos; regeneração da nadadeira caudal; apoptose celular e atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST). Foram identificadas nos extratos a presença de compostos fenólicos e alto IAA (EA: 6,37 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; EH: 4,34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e EM: 2,39 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). O EA foi tóxico nas concentrações de 2,5 a 10mg/ml e o EH e EM entre 0,62 a 10mg/ml. As larvas tratadas com EA não exibiram malformações. Todos os extratos testados demonstram potencial anti-inflamatório reduzindo a migração do número de neutrófilos, no entanto não apresentam bom desempenho na regeneração da nadadeira lesionada. Os extratos não influenciaram na atividade da SOD e CAT. EA não induziu células apoptóticas ao contrário dos EH e EM. Os EA, EH e EM das folhas de *S. guianensis* demonstraram a presença de compostos fenólicos, atividade anti-inflamatório e alto IAA antioxidante, no entanto somente o EA devido sua baixa toxicidade e ausência de teratogenicidade apresenta potencial uso terapêutico.

Palavras-chave: Neutrófilos. Negramina. DPPH. Laranja de acridina.

ABSTRACT

Siparuna guianensis Aublet (Siparunaceae) is an aromatic plant, popularly known as negramina. Its leaves are traditionally used in the treatment of various diseases, as an anti-inflammatory, antifatulent, analgesic and antipyretic. This research aimed to investigate the toxicity, anti-inflammatory potential, caudal fin regeneration, antioxidant enzyme activity, and in vitro antioxidant effect of aqueous, hydroethanolic, and methanolic extracts of *S. guianensis* leaves on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Three types of extracts were prepared from the leaves using different solvents, methanol (MS), ethyl alcohol 70° (EH) and distilled water (EA). The main compounds present in the extracts were determined using HPLC analysis and assay was performed to identify the antioxidant activity index (AAI). Toxicity and teratogenicity were investigated using the zebrafish model. Zebrafish embryos were treated with concentrations between 0.08 and 10mg/ml of the extracts over a period of 120 hours, and mortality, hatching rate, and malformations were evaluated. The non-lethal and teratogenic concentrations were used to perform analyses of neutrophil migration; tail fin regeneration; cell apoptosis and activity of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST). Phenolic compounds and high IAA were identified in the extracts (EA: 6.37 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; EH: 4.34 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and EM: 2.39 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). EA was toxic at concentrations of 2.5 to 10mg/ml and EH and EM between 0.62 to 10mg/ml. The larvae treated with EA did not exhibit malformations. All tested extracts show anti-inflammatory potential by reducing the migration of neutrophil numbers, however they do not show good performance in regenerating the injured fin. The extracts did not influence SOD and CAT activity. EA did not induce apoptotic cells unlike EH and EM. EA, HE and MS from *S. guianensis* leaves demonstrated the presence of phenolic compounds, anti-inflammatory activity and high antioxidant AAI, however only EA due to its low toxicity and absence of teratogenicity presents potential therapeutic use.

Keywords: Neutrophils. Negramina. DPPH. Acridine orange.

1. INTRODUÇÃO

Siparuna guianensis Aublet é uma planta aromática pertencente à família Siparunaceae popularmente conhecida como “capitiú”, “negramina”, “catingueira-de-paca”, “erva-santa”, “limão-bravo”, “folha-santa”, e “cicatrizante-das-guianas”, sendo localizada desde a Nicarágua, América do Sul até o Paraguai; no Brasil esta espécie é encontrada em diferentes domínios fitogeográficos como na Mata Atlântica, Amazônia, Caatinga e no Cerrado (SANTOS et al., 2022; VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTIZ; COELHO, 2010).

Esta espécie possui várias indicações etnobotânicas/etnofarmacológicas, sendo suas folhas utilizadas como antiflatulento, estimulante, diurética, antipirético, anti-inflamatório, antimalária e sinusite, também é utilizada em picada de cobra, inseticida, repelente, isca para peixe e no combate ao piolho de galinha (ALMEIDA et al., 2021; CARVALHO et al., 2020; CONEGUNDES et al., 2021; FACUNDO et al., 2012; FERREIRA et al., 2020; MOURA et al., 2020; VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTIZ; COELHO, 2010). Estudos químicos revelaram a presença de alcaloides, flavonoides, taninos, cumarina e compostos fenólicos nas folhas de *Siparuna guianensis* (BRAZ FILHO et al., 1976; CARVALHO et al., 2020; CONEGUNDES et al., 2021; FACUNDO et al., 2012; NEGRI; SANTI; TABACH, 2012; THOMÉ et al., 2012). Apesar de suas aplicações terapêuticas, são limitadas as pesquisas científicas *in vivo* com as folhas desta espécie, para a comprovação dos seus efeitos e possível toxicidade.

Existem várias metodologias empregando modelos animais para analisar a veracidade terapêutica das plantas medicinais, exemplo o peixe zebrafish (*Danio rerio*) (CHAHARDEHI; ARSAD; LIM, 2020). O zebrafish é um animal pequeno de água doce que exhibe vantagens da sua utilização na pesquisa científica. Apresenta semelhança fisiológica com os mamíferos, exhibe o genoma totalmente sequenciado, fecundação externa com embriões translúcidos e todas as suas fases de vida são utilizadas em diferentes análises (HE et al., 2020; HENRY et al., 2013; TEAME et al., 2019; XIONG et al., 2019; YANG et al., 2018). Diversos trabalhos já foram realizados utilizando o zebrafish como modelo experimental em investigação empregando as plantas medicinais, como por exemplo em análise de angiogênese (BREETA et al., 2018; FAROOQ et al., 2020), antioxidante (HACKE et al., 2021; XIONG et al., 2019) toxicidade (GANGULY et al., 2020; KHAN et al., 2021; XIA et al., 2017ab) regeneração de cauda (ABIDIN et al., 2020) apoptose celular (KHAN et al., 2021; KIM et al., 2014; XIA et al., 2017ab) e anti-inflamatório (EKAMBARAM; PERUMAL; PAVADAI, 2017; LI et al., 2018; POLEDNIK; KOCH; FELZIEN, 2018; XIONG et al., 2019).

Este trabalho objetivou-se avaliar o índice de atividade antioxidante, identificação dos

compostos fenólicos, toxicidade, potencial anti-inflamatória, regeneração da nadadeira caudal e a atividade das enzimas antioxidantes, em embriões e larvas de zebrafish tratados com os extratos aquoso, hidroetanólico e metanólico das folhas de *Siparuna guianensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Declaração de ética

O experimento foi realizado na Ala de Peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. O projeto foi aprovado e protocolado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo nº 023/19 e todo manejo do zebrafish foi determinado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2. Obtenção do material vegetal

As folhas de *Siparuna guianensis* registro da exsicata – PAMG 58647 (Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais – EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) foram coletas no período da manhã em um Remanescente de Floresta Estacional Semidecidual localizado no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura – DAG da Escola de Ciências Agrárias - ESAL da Universidade Federal de Lavras -UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil (21° 13' 48.8" S; 44° 58' 28.5" W).

2.3. Preparo do extrato

Inicialmente, as folhas foram secas a 35-40°C por dois dias, em estufa de circulação de ar para à realização dos extratos hidroetanólico (EH), metanólico (EM) e aquoso (EA) à 10% (p/v). Os extratos hidroetanólico (30% de água destilada e 70% de etanol) e aquoso (água destilada) foram preparados a partir da utilização banho ultrassônico (UltraCleaner 1600A) por 40 min a 25°C (SPEROTTO et al., 2018). O material vegetal seco foi submetido à extração por maceração estática com metanol (MeOH), por sete dias. Em seguida, os extratos obtidos por diferentes solventes foram filtrados a vácuo e concentrados em evaporador rotatório a 50°C, sob pressão reduzida, até resíduo.

2.4. Perfil de compostos fenólicos

2.4.1 Obtenção do extrato para determinação do perfil de compostos fenólicos

O preparo dos extratos para identificação de compostos fenólicos por cromatografia foi realizado conforme a metodologia descrita por Cunha et al. (2021) com modificação. Foram utilizados 0,1g das amostras rotaevaporadas dos extratos (EA, EH e EM), homogeneizadas em 20 mL de metanol grau HPLC 70% (v/v), durante 20 min em banho ultrassônico (UltraCleaner 1600A), à temperatura ambiente. Os extratos foram centrifugados a 1500 rpm (25.406,55g) durante 15 minutos à 4°C e filtrado em papel de filtro com porosidade 14µm. Para a injeção das amostras, os extratos foram novamente filtrados utilizando-se filtros de membrana porosa com 0,45 µm.

2.4.2 Determinação do perfil do composto fenólico

A quantificação e identificação dos compostos fenólicos foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD/UV-Vis) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com quatro bombas de alta pressão (modelo LC-20AT), com um detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), degaseificador (modelo DGU-20A5), interface de CBM-20A, forno CTO-20AC e amostrador automático (modelo SIL-20A). As separações foram realizadas usando uma coluna Shimadzu Shim-pack ODS GVP-C18 (4,6 x 250 mm, 5 mm) ligada a uma pré-coluna (Shimadzu-pack ODS GVP-C18, 4,6 x 10 mm, 5µm). A fase móvel consistiu de 2% (v/v) de ácido acético em água deionizada (Fase móvel A) e 70:28:2 (v/v) de metanol/água/ácido acético (Fase móvel B), a uma taxa de fluxo de 1,0mL.min⁻¹ com um programa de eluição de gradiente e tempo de execução de 65 minutos. O volume de injeção foi de 20µL. As análises foram realizadas a 15°C. Os compostos fenólicos foram detectados a 280nm. As soluções padrão foram diluídas em metanol e as curvas de calibração foram obtidas a partir de injeções de dez concentrações diferentes, em duplicata. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os padrões (ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferulico, vanilina, ácido tans-cinâmico, ácido m-cumárico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico e resveratrol). Os resultados foram expressos em mg do composto fenólico/100g da amostra (CUNHA et al., 2021).

2.5. Índice de atividade antioxidante (IAA)

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Scherer e Godoy (2009), empregando método da atividade sequestrante de radicais utilizando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados foram avaliados seguindo os seguintes critérios: onde os extratos que apresentarem atividade antioxidante baixa quando $IAA < 0,5$; moderada quando IAA entre 0,5 e 1,0; alto quando IAA entre 1,0 e 2,0 e muito alto quando $IAA > 2,0$ (SCHERER; GODOY, 2009).

2.6. Manutenção e obtenção de embriões de zebrafish

Todos os zebrafish adultos foram acondicionados em uma rack própria para a espécie (Rack Hydrus, modelo ZEB-60, Alesco, SP, BRA). A rack com sistema de recirculação de água e controle automatizado de temperatura, pH e condutividade. Foram mantidos em cada aquário 10 peixes (5 fêmeas e 5 machos), sendo separados ambos os sexos por uma divisória de acrílico perfurada.

Durante o período experimental, os peixes foram mantidos em fotoperíodo com 14:10 horas (claro:escuro), temperatura de 28°C e alimentados três vezes ao dia, sendo duas alimentações (uma pela manhã e outra à tarde) com ração floclada para peixes ornamentais (Alcon basic, Alcon Pet[®], SC, BRA) e uma vez no intervalo com alimento vivo (náuplios de artêmia - *Artemia salina* - Artemiidae) (PAIVA et al., 2020). A higienização dos aquários e manutenção da qualidade de água foram realizadas pelo próprio sistema automatizado da rack.

No período da manhã, meia hora antes do término do período escuro os peixes eram retirados dos aquários específicos da rack e transferidos para os aquários de reprodução de acrílico conhecido como criadeiras (ZebClean, Alesco, SP, BR), permitido o contato direto entre machos e fêmeas para ocorrer a fecundação dos gametas (SPENCE et al., 2008). As criadeiras apresentavam uma placa perfurada, permitindo com que os ovos caíssem na parte inferior do aquário e assim ficassem protegidos do canibalismo. Após duas horas de acasalamento dos peixes, os peixes foram devolvidos para seus respectivos aquários na rack separado novamente os machos das fêmeas com auxílio da divisória. Os ovos foram coletados e contados utilizando uma pipeta de Pasteur e colocados em uma placa de Petri contendo meio de cultivo E3 (5mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂ e 0,33 mM MgSO₄) (VIROTE et al., 2020; ZHAO et al., 2019).

2.7. Testes de toxicidade aguda em embriões de peixes

Os ensaios de embriotoxicidades foram realizados de acordo com a diretriz da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) n.º 236: *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test* (OECD, 2013).

Para o ensaio de toxicidade aguda, foram testadas oito concentrações 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,16 e 0,08 mg/ml. Todos os extratos foram diluídos diretamente em meio de cultivo E3, somente o EM precisou ser diluído inicialmente em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) (FIGURA 1 SUPLEMENTAR). Além das concentrações foram realizados dois controles: 1º meio de cultivo E3 e 2º DMSO 1% mais meio E3 somente para o EM.

Foram utilizados 20 embriões viáveis em cada tratamento, ao quais foram adicionados em microplacas de 96 poços (1 embrião por poço). Em cada poço foi acrescentado 200µL de cada concentração testada e em seguida incubadas a 28±1°C (OECD, 2013). Os ensaios foram realizados em triplicata e a exposição das concentrações dos diferentes extratos foi de forma estática para garantir a mínima manipulação dos embriões/lavras (BASNET; GUARIENTI; MEMO, 2017).

Embriões e lavras foram observados diariamente nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120hpf (horas pós fertilização) utilizando-se microscópio de luz (Olympus, modelo CX22LED, Japão) para a verificação das anomalias morfológicas e letalidade. Foram monitoradas as seguintes características: desenvolvimento de somitos e olhos, pigmentação do olho e corpo, presença de batimentos cardíacos, deslocamento da cauda, embriões coagulados e a malformações (durante a formação do coração, no saco vitelínico, pericárdio, não descolamento de cauda, retardo de crescimento, lordose e deformidade de cauda) (OECD, 2013).

As concentrações do EA (0,08; 0,16; 0,31; 0,62 e 1,25mg/ml), EH e EM (0,08; 0,16 e 0,31mg/ml), que não apresentaram mortalidades e nem efeitos teratogênicos através do teste de toxicidade aguda em embriões de zebrafish, foram utilizadas para à análise de migração de neutrófilos, regeneração da nadadeira caudal e determinação da atividade de enzimas antioxidantes.

2.8. Atividade anti-inflamatória determinada pela migração de neutrófilos

As 8hpf foram acrescentados, em embriões cultivados em E3 0,003% de 1-fenil-2-tioureia (PTU; Sigma -Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) para bloquear a melanização. Antes de realizar a amputação da nadadeira caudal, larvas de 72hpf foram pré tratadas por 2h com as

concentrações não letais e teratogênicas do EA (0,08; 0,16; 0,31; 0,62 e 1,25mg/ml), EH e EM (0,08; 0,16 e 0,31 mg/ml), sendo utilizadas 30 larvas por tratamentos. Posteriormente, as larvas foram anestesiadas com triclaína (0,016%), em seguida com bisturi e um estereomicroscópio (Stemi 200C, Carl Zeiss, Alemanha) foram amputados os primórdios das nadadeiras caudais localizadas na região após a notocorda (HASEGAWA et al., 2017; KAWAKAMI; FUKAZAWA; TAKEDA, 2004). As larvas amputadas foram retornadas as diferentes concentrações dos extratos de pré-lesão por seis horas a 28°C (POLEDNIK; KOCH; FELZIEN, 2018).

Posteriormente, as larvas foram fixadas com paraformaldeído (4%) em *overnight*, logo depois coradas com *Sudan Black* por 20 min (LE GUYADER et al., 2008; POLEDNIK; KOCH; FELZIEN, 2018). Após este período, as larvas foram lavadas em etanol 70% e incubadas em temperatura ambiente por 15 min em solução de 1% de KOH (Hidróxido de potássio) e 1% de H₂O₂ (Peróxido de hidrogênio) para a eliminação do excesso de pigmentação (WALTERS et al., 2009). As células coradas foram observadas em estereomicroscópio, sendo realizada a contagem dos neutrófilos na área da lesão.

2.9. Teste de regeneração da nadadeira caudal de larva de zebrafish

Embriões fertilizados foram criados em meio de cultura E3 as 28°C por 72hpf. Neste período (72hpf) larvas (n=20) foram anestesiadas em triclaína 0,016%, em seguida com bisturi e um estereomicroscópio (Stemi 200C, Carl Zeiss) foram amputados os primórdios das nadadeiras caudais localizadas na região após a notocorda e foram fotografadas imediatamente pós amputação (0hpa). Posteriormente, as larvas foram colocadas em microplacas de 96 poços (1 por poço) com 200µl de diferentes concentrações do EA (0,08; 0,16; 0,31; 0,62 e 1,25mg/ml), EH e EM (0,08; 0,16 e 0,31 mg/ml), durante três dias. As 72hpa as larvas foram fotografadas novamente e a área regenerada da nadadeira caudal foi quantificada utilizado o programa *Motic Images Plus* (OPPEDAL; GOLDSMITH, 2010).

2.10. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Inicialmente, após a reprodução foram expostos 40 embriões (por replica) a diferentes concentrações do EA (0,08, 0,16, 0,31 e 0,62mg/ml), EH e EM (0,08, 0,16, 0,31 mg/ml) até as 96hpf. Posteriormente, as larvas foram colocadas em micro tubo juntamente com 400µL de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0 à frio e maceradas, sendo realizado em triplicata. Os

homogenatos foram centrifugados (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States) por 4.000 xg a 4°C por 15 min para obtenção do sobrenadante (FÉLIX et al., 2016; SANTOS et al., 2020). Para determinar as concentrações de proteínas foi utilizado o método de Bradford em 595 nm (BRADFORD, 1976), como padrão albumina de soro bovino.

2.10.2. Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi avaliada conforme o protocolo descrito por Aebi (1984). Na qual ocorre o decréscimo de absorvância a 240nm devido à degradação do H₂O₂ em oxigênio e água. A leitura da absorvância foi realizada a cada 15s por 3 min em espectrofotômetro (Tecan, Infinite 200 Pro, Suíça) e a atividade foi expressa em μmol de H₂O₂ degradado por minuto por mg de proteína.

2.10.3. Superóxido desmutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada conforme método de Beauchamp e Fridovich (1971). Para iniciar a reação, a microplaca foi colocada sob luz (400lux) por 7 min, após este período foi realizado a leitura em espectrofotômetro a 560 nm/ 25°C, sendo realizado em triplicata. A unidade de atividade de SOD (U) foi determinada como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da taxa de fotorredução do Azul de nitrotetrazólio (NBT), e o resultado foi expresso como unidades por mg de proteína.

2.10.4. Glutathione -s-transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi analisada conforme metodologia de Habig e Jakoby (1981). A ação da GST foi medida através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno que foi estimada pela variação da absorvância a 340 nm por 3 min, em espectrofotômetro. As medidas foram realizadas em triplicata e nível de atividade da GST estimado pelo coeficiente molar de $9,6 \times 10^{-3} \text{M/cm}$ em termos de conjugado de 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) produzido por minuto por mg de proteína. Os resultados foram expressos em unidade por mg de proteína.

2.11. Identificação de células apoptóticas

As células apoptóticas foram detectadas em larvas vivas usando a coloração de laranja de acridina (corante metacromático seletivo para ácido nucleico). Foram utilizadas, 15 lavras de zebrafish com 96hpf. Posteriormente as larvas foram submetidas a diferentes concentrações do EA (0,08; 0,16; 0,31; 0,62 2 1,25mg/ml), EH e EM (0,08; 0,16 e 0,31mg/ml), lavadas em meio E3, em seguida incubadas em 5µg/mL de laranja de acridina por 20min no escuro a temperatura ambiente. Após este período as larvas foram lavadas em meio E3 por três vezes durante 5 min cada. Finalmente, as larvas foram anestesiadas em tricaina (0,016%) por 3 min (XIA et al., 2017ab; ZHAO et al., 2019). As células apoptóticas foram observadas e fotografadas em microscópio estereoscópio de fluorescência (Axio Observer. Z1, Zeiss, Göttingen, Alemanha), equipado com câmera AxioCam HRc (Zeiss). Em seguida a apoptose celular foi determinada conforme a intensidade de fluorescência no software *ImageJ*. (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.12. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Posteriormente os dados foram submetidos a ANOVA a um nível de significância de 0,05. Quando observadas diferenças significativas, as médias dos tratamentos foram diferenciadas pelo teste *Tukey HSD*. Todas as análises foram realizadas com o software estatístico *Minitab* v.18 (State College, PA, EUA). Os gráficos foram gerados utilizando o programa *Graph Prism* 8.0.1. (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

3. RESULTADOS

3.1. Determinação do perfil do composto fenólico

Os resultados revelaram a presença de compostos fenólicos nos diferentes extratos obtidos das folhas da *Siparuna guianensis* (TABELA 1), sendo identificada a presença de ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferulico, vanilina, ácido trans-cinâmico, ácido m-cumárico, ácido p-cumárico e ácido o-cumárico em diferentes concentrações; não foi verificado a presença de resveratrol e catequina nas amostras. O composto fenólico com maior concentração foi o ácido trans-cinâmico, com maior predominância no EA

(48.455±2.311mg/100g), diferenciando estatisticamente dos demais extratos.

Tabela 1 - Valores de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos hidroetanólico (EH), metanólico (EM) e aquoso (EA) obtido das folhas de *Siparuna guianensis*

Compostos Fenólicos (mg.100g ⁻¹)	Amostras		
	Extrato Aquoso (EA)	Extrato Hidroetanólico (EH)	Extrato Metanólico (EM)
Ácido gálico	1.871±31,2a	1.332±275a	1.284±508a
Ácido clorogênico	6.352±3,59b	5.174±139,6c	11.941±39,3a
Ácido cafeico	1.993±228a	895±16,72b	1.127±74,9b
Vanilina	378±36,1a	156±2,68b	384±55,1a
Ácido p-cumárico	3.348±41,0a	1.980±3,26b	1.065±22,9c
Ácido ferrúlico	5.051±19,7b	10.691±103a	3.398±98,6c
Ácido m-cumárico	832±5,69a	458±0,3c	746±30,2b
Ácido o-cumárico	452±31,5a	597±42,6a	463±102,3a
Ácido trans-cinâmico	48.455±2.311a	35.308±788b	25.021±58,2c
Catequina	N.I	N.I	N.I
Resveratrol	N.I	N.I	N.I

Legenda: N.I – Não identificado. Os dados são expressos como média ± DP. Letras sobrescritas diferentes na linha indicam diferenças significativas (P <0,05) entre os grupos (n=3)

3.2. Índice de atividade antioxidante (IAA)

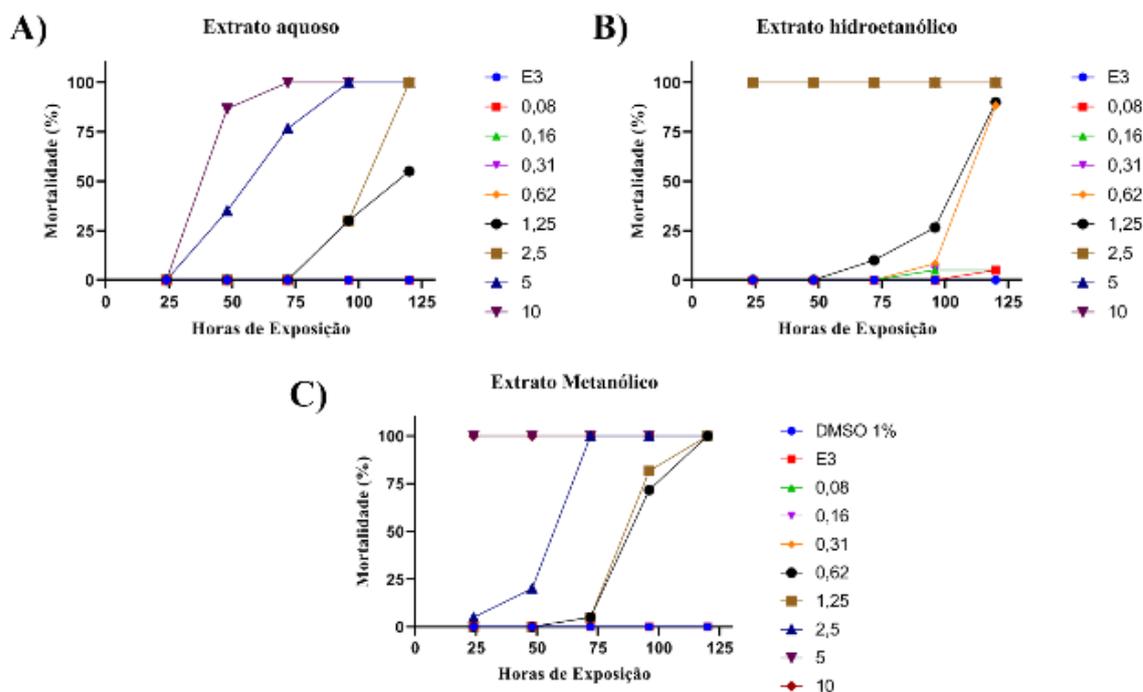
Através do IAA pode-se verificar alta atividade antioxidantes (> 2,0) para extratos foliares de *Siparuna guianensis*, onde EA apresentou IAA de 6,37µg.ml⁻¹; o EH demonstrou IAA de 4,34 µg.ml⁻¹ e o EM exibiu IAA de 2,39µg.ml⁻¹, sendo o extrato aquoso com melhor atividade antioxidante.

3.3 Testes de toxicidade aguda em embriões de peixes

Os efeitos dos extratos de *Siparuna guianensis* nas taxas de mortalidade dos embriões/larvas de zebrafish ao longo do tempo são representadas na Figura 1. No EA (FIGURA 1A) a maior taxa de letalidade foi identificada as 48hpf nas concentrações de 10 e 5mg/ml, sendo de 85% e 35% respectivamente, as 96hpf estas concentrações apresentaram 100% de mortalidades das larvas de zebrafish. No período de 120hpf a concentração 2,5mg/ml

apresentou 100% de mortalidade das larvas, enquanto a 1,25mg/ml provocou perda de 55% dos animais. A taxa de mortalidade foi maior nos EH e EM, onde as concentrações de 2,5 a 10mg/ml em 72hpf provocou 100% das mortes. O EH (FIGURA 1B) as 120hpf as concentrações de 0,6 e 1,25mg/ml provocaram letalidade em 90% dos animais analisados, ao mesmo tempo que, estas mesmas concentrações no EM (FIURA 1C) levaram a morte total neste mesmo período de avaliação.

Figura 1 - Taxa de mortalidade (%) avaliados diariamente de 24 até 120h de embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostas a diferentes concentrações do óleo essencial das folhas de *Siparuna guianensis*.

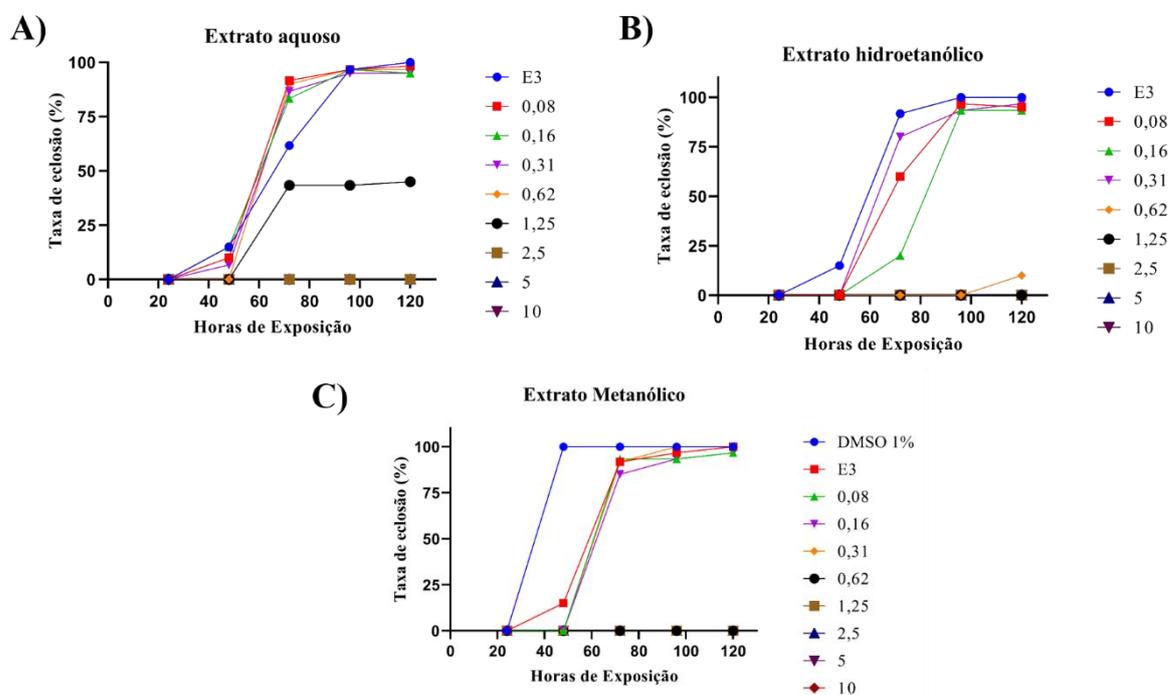


Legenda: Tempo de avaliação da exposição – 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós fertilização; concentrações dos extratos 0,08; 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 5 e 10mg/ml; controles –Meio de cultivo E3 (E3) e DMSO 1% (para o extrato metanólico). (A) extrato aquoso, (B) hidroetanólico e (c) metanólico das folhas de *Siparuna guianensis*. (n=3)

Fonte: Do autor (2021).

A taxa de eclosão dos embriões expostos aos extratos de *Siparuna guianensis* variaram ao longo do tempo (FIGURA 2), apresentando diferença entre as concentrações testadas. As 120hpf a menor taxa de eclosão foi observada na concentração de 1,25mg/ml, sendo de 45% para EA (FIGURA 2A). As menores concentrações (0,08; 0,16 e 0,31mg/ml) dos EA, EH e EM (FIGURA 2B e C) as 120hpf demonstraram em média 96% de eclosão dos embriões.

Figura 2 - Taxa de eclosão (%) de embriões/lavras de zebrafish (*Danio rerio*) expostos aos extratos aquoso, hidroetanólico e metanólico de *Siparuna guianensis* em diferentes concentrações ao longo de cinco dias.

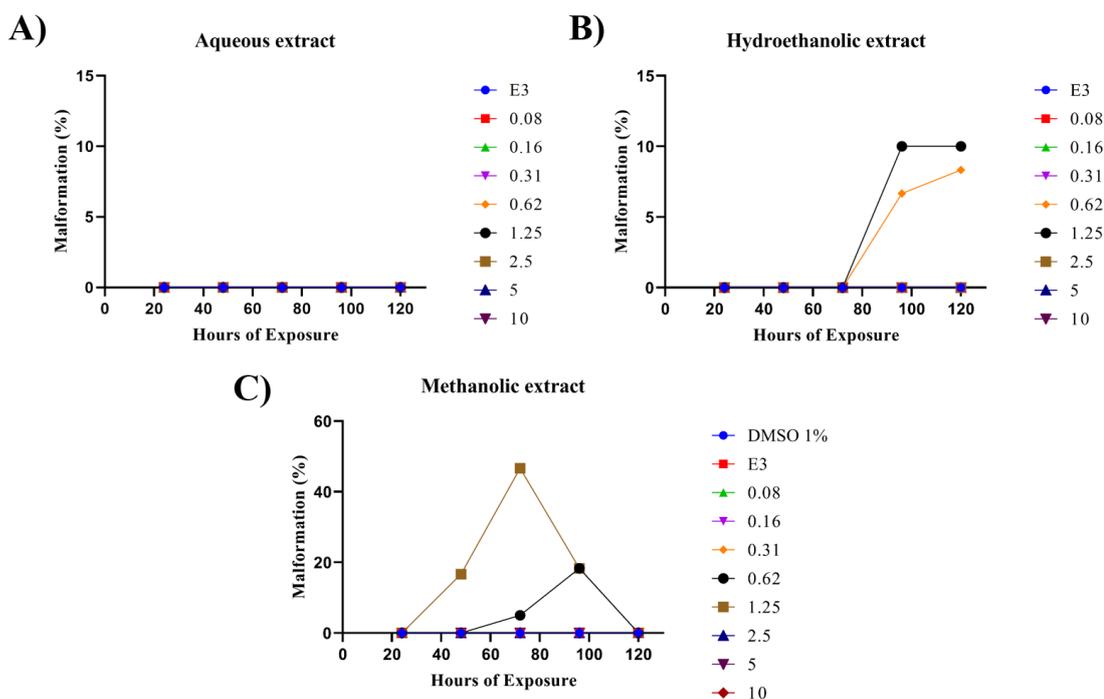


Legenda: Taxa de eclosão de embriões de embriões e/ou lavras de zebrafish (*Danio rerio*) expostos a diferentes concentrações (0,08; 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5 e 10mg/ml) do (A) extrato aquoso, (B) hidroetanólico e (c) metanólico das folhas de *Siparuna guianensis*. Controles –Meio de cultivo E3 (E3) e DMSO 1% (para o extrato metanólico) (n=3)

Fonte: Do autor (2021).

Desenvolvimento normal foi observado no EA, sem a presença de malformações (FIGURA 3A). Nos EH e EM foram verificados a ausência de anomalias morfológicas nas concentrações de 0,08; 0,16 e 0,31mg/ml (FIGURA 3B e C), foram constatados a presença de malformações como edema no pericárdio e lordose (FIGURA 4) nas concentrações de 0,62 e 1,25mg/ml destes respectivos extratos. A taxa de embriões/larvas com malformações no EM foram diminuindo ao longo do tempo devido a mortalidade destes animais, atingindo as 120hpf a morte total nas concentrações de 0,62 e 1,25mg/ml.

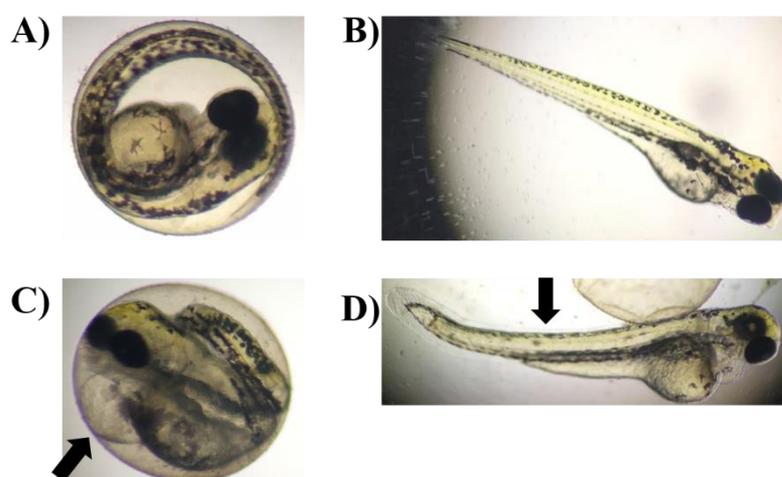
Figura 3 – Porcentagem de malformação de embriões/lavras de zebrafish (*Danio rerio*) expostos aos extratos aquoso, hidroetanólico e metanólico de *Siparuna guianensis* em diferentes concentrações ao longo de cinco dias.



Legenda: Malformação (%) de embriões e/ou lavras de zebrafish (*Danio rerio*) expostos a diferentes concentrações (0,08; 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5 e 10mg/ml) do (A) extrato aquoso, (B) hidroetanólico e (c) metanólico das folhas de *Siparuna guianensis*. Controles – Meio de cultivo E3 (E3) e DMSO 1% (para o extrato metanólico). (n=3)

Fonte: Do autor (2022).

Figura 4 - Fotomicrografias das características morfológicas avaliadas na embriotoxicidade e malformação em zebrafish expostos ao extrato metanólico de *Siparuna guianensis*.



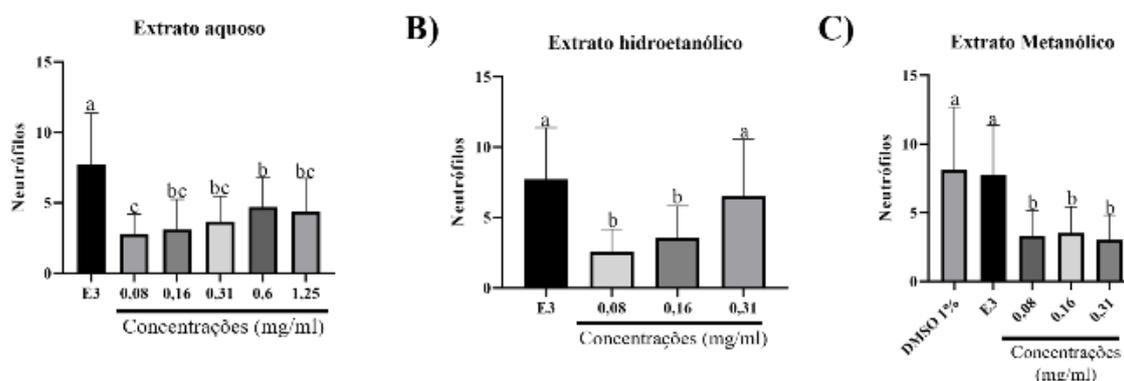
Legenda: Imagens A) Embrião exposto ao meio de cultivo E3 (E3) as 48hpf; B) Lavras exposto E3 as 96hpf; C) embrião a 48hpf exposto ao EM a seta indica edema no pericárdio; D) larva a 96hpf exposta ao EM a seta representa lordose.

Fonte: Do autor (2022).

3.4. Atividade anti-inflamatória determinada pela migração de neutrófilos

Foram observadas uma redução significativa na migração de neutrófilos para as regiões lesionadas tratadas com os diferentes extratos (FIGURA 5 e 6), sendo observada esta redução dos neutrófilos em todas as concentrações testadas do EA (0,08 a 1,25mg/ml) e EM (0,08 a 0,31mg/ml) quando comparado ao controle E3; entretanto no EH a concentração 0,31mg/ml estatisticamente foi semelhante ao controle.

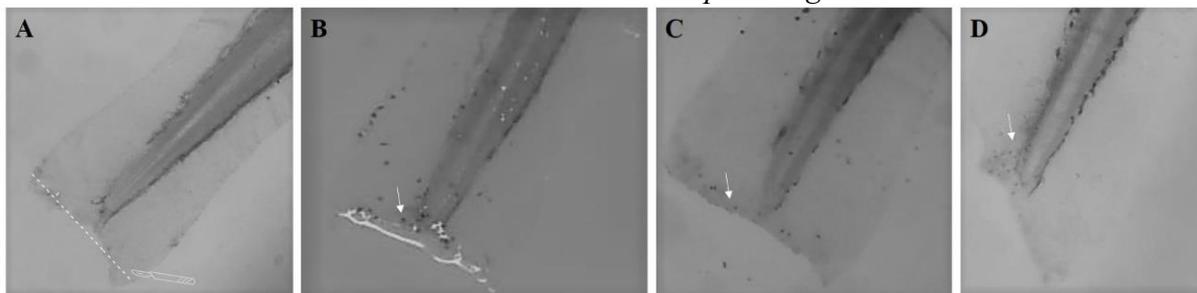
Figura 5 - Efeitos inibitórios no recrutamento de neutrófilos dos extratos aquosos, hidroetanólico e metanólico obtidos das folhas de *Siparuna guianensis* após lesão na nadadeira caudal de larvas de zebrafish.



Legenda: Controles: Meio de cultivo E3 e DMSO 1% (para o extrato metanólico). A) Extrato aquoso; B) Extrato hidroetanólico e C) Extrato metanólico. Os dados são expressos como média ± DP. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos. (n=30).

Fonte: Do autor (2022).

Figura 6 - Fotomicrografias mostrando a migração dos neutrófilos em larvas tratadas com extrato hidroetanólico obtido da folha de *Siparuna guianensis*.



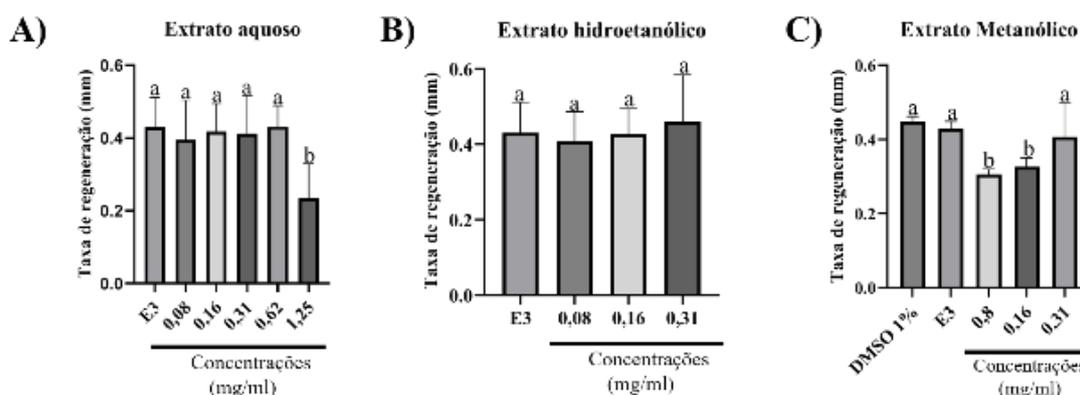
Legenda: A) Imagem ilustrativa do corte na nadadeira caudal realizada as 72hpf em larva de zebrafish; B) seta indica neutrófilos migrando para região lesionada em larva exposta ao meio de cultivo E3; C) seta indica neutrófilos na nadadeira cauda da larva tratadas com extratos de *Siparuna guianensis* representando a redução na migração e C) seta indica o aumento de neutrófilos na região lesionada tratada com a concentração de 0,31mg/ml do extrato hidroetanólico.

Fonte: Do autor (2022).

3.5. Regeneração da nadadeira caudal

As taxas de regeneração da nadadeira caudal do zebrafish as 72hpa tratados com diferentes concentrações dos EA, EH e EM são representadas na Figura 7. Os resultados demonstraram que os extratos não apresentam atividade regenerativa sobre a lesão na nadadeira caudal do zebrafish quando comparada ao controle E3. O EA apresentou uma redução na taxa de regeneração na concentração 1,25mg/ml e EM nas concentrações 0,08 e 0,16mg/ml.

Figura 7 - Taxa de regeneração da nadadeira caudal (mm) de larvas de zebrafish expostos aos extratos aquoso, hidroetanólico e metanólico obtidos das folhas de *Siparuna guianensis*.

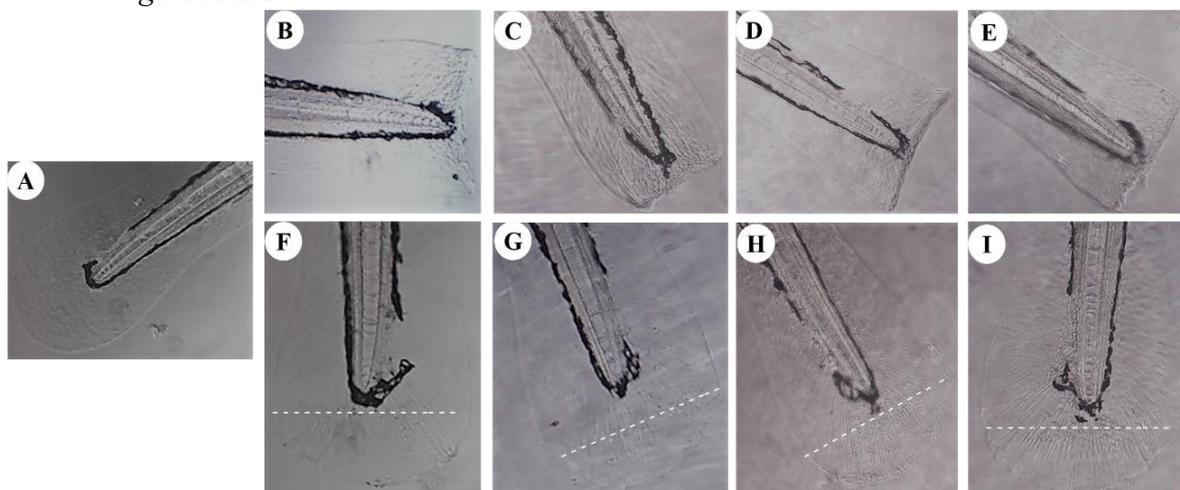


Legenda: Controles: Meio de cultivo E3 e DMSO 1% (para o extrato metanólico). A) Extrato aquoso; B) Extrato hidroetanólico e C) Extrato metanólico. Os dados são expressos como média \pm DP. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos. (n=20).

Fonte: Do autor (2022).

A Figura 8, apresenta imagens da nadadeira caudal de larvas de zebrafish tratadas com o EH, onde não demonstra diferença entre as concentrações e o controle após três dias da amputação.

Figura 8 - Fotomicrografias da regeneração da nadadeira caudal em larvas tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroetanólico das folhas de *Siparuna guianensis*.



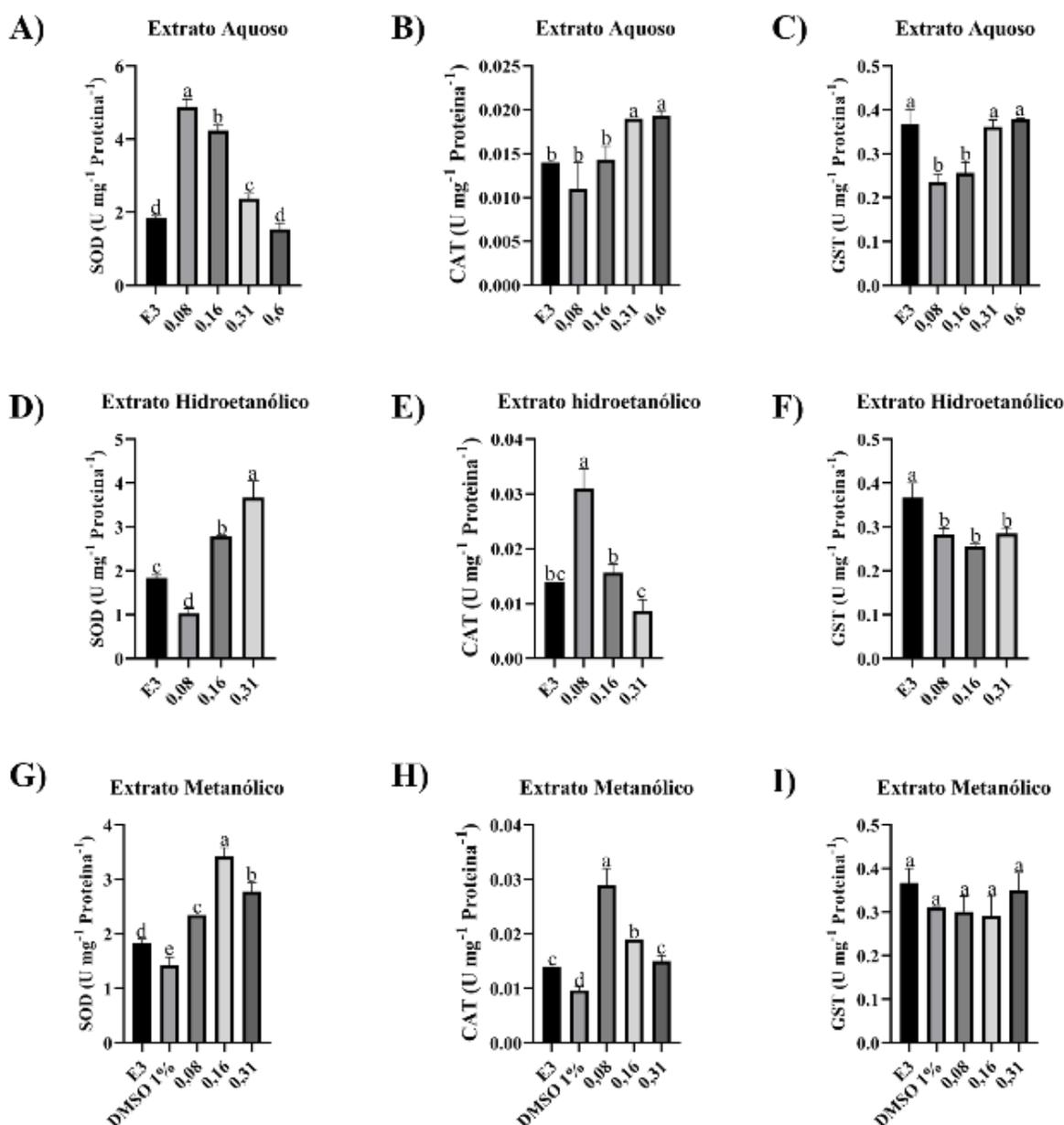
Legenda: A) Nadadeira caudal não amputada as 144 horas pós fertilização (hpf). Imagens de B a E são larvas a 0 horas pós amputação (hpa); B) Meio de cultivo E3; C) concentração 0,08mg/ml; D) 0,31mg/ml e E) 0,62mg/ml. Imagens de F a I representam larvas a 72hpa; F) Meio de cultivo E3; G) concentração 0,08mg/ml; H) 0,31mg/ml e I) 0,62mg/ml.

Fonte: Do autor (2022).

3.6. Enzimas antioxidantes

A enzima SOD no teste com o EA (FIGURA 9A) apresentou uma redução gradual na sua atividade da menor (0,08mg/ml) para a maior (0,62mg/ml) concentração, mas não foram observadas diferenças significativas, quando comparado ao controle. Nos EH (FIGURA 9D) e EM (FIGURA 9G) está enzima apresentou um aumento na atividade quando comparado ao controle E3 nas diferentes concentrações tratadas.

Figura 9 - Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST em embriões/larvas de zebrafish expostos 96hpf a diferentes concentrações dos extratos obtido das folhas de *Siparuna guianensis*.



Legenda: CAT- Catalase; SOD – Superóxido dismutase e GST Glutationa -s- transferase; hpf – horas pós fertilização. A figura A a C: Extrato aquoso; D a F: Extrato hidroetanólico e G a I: Extrato metanólico. Meio de cultivo E3 e DMSO 1% (para o extrato metanólico). As barras indicam a média \pm DP de três repetições (n = 3). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos.

Fonte: Do autor (2022).

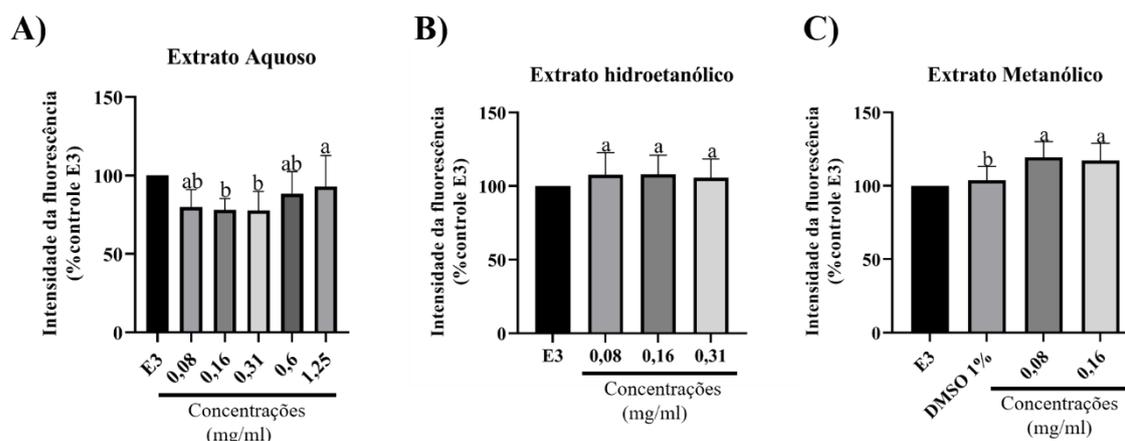
O EA (FIGURA 9B) influenciou na atividade da enzima antioxidante CAT, onde as concentrações de 0,31 e 0,62mg/ml aumentaram o seu efeito quando comparado ao controle, no entanto a concentração 0,08mg/ml do EH (FIGURA 9E) e as concentrações 0,08 e 0,16mg/ml do EM (FIGURA 9H) estimularam o aumento da atividade da CAT.

As concentrações de 0,08 e 0,16mg/ml do EA influenciaram na redução da atividade da enzima GST, o EH também demonstrou este mesmo resultado inibitório a atividade em todas as concentrações testadas, no entanto o EM não interferiu no desenvolvimento da GST quando comparado ao controle E3.

3.7. Apoptose celular

Conforme ilustrado na Figura 10, o EA apresentou uma baixa redução na intensidade de fluorescência em relação ao controle (100%). Por outro lado, o O EH e EM exerceram atividade contrária ao EA, apresentando um aumento nas células apoptóticas nas concentrações de 0,08; 0,16 e 0,31mg/ml (FIGURA 10 B e C). Não foi realizado o teste de apoptose celular para a concentração de 0,31mg/ml do EM, pois esta concentração provocou mortalidade nos embriões/larvas utilizado nesta análise.

Figura 10 - Porcentagem da intensidade de fluorescência durante a apoptose celular em embriões/larvas de zebrafish expostos por 96hpf as diferentes concentrações dos extratos aquoso, hidroetanólico e metanólico de *Siparuna guianensis*.



Legenda: Meio de cultivo E3 e DMSO 1% (para o extrato metanólico). A) Extrato aquoso; B) Extrato hidroetanólico e C) Extrato metanólico. As barras indicam a média \pm DP. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos. (n=15).

Fonte: Do autor (2022).

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi verificado a maior toxicidade dos EM e EH provocando mortalidade nas concentrações acima de 0,62mg/ml, diferente do observado para o EA apresentando efeito tóxico nos embriões e larvas acima de 2,5mg/ml. Esta baixa toxicidade do EA pode estar relacionada a presença dos compostos fenólicos principalmente o ácido trans-

cinâmico que apresenta em maior quantidade neste extrato. O ácido cinâmico, pertence à classe dos ácidos fenólicos, sendo um ácido graxo aromático, de baixa toxicidade em humanos (DE; BALTAS; BEDOS-BELVAL, 2011; RUAN et al., 2017).

Na embriotoxicidade, foi observado 100% de mortalidade em embriões expostos as concentrações de 5 e 10mg/ml dos EH e EM, no primeiro dia de avaliação (24hpf). A letalidade de embriões de zebrafish durante as primeiras horas pós fertilização pode ocorrer devido a interferência das substâncias testadas nas organelas celulares, como por exemplo nas mitocôndrias (NARKO et al., 2020). Além disso, estas substâncias podem tornar-se tóxicas devido ao excesso de extrato ao longo do tempo de exposição, podendo atingir concentrações tóxicas nos embriões ou larvas (ALAFIATAYO et al., 2019), como sendo observado nas concentrações de 0,62 a 2,5mg/ml, que provocaram letalidade as 96 e 120hpf em embriões/larvas expostos aos EH e EM.

A inflamação, é um processo biológico altamente regulado, permite que o sistema imunológico elimine os estímulos prejudiciais e inicie a fase de cicatrização (YANG et al., 2018). Durante o processo de inflamação estão presentes os neutrófilos, que atuam como vigilantes do sistema imunológico inato, e estão sempre prontos para serem recrutados para o local da infecção, uma das funções dos neutrófilos são fagocitar patógenos e a destruição intracelular (FARRERA; FADEEL, 2013; HENRY et al., 2013). Mas após a neutralização do patógeno os neutrófilos devem ser removidos para que ocorra a finalização da inflamação, em caso de persistência dos neutrófilos como na inflamação crônica eles podem causar danos irreversíveis aos tecidos pela liberação de granulações tóxicas (YANG et al., 2018).

No presente estudo, verificamos o efeito anti-inflamatório para os extratos analisados através da redução na migração dos neutrófilos da nadadeira caudal lesionada das larvas de zebrafish. O efeito anti-inflamatório dos extratos pode ser atribuído aos compostos fenólicos, principalmente ao ácido trans-cinâmico. O ácido cinâmico apresenta efeito anti-inflamatório e antioxidante (KARATAS et al., 2020; RUAN et al., 2017; SOVA, 2012). Este ácido demonstra à capacidade de inibir seletivamente a atividade transcricional do NF-kB (GABRIELE et al., 2017; RUAN et al., 2017), diminui a interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (SONG et al., 2013). O ácido cinâmico apresenta também à capacidade de reduzir o número de células inflamadas provocadas por periodontite e aumentar a contagem de osteoblastos em ratas (KARATAS et al., 2020). A atividade anti-inflamatória de *Siparuna guianensis* já foi observada através do teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton do extrato foliar da fração diclorometano (CONEGUNDES et al., 2021).

A regeneração, é um processo pelo qual estruturas lesionadas ou perdidas são

perfeitamente ou parcialmente reconstituídas. Esta análise permite avaliar em curto prazo a taxa de regeneração da nadadeira de larvas de zebrafish. Quanto maior a taxa de regeneração significa que o tratamento testado é eficaz, auxiliando na rápida reconstituição da região lesionada (MATHEW; ANDREASEN; TANGUAY, 2006; OPPEDAL; GOLDSMITH, 2010; SUN et al., 2019; YOSHINARI; KAWAKAMI, 2011). No entanto, em nossos estudos não foram verificados este aumento na taxa de regeneração em larvas de zebrafish tratados com os diferentes extratos quando comparada ao controle E3, este resultado pode estar relacionado com a atividade anti-inflamatória identificado nos extratos, pois a redução da migração de neutrófilos leva a uma cicatrização epidérmica mais rápida quando medida pelo fechamento da ferida, indicando que estas células podem desempenhar um papel inibitório no estágio de regeneração (HE et al., 2020; LI et al., 2012).

O estresse oxidativo, é denominado como o desequilíbrio na formação e remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs) (BOROSKI et al., 2015). Tanto as plantas como os animais apresentam a capacidade de desenvolver mecanismo contra as EROs, sendo enzimática ou não enzimática (BARBOSA et al., 2014). Os antioxidantes podem desativar os radicais livres, através da transferência de átomo de hidrogênio ou de um elétron (MIGUEL, 2010).

Alguns trabalhos demonstraram a atividade antioxidantes das folhas de *Siparuna guianensis*, através da capacidade de reduzir o óxido nítrico e a radical hidroxila *in vitro* através da fração de diclorometano (CONEGUNDES et al., 2021). Os extratos metanólico e hidroetanólico obtidos pelo processo de desengorduramento foliar com éter de petróleo seguido de extração ultrassom demonstraram alta atividade antioxidante por DPPH, com IC₅₀ 37,54±0,41 µg/ml e 68,98±1,6 µg/ml, respectivamente (SOARES et al., 2017). O extrato aquoso por decocção apresentou também atividade antioxidante por DPPH (ALMEIDA et al. 2021). Resultados semelhantes foram observados neste trabalho, sendo identificado um alto índice da atividade antioxidante para EA, EH e EM através do método de DPPH. Esta atividade antioxidante *in vitro* encontrada nos extratos pode estar relacionado a presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos, sendo eficazes na neutralização de radicais livres (ALMEIDA et al., 2021; SOARES et al., 2017).

Os extratos não influenciaram na redução da atividade das enzimas SOD e CAT. No entanto, a GST apresentou redução na sua atividade nas lavras tratadas com o EAe EH. Estes resultados da ação das enzimas antioxidantes podem estar envolvidos a maneira como as enzimas atuam; a SOD, é uma enzima de defesa primária contra o estresse oxidativo que pode agir convertendo o radical superóxido (O₂^{•-}) em H₂O₂ (XIONG et al., 2019). A CAT demonstra a alto desempenho na capacidade de catalisar o H₂O₂ em água (MUTHULAKSHMI et al.,

2018). A GST é uma enzima metabólica de desintoxicação de fase II, catalisando a ligação de grupos eletrolíticos de xenobióticos com grupos sulfidríla de GSH (HUANG et al., 2020).

A diferença encontrada nos resultados da atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, também está relacionada à forma como cada um dos ensaios atuam, como mencionado anteriormente as enzimas agem convertendo radical superóxido ou catalisando o H_2O_2 , no entanto o teste de *in vitro* apresenta à capacidade de transferir elétrons/hidrogênio para estabilizar o radical livre DPPH (BOROSKI et al., 2015; XIONG et al., 2019).

A apoptose celular é um processo fisiológico que pode ocorrer naturalmente durante a embriogênese, como resultado de dano ou estresse celular. Este processo serve para eliminar células desnecessárias, sendo um sistema altamente programado. Neste procedimento, a célula para de crescer e dividir, e por consequência deste fenômeno ocorre sua morte de maneira controlada sem derramamento de conteúdo celular no ambiente circundante (PFEFFER; SINGH, 2018). A apoptose está envolvida em muitas ações de desenvolvimento, como: morfogênese, deleção de estruturas vestigiais, eliminação de células maléficas e regulação do número celular (XIA et al., 2017a). Em nosso trabalho, o EA não induziu apoptose em embriões/lavras zebrafish demonstrando ser o extrato mais seguro.

5. CONCLUSÃO

Nos EA, EH e EM das folhas de *Siparuna guianensis* foi identificado a presença de compostos fenólicos, apresentaram atividade anti-inflamatória e alto índice de atividade antioxidante, no entanto somente o EA demonstrou baixa toxicidade e ausência de teratogenicidade apresentado assim potencial uso terapêutico. Portanto, faz-se necessário estudos futuros empregando outros modelos animais para avaliar a atividade anti-inflamatória do EA e dos compostos fenólicos insolados.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela bolsa de estudo. Ao Centro de Análises e Prospecção Química da UFLA pelo suporte técnico para o experimento envolvendo análise cromatográfica.

REFERÊNCIAS

- ABIDIN, I. Z. Z. et al. The effects of *Piper sarmentosum* aqueous extracts on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and caudal fin tissue regeneration. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14165, 2020.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3). Acesso em: 12 mar. 2022.
- ALAFIATAYO, A. A. et al. Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of curcuma longa extract on zebrafish (*Danio rerio*). **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2019, n.3807207, p. 1-10, 2019.
- ALMEIDA, M. A.de et al. Avaliação do perfil fitoquímico e do potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.17, n.2, p.252-270, abr./jun. 2021.
- BARBOSA, M. R. et al. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n.3, p. 453-460, Mar. 2014.
- BASNET, R. M.; GUARIENTI, M.; MEMO, M. Zebrafish embryo as an *in vivo* model for behavioral and pharmacological characterization of methylxanthine drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 596, 2017.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n.1, p. 276-287, Nov. 1971. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8). Acesso em 07 jan. 2022.
- BOROSKI, M. et al. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed. Curitiba: Appris, 2015, 141 p.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p.248-254, May 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>. Acesso em 07 jan. 2022.
- BRAZ FILHO, R. et al. Oxoaporphine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna guianensis*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 7, p. 1187-1188, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(76\)85135-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(76)85135-7). Acesso em: 02 mar. 2022.
- BREETA, R. E. et al. Non-toxic and non teratogenic extract of *Thuja orientalis* L. inhibited angiogenesis in zebra fish and suppressed the growth of human lung cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 699-706, Oct. 2018.
- CARVALHO, V. F. et al. *In vitro* anthelmintic activity of *Siparuna guianensis* extract and essential oil against *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of helminthology**, v. 94, p. e50, Apr. 2020.
- CHAHARDEHI, A. M.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1345, 2020.

CONEGUNDES, J. L. M. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Siparuna guianensis* Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113344, Jan. 2021.

CUNHA, M.C.da et al. Effects of processing and packaging on bioactive compounds of curriola jelly [*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.] during storage. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 41, n. 1, p. 96-104, Jan./Mar. 2021.

DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1672-1703, 2011.

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**, v.25, n. 1, p. 147-158, 2017.

FACUNDO, V. A. et al. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p. 1134-1139, Sept./Oct. 2012.

FAROOQ, M. et al. The phytochemical screening and antiangiogenic activity of audthan al himar (*Moricandia sinaica* Boiss.) extracts in zebrafish embryos and human umbilical vein endothelial cells. **Journal of King Saud University**, v. 32, n. 4, p. 2370-2376, June 2020.

FARRERA, C.; FADEEL, B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. **Journal of immunology**, v. 191, n.5, p. 2647-2656, 2013.

FÉLIX, L. M. et al. Ketamine-induced oxidative stress at different developmental stages of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **RSC Advances**, v. 6, n. 66, p. 61254-61266, 2016.

FERREIRA, R. M. dos A. et al. Nano-emulsification enhances the larvicidal potential of the essential oil of *Siparuna guianensis* (Laurales: Siparunaceae) against *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 3, p. 788-796, May 2020.

GABRIELE, E. et al. New sulfured derivatives of cinnamic acids and rosmarinic acid as inhibitors of STAT3 and NF- κ B transcription factors. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 1012-1028, 2017.

GANGULY, N.; CHAKRABORTY, T.; SENGUPTA, A. Evaluation of toxicity and teratogenicity of anti-psychotic drugs followed by determination of anti-psychotic property of *Mangifera indica* bark through behavioral assay on *Danio rerio* model. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v.11, n. 3, p. 4908-4918, 2020.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in enzymology**, v. 77, p. 398-405, 1981. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77053-8). Acesso em 07 jan. 2022.

HACKE, A. C. M. et al. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, citral and geraniol exhibit anticonvulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish.

Journal of Ethnopharmacology, v. 275, p. 1-8, July 2021.

HASEGAWA, T. et al. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. **Elife**, v. 6, p. e22716, 2017.

HE, M. et al. Ginsenoside Rg1 Acts as a selective glucocorticoid receptor agonist with anti-inflammatory action without affecting tissue regeneration in zebrafish larvae, **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1107, 2020.

HENRY, K. M. et al. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 4, p. 633-642. Oct. 2013.

HUANG, X. et al. Evaluation of the oxidative stress status in zebrafish (*Danio rerio*) liver induced by three typical organic UV filters (BP-4, PABA and PBSA). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 2, p.651, 2020.

KARATAS, O. et al. Cinnamic acid decreases periodontal inflammation and alveolar bone loss in experimental periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 55, n. 5, p. 676-685, 2020.

KAWAKAMI, A.; FUKAZAWA, T.; TAKEDA, H. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. **Developmental dynamics:an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 231, n. 4, p. 693-699, Dec. 2004.

KHAN, M. F. et al. The reproductive toxicity associated with *Dodonaea viscosa*, a folk medicinal plant in Saudi Arabia. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1-9, 2021.

KIM, J. H. et al. Modulation of melanin synthesis by rengyolone isolated from the root of *Eurya emarginata* in melan-a cells. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 6, p. 940-945, 2014.

LE GUYADER, D. et al. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 132-141, 2008.

LI, L. et al. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 30, p. 25353-25360, 2012.

LI, L. et al. Role of quzhou fructus aurantii extract in preventing and treating acute lung injury and inflammation. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1698-1698, 2018.

MATHEW, L. K.; ANDREASEN, E. A.; TANGUAY, R. L. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits regenerative growth. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 257-265, Jan. 2006.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n.12, 9252-9287, 2010.

MOURA, W.de S. et al. Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated

by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, London, v. 146, p. 112142, Apr. 2020.

MUTHULAKSHMI, S. et al. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. **Chemosphere**, v. 198, p.111-121, May 2018.

NARKO, T. et al. Acute toxicity tests of fermented robusta green coffee using zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 3, p. 485-492, 2020.

NEGRI, G.; SANTI, D. de; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 5, p.1024-1034, Oct. 2012.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Test No. 236**: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2013 Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>. Acesso 01 de fev. 2022.

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

PAIVA, I. M. et al. Behavioral plasticity and gene regulation in the brain during an intermittent ethanol exposure in adult zebrafish population. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 192, p. 172909, May 2020.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. K. Apoptosis: a target for anticancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 2-10, 2018.

POLEDNIK, K. M.; KOCH, A. C.; FELZIEN, L. K. Effects of essential oil from *Thymus vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. **Zebrafish**, v.15, n. 4, p. 361-371, Aug. 2018.

RUAN, B.-F. et al. Resveratrol-based cinnamic ester hybrids: synthesis, characterization, and anti-inflammatory activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 1282-1290, 2017.

SANTOS, D. et al. Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. **Chemosphere**, v. 261, p. 127748, Dec. 2020

SANTOS, M. de F. et al. Stomatal analysis in leaves of *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae). **Research, Society and Development**, v. 11, n.1, p.e17111124722, 2022.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, Feb. 2009.

SOARES, I. M. et al. Application of a degreasing process and sequential ultrasound-assisted extraction to obtain phenolic compounds and elucidate of the potential antioxidant of *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 21, p. 357-366,

June 2017.

SONG, F. et al. Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 125-130, Oct. 2013.

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749-767, July 2012.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, Feb.2008.

SPEROTTO, N. D.de M. et al. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 178-188, Oct. 2018.

SUN, L. et al. Effects of 17 α -ethinylestradiol on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. **Science of The Total Environment**, v. 653, p. 10-22, Feb. 2019

TEAME, T. et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal frontiers : the review magazine of animal agriculture**, n. 9, v. 3, p. 68-77, July 2019

THOMÉ, R. G. et al. Evaluation of healing wound and genotoxicity potentials from extracts hydroalcoholic of *Plantago major* and *Siparuna guianensis*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 12, p. 1379-1386, Dec.2012.

VALENTINI, C. M. A.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet ("negramina"): a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2010.

VIROTE, B. do C. R. et al. Obesity induction in adult zebrafish leads to negative reproduction and offspring effects. **Reproduction**, v. 160, n. 6, p. 833-842, 2020.

WALTERS, K. B. et al. Muscle degeneration and leukocyte infiltration caused by mutation of zebrafish Fad24. **Developmental dynamics**, v. 238, n. 1, p. 86-99, Jan. 2009.

XIA, Q. et al. A developmental toxicity assay of *Carpesii Fructus* on zebrafish embryos/larvae. **Toxicology Rearch (Camb)**, v. 6, n. 4, p. 460-467, July 2017a

XIA, Q. et al. Assay for the developmental toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to zebrafish embryos/larvae. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 71-81, Jan. 2017b.

XIONG, G. et al. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish Shellfish Immunol**, v. 95, p. 399-410, Dec. 2019.

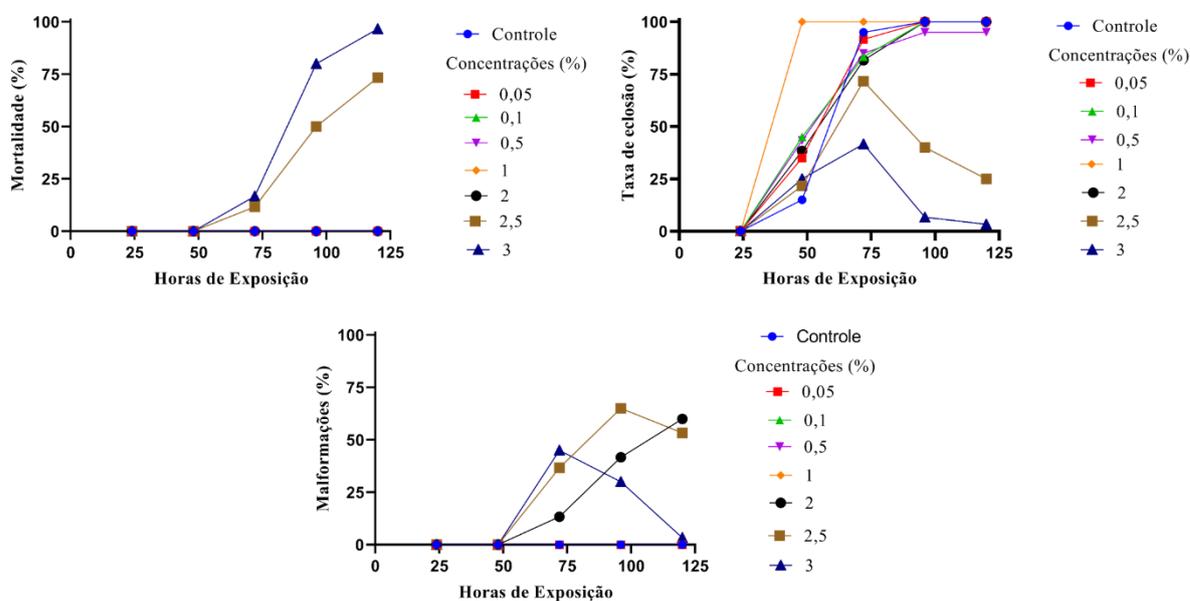
YANG, Y. et al. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an *in vivo* zebrafish model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 496, n. 2, p. 763-769, Feb. 2018.

YOSHINARI, N.; KAWAKAMI, A. Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. **The Biological bulletin**, v. 221, n. 1, p. 62-78. Aug. 2011.

ZHAO, C. et al. Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 62, p. 152959, Sept. 2019.

DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

Figura 1 - Desenvolvimento dos embriões e larvas zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao Dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 2,5 e 3 %) em triplicata.



Legenda: (A) %Taxa de mortalidade; (B) Taxa de eclosão e (D) Porcentagem de malformações em embriões e larvas de zebrafish (n=3)

Fonte: Do autor (2022).

ARTIGO 5 - Toxicidade e atividade anti-inflamatório do óleo essencial de *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae) em embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*)

ARTICLE 5 - Toxicity and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae) on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae

Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas pela população no tratamento de diversas enfermidades, nem todas as espécies apresentam comprovação científica da sua eficácia; como, por exemplo, é a *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae) que possuem várias indicações etnobotânicas/etnofarmacológicas sem comprovação da sua veracidade. Objetivou-se com essa pesquisa investigar a toxicidade, potencial anti-inflamatório, atividade de enzimas antioxidantes, regeneração da nadadeira caudal e o efeito protetor do óleo essencial *S. guianensis* em embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*). Foi realizada a extração por hidrodestilação do óleo essencial de folhas da *S. guianensis*, após este processo o óleo foi identificado e quantificado através da análise cromatográfica. Diferentes concentrações do óleo (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 e 0,39 µg/ml) foram testadas em embriões e larvas de zebrafish através do teste toxicidade aguda, durante 120 horas pós fertilização (hpf). As concentrações não letais e teratogênicas (0,39 a 12,5 µg/ml) foram utilizadas para a realização das análises de migração de neutrófilos; regeneração da nadadeira caudal; apoptose e atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST). Foi realizado neste trabalho, testes para determinar o efeito protetor contra estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio através da análise enzimática e apoptose celular. Foi identificado no óleo essencial (OE) à presença do β-Mirceno (24,72%). As concentrações de 200, 100 e 50 µg/ml causaram 100% de mortalidade com 24hpf. Por outro lado, os animais expostos a concentração de 25 µg/ml apresentaram malformações. As concentrações de 0,39 a 12,5 µg/ml apresentaram desenvolvimento normal. As diferentes concentrações apresentaram a capacidade de redução da migração dos neutrófilos para o local lesionado das larvas de zebrafish independente da concentração. A regeneração caudal foi significativamente maior nos controles quando comparado as larvas expostas ao OE. Não foi verificado a influência do OE sobre a redução da atividade de enzimas antioxidantes, mas através deste mesmo ensaio foi identificado o efeito protetor contra a indução do estresse oxidativo através CAT e GST. Além disso, foram identificadas células apoptóticas na região do coração na concentração de 12,5 µg/ml. Os resultados do presente estudo demonstraram que concentrações acima de 12,5 µg/ml do OE de *S. guianensis* podem causar efeitos adversos nos estágios iniciais de desenvolvimento do zebrafish. O OE apresenta atividade anti-inflamatória através da redução da migração dos neutrófilos e efeito protetor contra estresse oxidativo pelas enzimas antioxidante GST e CAT.

Palavras-chave: Neutrófilos. Negramina. β-Mirceno. Laranja de acridina. Regeneração caudal.

ABSTRACT

The medicinal plants are used by the population in the treatment of several diseases, not all species have scientific proof of their efficacy; as, for example, is the *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae) that has several ethnobotanical/ethnopharmacological indications without proof of its veridicality. This research aimed to investigate the toxicity, anti-inflammatory potential, antioxidant enzyme activity, caudal fin regeneration, and the protective effect of *S. guianensis* essential oil on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. The essential oil from *S. guianensis* leaves was extracted by hydrodistillation, and after this process the oil was identified and quantified by chromatographic analysis. Different concentrations of the oil (200; 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12; 1.56; 0.78 and 0.39 μ g/ml) were tested on zebrafish embryos and larvae via the acute toxicity test, for 120 hours post fertilization (hpf). The non-lethal and teratogenic concentrations (0.39 to 12.5 μ g/ml) were used to perform analyses of neutrophil migration; caudal fin regeneration; apoptosis and activity of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST). In this work, tests were performed to determine the protective effect against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through enzymatic analysis and cell apoptosis. It was identified in the essential oil (EO) the presence of β -Myrcene (24.72%). The concentrations of 200, 100 and 50 μ g/ml caused 100% mortality at 24hpf. On the other hand, animals exposed to the 25 μ g/ml concentration showed malformations. Concentrations of 0.39 to 12.5 μ g/ml showed normal development. The different concentrations showed the ability to reduce the migration of neutrophils to the lectin site of the zebrafish larvae independent of the concentration. Caudal fin regeneration was significantly higher in the controls when compared to the OE exposed larvae. The influence of EO on reducing the activity of antioxidant enzymes was not verified, but through this same assay a protective effect against the induction of oxidative stress through CAT and GST was identified. In addition, apoptotic cells were identified in the heart region at the concentration of 12.5 μ g/ml. The results of the present study demonstrated that concentrations above 12.5 μ g/ml of *S. guianensis* EO can cause adverse effects in the early developmental stages of zebrafish. EO exhibits anti-inflammatory activity by reducing neutrophil migration and a protective effect against oxidative stress by the antioxidant enzymes GST and CAT.

Keywords: Neutrophils. Negramine. β -Myrcene. Acridine orange. Caudal fin regeneration.

1. INTRODUÇÃO

Uma planta é considerada medicinal quando apresenta uma ou várias estruturas, com a presença de princípios ativos que podem ser utilizados com à finalidade terapêutica ou para a elaboração de fármacos semissintéticos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; WHO, 1998). As plantas medicinais são utilizadas pela população para o tratamento de várias enfermidades de diferentes formas como, chás, xaropes, cataplasma e na inalação de óleos essenciais, devido sua bioatividade e propriedades aromáticas, entretanto, muitas vezes seus efeitos medicinais não possuem comprovações científicas sobre seus verdadeiros benefícios (FERREIRA et al., 2017; SANTOS; IORI, 2017).

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, aromáticas e solúveis em solventes orgânicos apolares; oriundas de metabólitos secundários obtidos de diferentes partes das plantas, através de hidrodestilação ou destilação por arraste com vapor d'água (FERREIRA et al., 2017; SIMÕES; SPITZER, 2003). Os OEs apresentam odor intenso e garantindo as plantas vantagens adaptativas, atuando na defesa contra patógenos, insetos e na polinização, atraindo polinizadores. A composição química e rendimento do OE podem apresentar variações dependendo do horário de coleta, idade do material vegetal, área de cultivo da planta, secagem e armazenamento, além de fatores edafoclimáticos (ALCÂNTARA et al., 2019; BARROS et al., 2018; MIRANDA et al., 2016).

Siparuna guianensis é uma planta aromática, popularmente conhecida como “capitiú”, “negramina”, “catingueira-de-paca” e “erva-santa”, sendo encontrada em diferentes domínios fitogeográficos no Brasil (SANTOS et al., 2022; VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTIZ; COELHO, 2010). Está espécie possui várias indicações etnofarmacológicas, onde suas folhas são utilizadas como carminativas, estimulantes, antidiarréicas, diuréticas, anti-inflamatório, dores reumáticas, sinusite e febre (ALMEIDA et al., 2021; FERREIRA et al., 2020; MOURA et al., 2020).

O OE extraído das folhas de *Sipauna guianensis* é utilizado como, antimicobacteriano (ANDRADE et al., 2015; MELO et al., 2017), anti-leishmania (ANDRADE et al., 2016) atividade acaricida (DINIZ et al., 2022), antifúngico inseticida e repelente (AGUIAR et al., 2015; MOURA et al., 2021). Na composição química do OE já foram identificadas a presença de β -Mirceno, Germacreno D, Bicyclgermacreno, Humuleno, Elemeno, Siparunona e Epicurzerenona (AGUIAR et al., 2015; ANDRADE et al., 2015; FERREIRA et al., 2020; FERREIRA et al., 2017; LOURENÇO et al., 2018; MOURA et al., 2021; PORTELLA et al., 2014). Apesar de suas aplicações terapêuticas, são limitadas as pesquisas científicas *in vivo* com

o OE desta espécie, para à comprovação dos seus efeitos e possível toxicidade e etnofarmacológicas.

Nos últimos anos, o peixe *Danio rerio* popularmente conhecido no Brasil como “zebrafish”, “paulistinha” e “bandeirinha” tornou-se amplamente empregado como organismo modelo vertebrado em pesquisas científicas, devido à sua semelhança fisiológica com os mamíferos, a que exhibe o genoma totalmente sequenciado. Todas as suas fases de vida são utilizadas em diferentes análises, desde biologia do desenvolvimento e toxicologia comportamental (HE et al., 2020; HENRY et al., 2013; TEAME et al., 2019; XIONG et al., 2019; YANG et al., 2018).

Neste estudo, investigamos a toxicidade, potencial anti-inflamatório, regeneração da nadadeira caudal e a atividade de enzimas antioxidantes, além de avaliar o efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em embriões e larvas de zebrafish tratados com óleo essencial da folha de *Siparuna guianensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal

As folhas de *Siparuna guianensis* (registro da exsicata – PAMG 58647 - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais – EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) foram coletas em outubro de 2019 (Primavera), no período da manhã em Remanescente de Floresta Estacional Semidecidual localizado no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura – DAG da Escola de Ciências Agrárias - ESAL da Universidade Federal de Lavras -UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil (21° 13' 48.8" S; 44° 58' 28.5" W).

2.2. Extração do óleo essencial (OE)

A extração do OE foi de acordo com o proposto por Valentini et al. (2010), onde as folhas frescas cortadas em frações de aproximadamente 1 cm, foram submetidas a hidrodestilação por 3 horas, com extrator do tipo Clevenger. Após a extração o OE foi separado por decantação, colocado em frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração (4°C), e protegido da luz.

2.3. Composição química do OE

A análise química quantitativa do OE de *Siparuna guianensis* foi realizada em triplicata usando o sistema de cromatografia gasosa (CG) Agilent® 7890A operado com o sistema de processamento de dados HP GC ChemStation versão A.01.14, equipado com Sistema Autosampler CombiPAL (CTC Analytics AG, Suíça) e um detector de ionização de Chama (CG-FID). As amostras foram preparadas diluindo 10 µL do OE com 1 mL acetato de etila. O volume de injeção foi de 1,0µL, em modo *split* com proporção de injeção de 50:1. Foi usada coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30m de comprimento x 250µm de diâmetro interno x 0,25µm de espessura de filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi usado como gás de arrasto com fluxo de 1,16mL/min. As temperaturas do injetor foi de 250°C e o detector de 300°C. A condição de análise foi de aquecimento de rampa inicial de 60°C com a taxa de aquecimento de 3°C/min até 240°C, seguido por aquecimento 10°C até 280°C. O conteúdo dos constituintes eluídos foi expresso como porcentagens da área relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão das três amostras analisadas (LORENÇONI et al., 2020; MARQUES et al., 2021).

As análises qualitativas foram realizadas usando o cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado ao detector seletivo de massa Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) operado por ionização por impacto eletrônico a 70 eV no modo de varredura a uma taxa de 1,0scan/s, com um intervalo de aquisição de massa de 40–400m/z. As condições de operação foram iguais às utilizadas nas análises CG-FID.

Os constituintes químicos foram identificados comparando seus índices de retenção em relação à co-injeção de uma solução padrão de n-alcenos (C₈-C₂₀; Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA), usando a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963), com base na biblioteca de banco de dados espectral de massa do NIST (NIST, 2014) e com base nos índices de retenção descritos na literatura (ADAMS, 2007; ТКАЧЁБ, 2008).

2.4. Criação e obtenção dos embriões

O experimento foi realizado na Ala de Peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. O projeto foi aprovado e protocolado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Lavras, protocolo nº 023/19 e todo manejo do zebrafish foi determinado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

Todos os zebrafish adultos foram acondicionados em uma rack própria para à espécie

(Rack Hydrus, modelo ZEB-60, Alesco, SP, BRA). A rack contava com um sistema de recirculação de água e controle automatizado de temperatura, pH e condutividade. A rack possuía 60 aquários de policarbonato. Em cada aquário foram mantidos 10 peixes (5 fêmeas e 5 machos), sendo separados ambos os sexos por uma divisória de acrílico perfurada.

Durante o período experimental, os peixes foram mantidos em fotoperíodo com 14:10 horas (claro:escuro), temperatura de 28°C e alimentados três vezes ao dia, sendo duas alimentações (uma pela manhã e outra à tarde) com ração floclulada para peixes ornamentais (Alcon basic, Alcon Pet[®], SC, BRA) e uma vez no intervalo com alimento vivo (náuplios de artêmia - *Artemia salina* - Artemiidae) (PAIVA et al., 2020). A higienização dos aquários e manutenção da qualidade de água foi realizada pelo próprio sistema automatizado da rack.

No período da manhã, meia hora antes do término do período escuro os peixes eram retirados dos aquários específicos da rack e transferidos para os aquários de reprodução de acrílico conhecido como criadeiras (ZebClean, Alesco, SP, BR), permitindo o contato direto entre machos e fêmeas para ocorrer a fecundação dos gametas (SPENCE et al., 2008). As criadeiras apresentavam uma placa perfurada, permitindo com que os ovos caíssem na parte inferior do aquário e assim ficassem protegidos do canibalismo. Após duas horas de acasalamento dos peixes, tempo suficiente para a reprodução, os peixes foram devolvidos para seus respectivos aquários na rack separado novamente os machos das fêmeas com auxílio da divisória. Os ovos foram coletados e contados utilizando uma pipeta de Pasteur e colocados em uma placa de Petri contendo meio de cultivo E3 (5mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂ e 0,33 mM MgSO₄) (VIROTE et al., 2020; ZHAO et al., 2019).

2.6. Testes de toxicidade aguda em embriões de peixes

Os ensaios de embriotoxicidade foram realizados de acordo com a diretriz da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) n ° 236: *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test* (OECD, 2013). Para a realização do teste, os ovos de zebrafish passaram por uma triagem inicial que os classificavam de duas formas: ovos viáveis ou inviáveis.

Ovos viáveis: Aqueles com morfologia normal, ou seja, com divisão dos blastômeros, transparentes, perfeitamente esféricos, com início claro e simétrico das clivagens, sendo denominados como ovos fertilizados. Ovos inviáveis: aqueles que demonstravam coloração opaca e/ou com célula(s) rompida(s) dentro do córion, formação de vesículas ou membranas danificadas, malformações, lesões no córion e tamanho anormal (AVDESH et al., 2012;

KJØRSVIK; MANGOR-JENSEN; HOLMEFJORD, 1990; VIROTE et al., 2020).

Para o ensaio de toxicidade aguda, foi diluído 0,22µl de OE de *Siparuna guianensis* em 50 ml de E3 com 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo está, posteriormente, diluída para obtenção das concentrações 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200µg/ml. Neste teste foi empregado três controles: 1º) Meio de cultivo E3; 2º) 1% DMSO com meio E3 (FIGURA 1SUPLEMENTAR) e 3º) óleo de coco (200µg/ml) (Copro®). Segundo Polednik et al. (2018) o óleo de coco não é uma substância tóxica para o zebrafish.

Foram utilizados 20 embriões viáveis em cada tratamento, ao quais foram adicionados em microplacas de 96 poços (1 embrião por poço). Em cada poço foi acrescentado 200µL de cada concentração testada e em seguida incubadas a 28±1°C (OECD, 2013). Os ensaios foram realizados em triplicata e a exposição das concentrações do OE foi de forma estática para garantir a mínima manipulação dos embriões/lavras (BASNET; GUARIENTI; MEMO, 2017). Embriões e lavras foram observados diariamente nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120hpf (horas pós fertilização) utilizando-se microscópio de luz (Olympus, modelo CX22LED, Japão) para a verificação das anomalias morfológicas e letalidade. Foram monitoradas as seguintes características: desenvolvimento de somitos e olhos, pigmentação do olho e corpo, presença de batimentos cardíacos, deslocamento da cauda, embriões coagulados e a malformações (durante a formação do coração, no saco vitelínico, pericárdio, retardo de crescimento, lordose e deformidade de cauda) (OECD, 2013).

As concentrações de 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5µg/ml não apresentaram mortalidades e nem efeitos teratogênicos através do teste de toxicidade aguda em embriões de zebrafish, sendo utilizadas para à análise de migração de neutrófilos, regeneração da nadadeira caudal e determinação da atividade de enzimas antioxidantes.

2.7. Atividade anti-inflamatória determinada pela migração de neutrófilos

As 8hpf foram acrescentados em embriões cultivados em E3 0,003% de 1-fenil-2-tioureia (PTU; Sigma -Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) para bloquear a melanização. Antes de realizar a amputação da nadadeira caudal, larvas de 72hpf foram pré tratadas por 2h com as concentrações de 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5µg/ml do OE, sendo empregadas 30 larvas por tratamentos. Posteriormente, as larvas foram anestesiadas com tricáina (0,016%), em seguida com bisturi e um estereomicroscópio (Stemi 200C, Carl Zeiss, Alemanha) foram amputados os primórdios das nadadeiras caudais localizadas na região após a notocorda (HASEGAWA et al., 2017; KAWAKAMI; FUKAZAWA; TAKEDA, 2004). As larvas

amputadas foram retornadas as diferentes concentrações do OE de pré-lesão por seis horas a 28°C (POLEDNIK et al., 2018).

Posteriormente, as larvas foram fixadas em *overnight* com paraformaldeído (4%), logo depois coradas com *Sudan Black* por 20 min (LE GUYADER et al., 2008; POLEDNIK et al., 2018). Após este período, as larvas foram lavadas em etanol 70% e incubadas em temperatura ambiente por 15 min em solução de 1% de KOH (Hidróxido de potássio) e 1% de H₂O₂ (Peróxido de hidrogênio) para a eliminação do excesso de pigmentação (WALTERS et al., 2009). As células coradas foram observadas em estereomicroscópio, sendo realizada a contagem dos neutrófilos na área da lesão.

2.8. Teste de regeneração da nadadeira caudal de larva de zebrafish

Embriões fertilizados foram criados em meio de cultura E3 as 28°C por 72hpf. Neste período (72hpf) larvas (n=20) foram anestesiadas em tricáína (0,016%), em seguida com bisturi e um estereomicroscópio foram amputados os primórdios das nadadeiras caudais localizadas na região após a notocorda e foram fotografadas imediatamente após amputação (0hpa). Posteriormente, as larvas foram colocadas em microplacas de 96 poços (1 por poço) com 200µl de diferentes concentrações do OE (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5µg/ml), durante três dias. As 72hpa as larvas foram fotografadas novamente e a área regenerada da nadadeira caudal foi quantificada utilizando o programa *Motic Images Plus* (OPPEDAL; GOLDSMITH, 2010).

2.9. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Neste ensaio foram realizadas análises com as enzimas antioxidantes CAT (catalase), SOD (superóxido desmutase) e GST (glutathione-s-transferase) com e sem indução de estresse oxidativo provocado pelo H₂O₂.

2.9.1. Preparo do homogenato

Inicialmente, foram expostos 40 embriões (por réplica) a diferentes concentrações de OE (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5µg/ml) até as 96hpf. Posteriormente, as larvas foram colocadas em micro tubos juntamente com 400µL de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,0 à frio e maceradas, sendo realizado em triplicata. Os homogenatos foram centrifugados (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United States) por 4.000 xg a

4°C por 15 min para obtenção do sobrenadante (FÉLIX et al., 2016; SANTOS et al., 2020). Para determinar as concentrações de proteínas foi utilizado o método de Bradford em 595 nm (BRADFORD, 1976), com padrão albumina de soro bovino.

O estresse oxidativo foi induzido com H₂O₂, de acordo com o método proposto por Kang et al. (2015) com modificações. Após a reprodução os embriões (3-4hpf) foram expostos a diferentes concentrações do OE (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5µg/ml) durante 1h, logo após este período foi acrescentado 7,5 mM de H₂O₂ sobre os embriões e mantido até 96hpf, em seguida foi realizado a metodologia descrita para obtenção do homogenato.

2.9.2. Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi avaliada conforme o protocolo descrito por Aebi (1984). Na qual ocorre o decréscimo de absorvância a 240nm devido à degradação do H₂O₂ em oxigênio e água. A leitura da absorvância foi realizada a cada 20s por 2 min em espectrofotômetro (Tecan, Infinite 200 Pro, Suíça) e a atividade foi expresso em µmol de H₂O₂ degradado por minuto por mg de proteína.

2.9.3. Superóxido desmutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada conforme método de Beauchamp e Fridovich (1971). Para iniciar a reação, a microplaca foi colocada sob luz (400lux) por 7 min, após este período foi realizado a leitura em espectrofotômetro a 560 nm/ 25°C, sendo realizado em triplicata. A unidade de atividade de SOD (U) foi determinada como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da taxa de fotorredução do Azul de nitrotetrazólio (NBT), e o resultado foi expresso como unidades por mg de proteína.

2.9.4. Glutathione -s-transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi analisada conforme metodologia de Habig e Jakoby (1981). A ação da GST foi medida através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno que foi estimada pela variação da absorvância a 340 nm por 3 min, em espectrofotômetro. As medidas foram realizadas em triplicata e nível de atividade da GST estimado pelo coeficiente molar de $9,6 \times 10^{-3}$ M/cm em termos de conjugado de 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) produzido por minuto por mg de proteína. Os resultados foram

expressos em unidade por mg de proteína.

2.10. Identificação de células apoptóticas

As células apoptóticas foram detectadas em larvas vivas usando a coloração de laranja de acridina (corante metacromático seletivo para ácido nucleico). Foram utilizadas, 15 lavras de zebrafish com 96hpf. Posteriormente as larvas foram submetidas a diferentes concentrações do OE (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5µg/ml), lavadas em meio de cultivo E3, em seguida incubadas em 5µg/mL de laranja de acridina por 20min no escuro a temperatura ambiente. Após este período as larvas foram lavadas em meio E3 por três vezes durante 5 min cada. Finalmente, as larvas foram anestesiadas em triclaína (0,016%) por 3 min (XIA et al., 2017ab; ZHAO et al., 2019). As células apoptóticas foram observadas e fotografadas em microscópio estereoscópio de fluorescência (Axio Observer. Z1, Zeiss, Göttingen, Alemanha), equipado com câmera AxioCam HRc (Zeiss). Em seguida a apoptose celular foi determinada conforme a intensidade de fluorescência no software *ImageJ*. (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.10.1 Identificação de células apoptóticas induzida por H₂O₂

Para esta análise foi utilizada a metodologia Kang et al. (2015). Após a reprodução os embriões (3-4 hpf) foram expostos a diferentes concentrações do OE (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5µg/ml) durante 1 h, logo após este período foi acrescentado 7,5 mM de H₂O₂ sobre os embriões e mantido até 96 hpf, em seguida foi realizado a metodologia descrita no item 2.10.

2.11. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Posteriormente os dados foram submetidos a ANOVA a um nível de significância de 0,05. Quando observadas diferenças significativas, as médias dos tratamentos foram diferenciadas pelo teste *Tukey HSD*. Todas as análises foram realizadas com o software estatístico *Minitab* v.18 (State College, PA, EUA). Os gráficos foram gerados utilizando o programa *Graph Prism* 8.0.1. (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, Estados Unidos).

3. RESULTADOS

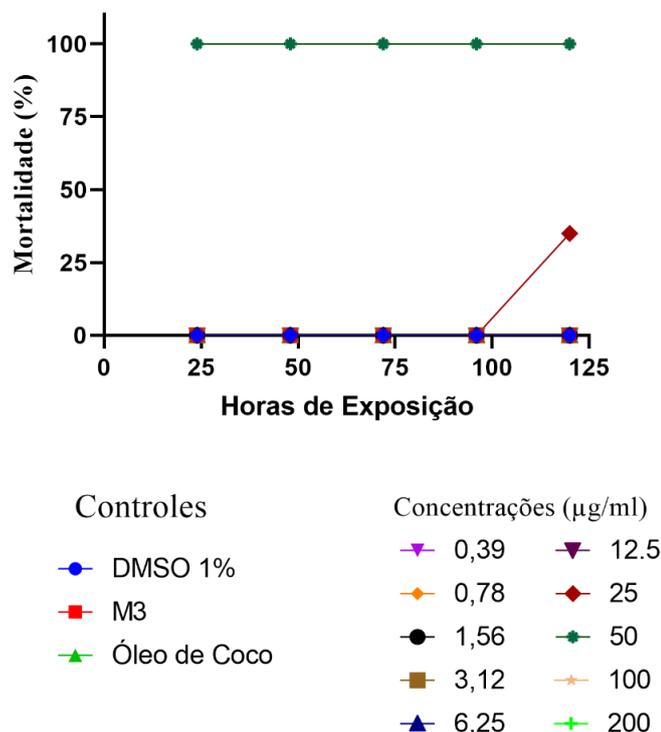
3.1. Composição química

O OE extraído por hidrodestilação das folhas frescas de *Siparuna guianensis* apresentou uma coloração levemente amarelada com aroma característico da espécie. De acordo com as análises químicas, foram identificados 41 compostos no OE, representando 94,12% da composição química total (TABELA SUPLEMENTAR 1). O composto majoritário identificado nesta espécie foi β -Mirceno (24,72%). Como constituintes principais destacam-se, por ordem de eluição: Germacreno D (8,16%), Biciclogermacreno (16,67%), α -Muurolol (3,92%) e Siparunona (5,18%).

3.2 Testes de toxicidade aguda em embriões de peixes

Os efeitos do OE de *Siparuna guianensis* nas taxas de mortalidade dos embriões/larvas de zebrafish ao longo do tempo são representados na Figura 1. Foi observada uma taxa de mortalidade dos embriões/larvas expostos às concentrações de 50, 100 e 200 μ g/ml do OE de 100%, nas primeiras 24 horas. No período de 120hpf à concentração 25 μ g/ml promoveu uma mortalidade de 35% das larvas. Em contrapartida, as concentrações entre 0,39 a 12,5 μ g/ml demonstram desenvolvimento normal, resultados semelhantes aos controles (E3; óleo de coco e DMSO 1%) ($p > 0,05$).

Figura 1 - Taxa de mortalidade (%) avaliados diariamente de 24 até 120h de embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostas a diferentes concentrações do óleo essencial das folhas de *Siparuna guianensis*.

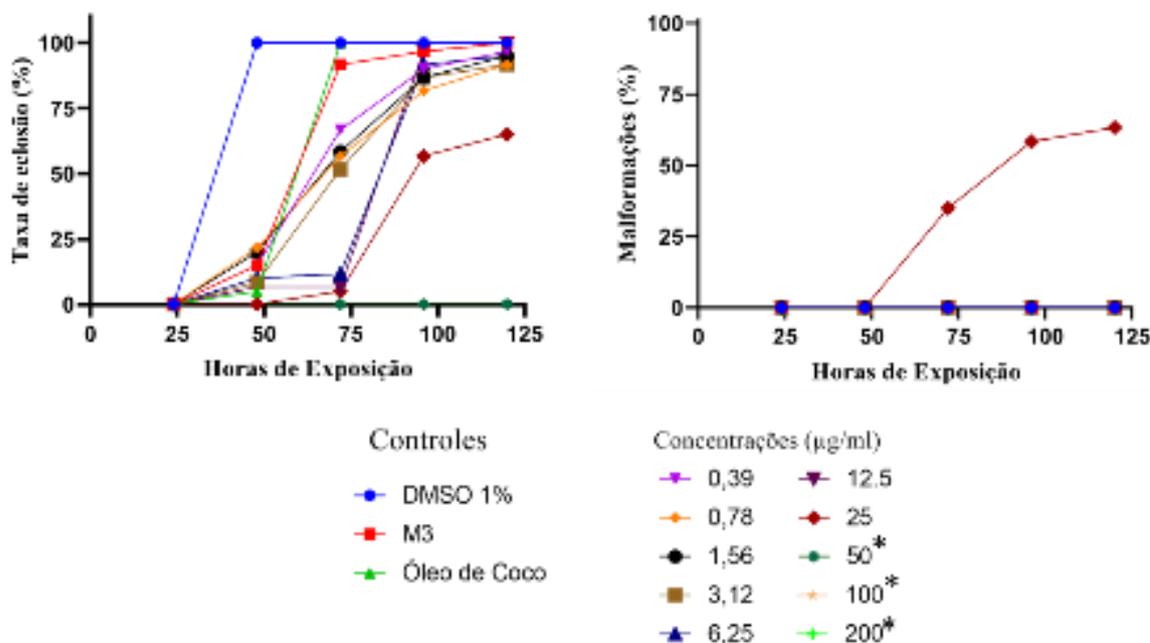


Legenda: Tempo de avaliação da exposição – 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós fertilização; concentrações do OE - 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200µg/ml; controles – DMSO1%; Meio de cultivo E3 (M3) e Óleo de coco. (n=3)

Fonte: Do autor (2022).

A taxa de eclosão dos embriões expostos ao OE de *Siparuna guianensis* variou ao longo do tempo (FIGURA 2A). As 72hpf foi notado um aumento na eclosão de embriões nas concentrações 0,39 a 3,12µg/ml entre 51% e 66%. As 96hpf as concentrações de 0,39 a 12,5µg/ml demonstram taxa de eclosão entre 82% a 97%. Verificando no último tempo de avaliação (120hpf) destas concentrações (0,39 a 3,12µg/ml) uma eclosão normal dos embriões apresentado aproximadamente 100%. A concentração 25µg/ml demonstrou uma taxa de 65% de eclosão, este valor está relacionado a mortalidade dos embriões observadas na figura 1.

Figura 2 - Taxa de eclosão (%) e malformação (%) de embriões/lavras de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao óleo essencial de *Siparuna guianensis* em diferentes concentrações ao longo de cinco dias.



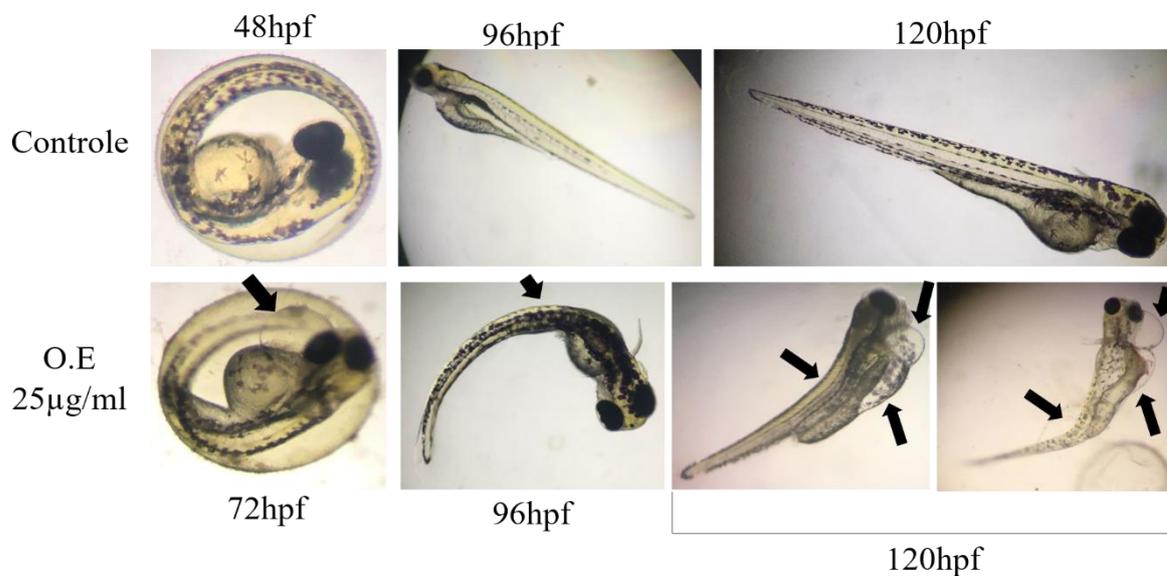
Legenda: (A) Taxa de eclosão e (B) Porcentagem de malformações. Tempo de avaliação da exposição – 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós fertilização (hpf); concentrações do OE - 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200µg/ml. *As concentrações de 200 a 50µg/ml provocaram mortalidade as 24hpf. Controles – DMSO1%; Meio de cultivo E3 (M3) e Óleo de coco. (n=3).

Fonte: Do autor (2022).

Em relação as malformações, desenvolvimento normal foi observado em embriões dos controles (Meio E3, DMSO 1% e óleo de coco) e nas concentrações de 0,39 a 12,5µg/ml (FIGURA 2B). A presença de malformações foi somente observada na concentração de 25µg/ml enquanto as concentrações superiores apresentaram 100% de mortalidade.

As malformações observadas para a concentração de 25µg/ml foram identificadas a partir das 72hpf, apresentado 35% dos embriões/larvas com alterações morfológicas, sendo 30% dos edemas localizados no saco vitelino e/ou pericárdio e 5% de lordose. As 96hpf a frequência foi de 58,33%, onde 35% eram edemas no saco vitelino e/ou pericárdio e 23,33% lordose. No último tempo de avaliação 63,33% das larvas apresentavam modificações, onde 38,33% encontrados no saco vitelino e/ou pericárdio e 25% lordose (FIGURA 3).

Figura 3 - Fotomicrografias de características morfológicas avaliadas na embriotoxicidade e malformação em zebrafish expostos a concentração de 25µg/ml do óleo essencial de *Siparuna guianensis* no período de 72, 96 e 120hpf.



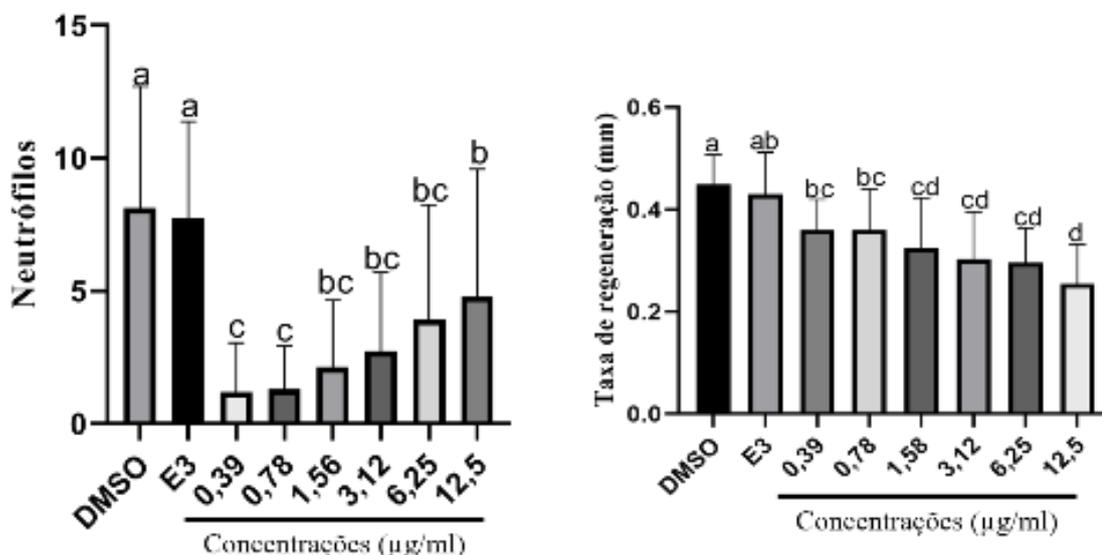
Legenda: Controle meio de cultivo E3: desenvolvimento normal em 48, 96 e 120hpf. OE de *Siparuna guianensis* a 25µg/ml: 72hpf com edema do pericárdio; 96hpf larva com lordose e as 120hpf as larvas apresentam lordose, edema localizado no saco vitelino e pericárdio.

Fonte: Do autor (2022).

3.3. Migração de neutrófilos e regeneração da nadadeira caudal

Os resultados obtidos mostraram uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de neutrófilos migrados para região lesionada na nadadeira caudal do zebrafish comparando aos controles (E3 e DMSO 1%). A maior redução foi observada nas concentrações menores, este efeito foi menos evidente conforme as concentrações do OE aumentaram, no entanto, a maior concentração testada também provocou uma redução significativa em relação aos controles (FIGURA 4A).

Figura 4 - Efeitos inibitórios no recrutamento de neutrófilos e a regeneração de cauda do óleo essencial de *Siparuna guianensis* após lesão na nadadeira caudal de larvas de zebrafish.



Legenda: Controles DMSO 1% e Meio de cultivo E3; concentrações do óleo essencial: 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25 e 12,5 µg/ml. (A) O número de neutrófilos migrado para o local da ferida foi contabilizado a 6hpa (horas pós amputação) (n=30) e (B) Regeneração da nadadeira caudal (n=20). Os dados são expressos como média ± DP. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

Fonte: Do autor (2022).

O número médio de neutrófilos no local da ferida nas larvas expostas ao meio de cultivo E3 e o DMSO 1% foram $7,7 \pm 3,64$ e $8,13 \pm 4,56$, respectivamente; enquanto que para as larvas tratadas com 0,39 e 0,79 µg/ml do OE foram $1,2 \pm 1,84$ e $1,3 \pm 1,62$, respectivamente e na maior concentração (12,5 µg/ml) observou-se $4,8 \pm 4,78$ neutrófilos (FIGURA 5).

Figura 5 - Fotomicrografias mostrando a migração dos neutrófilos em larvas expostas ao óleo essencial de *Siparuna guianensis*.



Legenda: (A) Imagem ilustrativa do corte na nadadeira caudal realizada as 72 horas após a amputação (hpa) em larva de zebrafish; (B) seta indica neutrófilos migrando para região lesionada em larva do controle E3 e (C) a seta indica neutrófilos na nadadeira caudal de larva tratada com 0,39 µg/ml do óleo essencial de *Siparuna guianensis* demonstrando redução na migração.

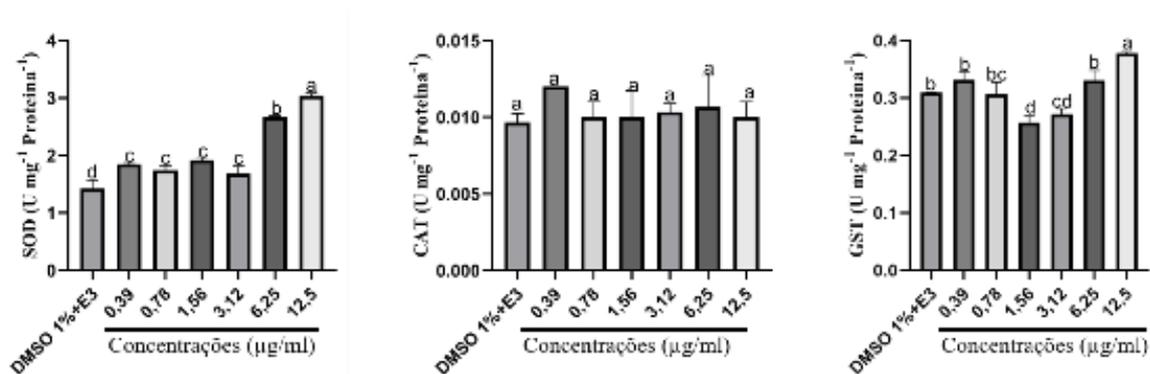
Fonte: Do autor (2022).

A taxa de regeneração da nadadeira caudal do zebrafish as 72hpa são representados na figura 4B. Os resultados demonstraram que a nadadeiras caudais tratadas com o OE foram regeneradas em menor intensidade do que no controle E3. As concentrações que se diferenciaram do DMSO 1% foram as 1,58 a 12,5µg/ml, apresentando menor taxa de regeneração da região lesionada.

3.4. Enzimas antioxidantes

Os resultados das atividades das enzimáticas de SOD, CAT e GST são apresentados na figura 6. A SOD (FIGURA 6A) apresentou maior atividade na concentração de 12,5µg/ml, seguida da concentração de 6,25µg/ml ($p < 0,05$), quando comparado ao controle DMSO 1% e as demais concentrações. Não houve diferença significativa na atividade da enzima CAT (FIGURA 6B) ($p > 0,05$). A atividade da GST (FIGURA 6C) foi significativamente menor na concentração de 1,56 e 3,12µg/ml quando comparada ao controle ($p < 0,05$).

Figura 6 - Mudança na atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GST em embriões/larvas de zebrafish expostos por 96hpf ao controle DMSO 1% e as diferentes concentrações do óleo essencial de *Siparuna guianensis*.

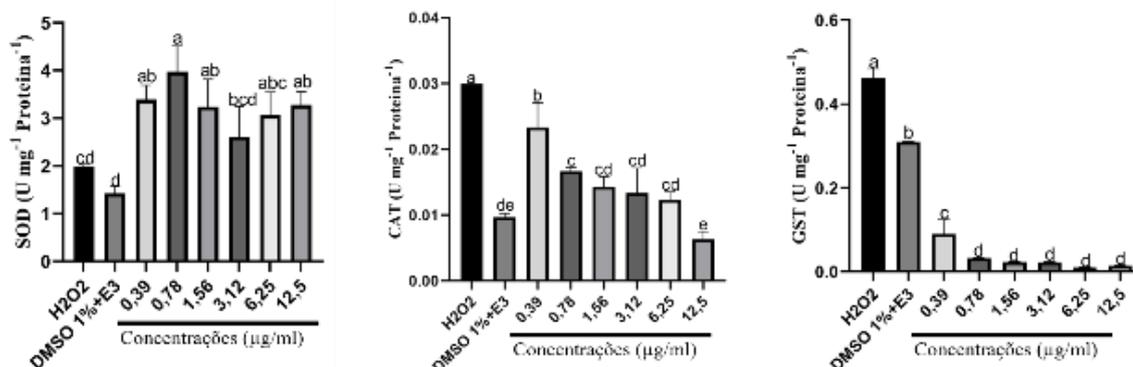


Legenda: (A) Enzima CAT- Catalase; (B) Enzima SOD – Superóxido dismutase e (C) Enzima GST – Glutathiona -s- transferase. As barras indicam a média ± DP de três repetições (n = 3). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos.

Fonte: Do autor (2022).

A enzima SOD apresentou um aumento na atividade em homogenatos expostos às diferentes concentrações do OE ($p < 0,05$) em relação o DMSO 1% e ao H₂O₂ (FIGURA 7A). As atividades da CAT e GST foram significativamente maiores nas larvas expostas à H₂O₂ quando comparadas aos demais tratamentos e ao controle (FIGURA 7B e C). A atividade da GST foi reduzida na presença de diferentes concentrações do OE.

Figura 7 - Mudança na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST em embriões/larvas de zebrafish expostos por 96hpf ao DMSO 1% e as diferentes concentrações do óleo essencial de *Siparuna guianensis* e induzidas ao efeito tóxico do peróxido de hidrogênio.



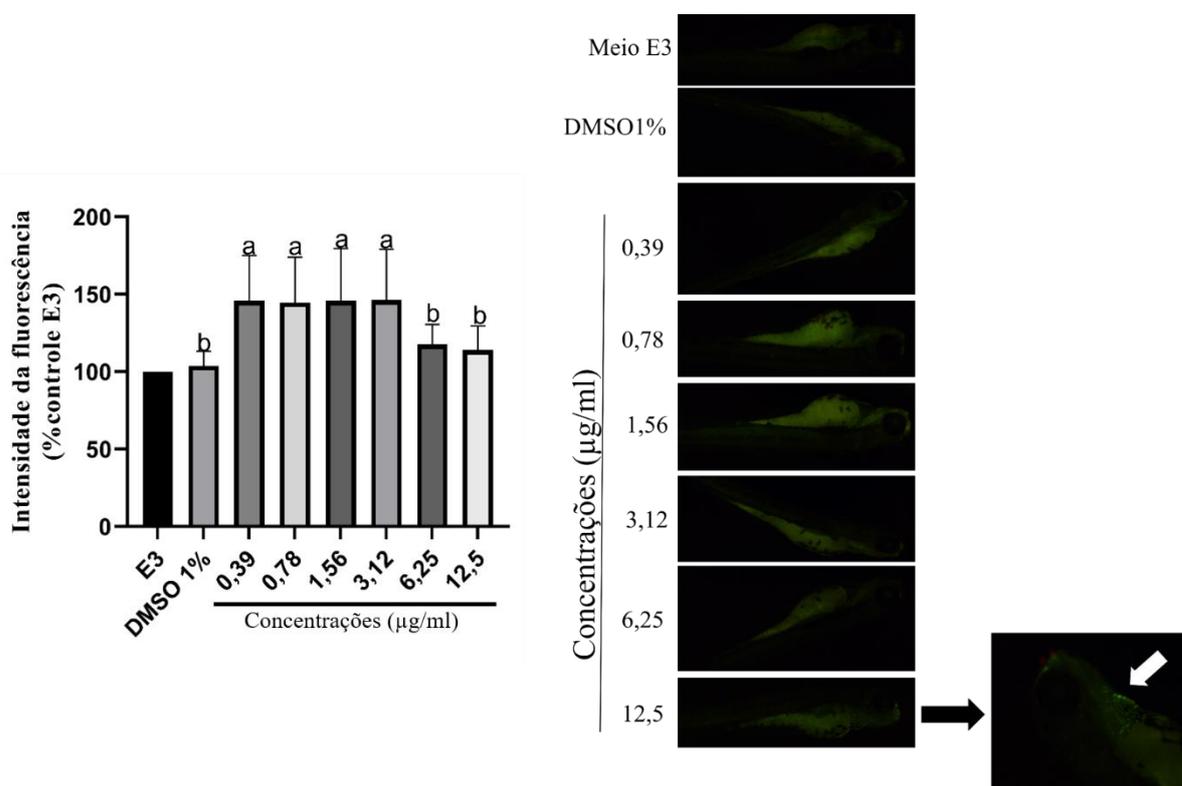
Legenda: (A) Enzima CAT- Catalase; (B) Enzima SOD – Superóxido dismutase e (C) Enzima GST – Glutathiona -s- transferase. As barras indicam a média \pm DP de três repetições (n = 3). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos.

Fonte: Do autor (2022).

3.5. Apoptose celular

No teste utilizando o laranja de acridina como marcador de células apoptóticas observou-se que as concentrações entre 0,39 a 3,12µg/ml apresentaram à intensidade de fluorescência significativamente maior (p<0,05) que no grupo controle (FIGURA 8), o que indica um aumento na apoptose. Por outro lado, a concentração 12,5µg/ml em todas fotomicrografias (n=15) avaliadas apresentaram células apoptóticas na região do coração (p<0,05).

Figura 8 - Intensidade de fluorescência durante a apoptose celular em larvas de zebrafish expostas por 96hpf aos controles e as diferentes concentrações do óleo essencial de *Siparuna guianensis*.

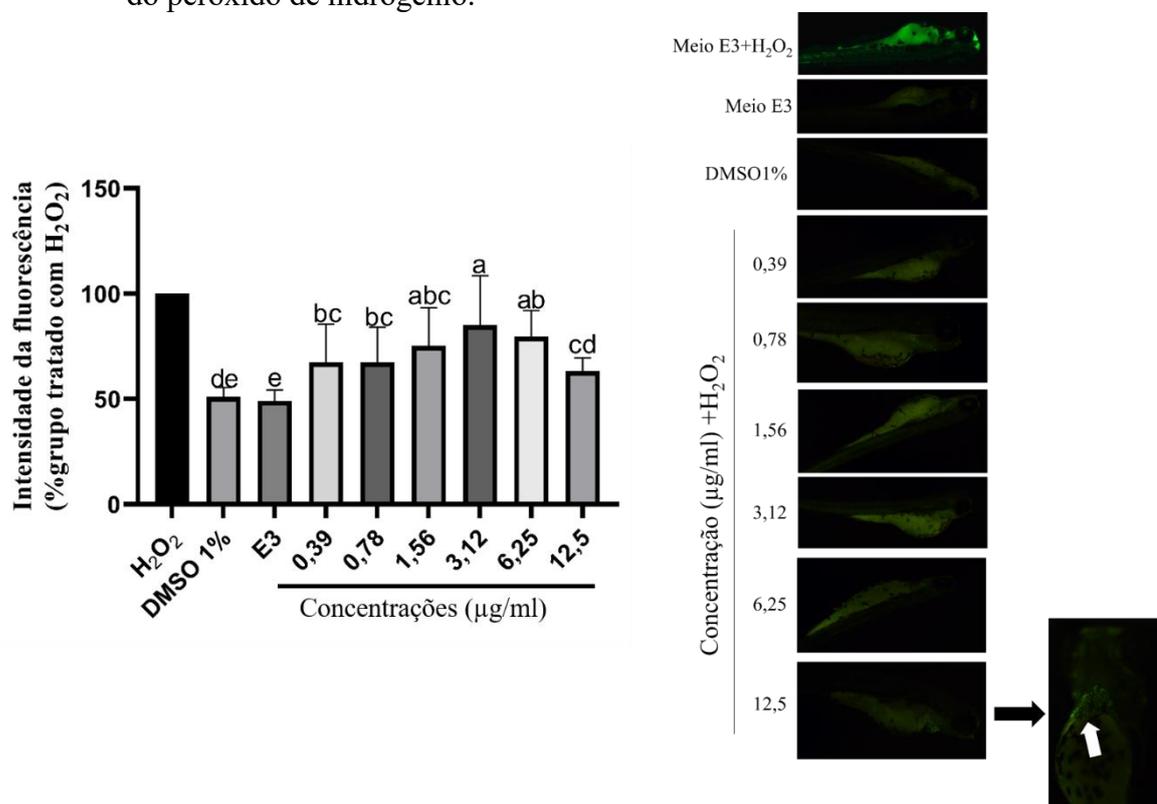


Legenda: Controles – E3 e DMSO 1%; Concentrações: 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25 e 12,5 µg/ml. (A) % da intensidade de fluorescência; (B) Fotomicrografia de larvas coradas com laranja de acridina na objetiva de 4X. Seta indica células apoptóticas na região do coração. As barras indicam a média ± DP. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos. (n=15)

Fonte: Do autor (2022).

No ensaio de apoptose induzido ao efeito tóxico por H_2O_2 o OE não apresentou efeito protetor contra apoptose celular comparado ao grupo controle, entretanto, mostrou uma redução significativa ($p < 0,05$) de maneira independente da concentração do OE em relação ao controle H_2O_2 . (FIGURA 9 A e B). Foi observado que a concentração de 3,12 µg/ml exibiu a maior intensidade de fluorescência, tornando o pico máximo do apoptose em larvas tratadas com o OE. A concentração de 12,5 µg/ml apresentou o mesmo efeito cardiotoxico que no teste de células apoptóticas sem a indução do H_2O_2 em todas as fotomicrográficas (n=15) apresentaram morte celular na área do coração (Fig. 9 B).

Figura 9 - Porcentagem da Intensidade de fluorescência durante a apoptose celular em embriões/larvas de zebrafish expostos por 96hpf aos controles e as diferentes concentrações do óleo essencial de *Siparuna guianensis* induzidas ao efeito tóxico do peróxido de hidrogênio.



Legenda: Controles – E3 e DMSO 1%. Peróxido de hidrogênio -H₂O₂. Concentrações: 0,39, 0,78, 1,56, 3,12, 6,25 e 12,5µg/ml. (A) % da intensidade de fluorescência; (B) Fotomicrografia de larvas coradas com laranja de acridina na objetiva de 4X. Seta indica células apoptóticas na região do coração. As barras indicam a média ± DP. Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) entre os grupos. (n=15).

Fonte: Do autor (2022).

4. DISCUSSÃO

Na análise de cromatografia do OE obtido das folhas de *Siparuna guianensis* relevou que o monoterpene β -Mirceno (24,72%) foi identificado como composto majoritário. Como constituintes principais destacam-se, por ordem de eluição: Germacreno D (8,16%), Bicyclogermacreno (16,67%), α -Muurolol (3,92%) e Siparunona (5,18%). O β -Mirceno foi identificado em outros trabalhos como composto majoritário no OE extraído das folhas de *S. guianensis* (AGUIAR et al., 2015; FERREIRA et al., 2020; LOURENÇO et al., 2018; MOURA et al., 2021; PORTELLA et al., 2014), apresentando perfis químicos e concentrações diferentes.

Ferreira et al. (2017) verificaram que folhas de *Siparuna guianensis* coletadas em Gurupi (Tocantins, Brasil) na estação da primavera extraídas por hidrodestilação em aparelho Clevenger no período duas horas o composto majoritário foi o β -Mirceno (34,67%), seguido por Epicurzerenona (18,16%), entretanto, no trabalho realizado Andrade et al. (2015) foi

identificado no OE de folhas coletadas em Lavras (Minas Gerais, Brasil) no mês de fevereiro extraído por hidrodestilação usando aparelho Clevenger por duas horas a presença Bicyclogermacreno (16,71%), β -Mirceno (13,14%) e Germacreno D (8,68%). Esta diferença no perfil químico do OE da mesma espécie pode estar relacionada a diversos fatores como: localização geográfica, sazonalidade, umidade, fotoperíodo, irradiação, genótipo, diferentes estações do ano, período de coleta, secagem, armazenamento, condições agrônômicas, idade do material vegetal e o método de extração (CONEGUNDES et al., 2021; LOURENÇO et al., 2018).

A toxicidade do OE extraído por hidrodestilação foi identificado com alta eficácia sobre *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* com LC_{50} de 0,98 e 0,89 μ g/mL, respectivamente (AGUIAR et al., 2015). O OE também demonstrou ser tóxico contra *Spodoptera frugiperda* (LC_{50} 8,09 μ L/ml) e *Anticarsia gemmatalis* (LC_{50} 2,45 μ L/ml) (LOURENÇO et al., 2018). Neste presente trabalho, observamos que as concentrações de 0,39 a 6,25 μ g/mL foram seguras para o zebrafish através do teste de toxicidade aguda em embriões e na apoptose celular. Comparando os resultados de Aguiar et al. (2015) com o presente trabalho, pode-se verificar que o OE foi mais tóxico para as espécies *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* do que para o zebrafish, onde as concentrações tóxicas foram acima de 12,5 μ g/mL, portanto o uso do OE como inseticida pode ser uma ferramenta promissora, que não ocasiona mortalidade e teratogenicidade no zebrafish nas concentrações estudadas.

Ferreira et al. (2019), verificaram a toxicidade de nanopartículas de quitosana contendo o OE de *Siparuna guianensis* sobre embriões de zebrafish em 24 a 96 horas de exposição, notando à mortalidade na concentração de 450 μ g/ml, não sendo observadas alterações embrionárias em concentrações inferiores a 100 μ g/ml, estes autores também identificaram atividade larvicida da nanopartículas de quitosana contendo o OE contra mosquito *Aedes aegypti*. Moura et al. (2021) investigaram microcapsulados a base de amido de mandioca contendo OE de *S. guianensis*, sendo observado baixa toxicidade em embriões/larvas de zebrafish expostos até as 96hpf nas concentrações de 0,100; 0,171; 0,295 e 0,507mg/cm³, no entanto, não foi investigando os efeitos toxicológicos do OE puro da *S. guianensis* sobre embriões/larvas de zebrafish.

Baixa toxicidade identificada no nanoparticulado de quitosana sobre embriões/lavras em relação ao óleo puro, pode estar relacionada ao mecanismo de ação das nanopartículas, que são sistemas utilizados como veículos de liberação controlada de substâncias, este mecanismo melhora a estabilidade e absorção dos bioativos e protege de reações adversas, além de aumentar à solubilidade do OE em água e reduz sua citotoxicidade (COSTA et al., 2021; RAO;

SOWBHAGYA, 2017).

A inflamação, é um processo biológico altamente regulado, permite que o sistema imunológico elimine os estímulos prejudiciais e inicie a fase de cicatrização (YANG et al., 2018). Durante o processo de inflamação, sinalizações moleculares determinam se as células inflamatórias sofreram migração, proliferação, reparo, diferenciação, ativação ou liberação. No entanto, a inflamação desordenada pode levar a consequências patológicas (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; RIELLA et al., 2012).

Na resposta ao processo inflamatório, os neutrófilos são recrutados para o local da infecção, uma das funções dos neutrófilos são fagocitar patógenos e destruição intracelular (FARRERA; FADEEL, 2013; HENRY et al., 2013). Além disso, após a neutralização do patógeno os neutrófilos devem ser removidos para que ocorra a finalização da inflamação, em caso de persistência dos neutrófilos como na inflamação crônica eles podem causar danos irreversíveis aos tecidos pela liberação de grânulos tóxicos. Portanto, estratégias de descoberta de fármacos devem ser desenvolvidas para tratamento da inflamação, promovendo a inibição da produção ou ação dos mediadores e a inibição do processo de recrutamento dos neutrófilos (FREITAS et al., 2019; YANG et al., 2018).

No presente estudo, verificamos o efeito anti-inflamatório do OE através da redução da migração dos neutrófilos na nadadeira caudal lesionada do zebrafish, onde foi observada a redução em todas as concentrações testadas comparando aos grupos controles. O efeito anti-inflamatório dos OE pode estar atribuído a sua interação como cascata de sinalização envolvendo as citocinas e atuando em fatores de regulação da transcrição e da expressão gênica pró-inflamatória. Os OE e/ou seus componentes majoritários isolados pode também atuar na inibição da lipoxigenase, COX-2, prostaglandinas (PGE2) e na síntese de leucotrienos (MIGUEL, 2010).

No OE das folhas de *Siparuna guianensis* encontra-se como compostos majoritários β -Mirceno (isômero do Mirceno - 7-metil-3-metileno-1,6-octadieno), é um composto acíclico, olefínico e de cheiro agradável, sendo considerado *in vitro* um poderoso agente anti-inflamatório (SURENDRAN et al., 2021), esta capacidade de diminuir a inflamação ocorre via prostaglandina E₂ (LORENZETTI et al., 1991). No trabalho de Souza et al. (2003), foi verificado que β -Mirceno inibiu a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) incluído a migração de neutrófilos (nas doses de 50 mg/kg teve uma redução de 36% e 400 mg/kg diminuiu a migração em 18%) e a produção óxido nítrico (NO) em modelos de pleurisia em camundongos, neste mesmo trabalho foi verificado inibição de 91% da citocina IL-4. Rufino et al. (2015) verificaram que o Mirceno inibe efetivamente a produção NO, a expressão de

genes inflamatórios (iNOS) e Fator Nuclear- κ B (NF- κ B) induzida por IL-1 β .

A regeneração é um processo pelo qual estruturas danificadas ou perdidas são perfeitamente ou parcialmente substituídas. Este teste permite avaliar em curto prazo a taxa de regeneração da nadadeira caudal de larva de zebrafish lecionada, leva-se em torno de três dias pós amputação (72hpa). Quanto maior o valor desta variável significa que o tratamento testado é eficaz (MATHEW; ANDREASEN; TANGUAY, 2006; OPEDAL; GOLDSMITH, 2010; SUN et al., 2019; YOSHINARI; KAWAKAMI, 2011). Portanto, no presente estudo, observou-se que o OE de *Siparuna guianensis* reduziu significativamente o recrutamento de neutrófilos em direção ao local lesionado ao mesmo tempo o óleo reduziu a taxa de regeneração da nadadeira caudal. A redução da migração de neutrófilos leva a uma cicatrização epidérmica mais rápida quando medida pelo fechamento da ferida, indicando que estas células podem desempenhar um papel inibitório no estágio de regeneração (HE et al., 2020; LI et al., 2012).

As enzimas antioxidantes são geralmente usadas para avaliar os níveis de estresse oxidativo (XIA, et al., 2017a). Na análise da CAT e GST pode verificar-se que OE não exibiu influência sobre a atividade das enzimas antioxidantes no modelo zebrafish, no entanto, nos testes para verificar o efeito protetor do OE contra a toxicidade induzida por H₂O₂, demonstrou uma boa atividade protetora nas análises CAT e GST apresentando uma redução gradual, porém a enzima SOD exibiu uma alta atividade comparando aos controles. Portanto, no presente trabalho, o aumento da SOD pode estar relacionado ao esforço das larvas de zebrafish para eliminar os radicais livres produzidos pela exposição ao H₂O₂. Estes resultados podem estar envolvidos na forma como as enzimas atuam: a SOD, é uma enzima de defesa primária contra o estresse oxidativo que pode agir convertendo o radical superóxido (O₂^{•-}) em H₂O₂ (XIONG et al., 2019). A CAT, demonstra a capacidade de catalisar o H₂O₂ em água e oxigênio com alto desempenho (MUTHULAKSHMI et al., 2018). A GST, uma enzima metabólica de desintoxicação de fase II, atuando catalisando a ligação de grupos eletrolíticos de xenobióticos com grupos sulfidríla de glutathione redutase (GSH) (HUANG et al., 2020).

A apoptose celular é um processo fisiológico que pode ocorrer naturalmente durante a embriogênese e como resultado de dano ou estresse celular. Este processo serve para eliminar células desnecessárias, sendo um sistema altamente programado, podendo ser capaz de regular muitos processos de desenvolvimento, incluindo morfogênese, remoção de estruturas vestigiais, eliminação de células danosas e regulação no número de células (XIA et al., 2017a). A indução de apoptose é um resultado desejado na terapia anticâncer, pois as células cancerígenas agem não apenas interferindo no padrão normal de crescimento celular, mas também evita as vias de mortalidade celular (IMAN et al., 2017; SILVA; VALE; SANTOS,

2008).

No trabalho realizado por Iman et al. (2017), avaliaram o efeito da girinimbina um composto isolado da espécie *Murraya koenigii* (L.) Spreng. (Rutaceae) na indução de apoptose em linhagem de células de adenocarcinoma colorretal humana (HT-29) e em embriões de zebrafish. Neste estudo verificaram a indução de apoptose ocorre de maneira dependente do tempo (12, 24 e 48 horas) em células HT-29 tratadas com girinimbina na concentração $4,79 \pm 0,74 \mu\text{g/mL}$. No teste *in vivo* utilizando o modelo zebrafish, Iman et al. (2017) observaram um aumento de células mortas significativamente maior na região da cauda de embriões (48 e 72hpf) tratadas com $20 \mu\text{g/mL}$ de girinimbina comparando ao controle (DMSO 0,1%), além disso, o teste de Tunel detectou também mais células apoptóticas em torno das caudas dos embriões expostos à girinimbina, baseado nos resultados do aumento da apoptose os autores sugeriram a potencial atividade anticarcinogênica do composto isolado da espécie *Murraya koenigii*. No presente estudo, o OE apresentou aumento na atividade apoptótica nas menores concentrações (0,39; 0,78; 1,56 e $3,12 \mu\text{g/ml}$). Este aumento na atividade apoptótica poderia indicar um potencial na atividade anticarcinogênica do OE de *Siparuna guianensis*, no entanto, faz se necessário a realização futura de testes em linhagens com células cancerígenas.

Na análise empregada o H_2O_2 para induz o estresse celular nas lavras o OE de *Siparuna guianensis* não mostrou efeito protetor contra apoptose celular comparado aos grupos controles, entretanto, apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) de maneira independente da concentração do OE em relação ao controle H_2O_2 . A existência de apoptose nas larvas de zebrafish tratadas com meio E3 e DMSO 1% confirma que este processo fisiológico é normal durante o desenvolvimento do animal (XIA et al., 2017a).

A concentração $12,5 \mu\text{g/ml}$ não provocou sinais de malformações clínicas no teste de toxicidade aguda, mais, no entanto, na análise de apoptose com o corante laranja de acridina foi evidenciado aumento das células apoptóticas na região do coração. A vantagem de utilizar o modelo zebrafish em análise de toxicológica é que o coração é visível e transparente ao longo dos estágios embrionários e larvais iniciais, o animal é sensível à produtos químicos e faz-se necessário a utilização de pequena quantidade do material testado (BAUER; MALLY; LIEDTKE, 2021; NGUYEN et al., 2020).

5. CONCLUSÃO

O OE apresenta atividade anti-inflamatório através da redução da migração dos neutrófilos e efeito protetor contra estresse oxidativo pelas enzimas antioxidantes GST e CAT,

sendo observado este efeito em concentrações menores das que apresentaram mortalidade e teratogenicidade em estágios iniciais de desenvolvimento do zebrafish. A concentração 12,5µg/ml demonstrou o surgimento de células apoptóticas na região do coração.

Portanto, este estudo fornece uma base científica no estudo toxicológico possível efeito terapêutico do OE de *Siparuna guianensis* no que diz respeito a análise utilizando o modelo zebrafish, ressaltando a necessidade de estudo futuros com o OE, afim de verificar o efeito anticarcinogênico e verificar o efeito anti-inflamatório dos compostos insolados.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e a Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured publishing corporation Carol Stream, IL. 2007.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3). Acesso em: 12 mar. 2022.

AGUIAR, R. W. S. et al. Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Plos One**, v. 10, n.2, p. e0116765., 2015.

ALCÂNTARA, A. L. et al. Evaluation of antimicrobial activity of oil extracted in capsule of eucalyptus urograndis: an organic contribution to the pharmaceutical industry. **Id on Line Revista de psicologia**, v. 13, n. 43, p. 455-468, 2019.

ALMEIDA, M. A.de et al. Avaliação do perfil fitoquímico e do potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.17, n.2, p.252-270, abr./jun. 2021.

ANDRADE, M. A. et al. Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n.444, p.1-8, 2016.

ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 189-194, jan./mar. 2015.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 43, n.1, p.385-406, Sept. 2012.

AVDESH, A. et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. **JoVE**, n.69, p. e4196. Nov. 2012.

BARROS, D. B. S. et al. Tempo de extração para óleo essencial de *Croton* spp.(Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 37-40, 2018.

BASNET, R. M.; GUARIENTI, M.; MEMO, M. Zebrafish embryo as an *in vivo* model for behavioral and pharmacological characterization of methylxanthine drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 596, 2017.

BAUER, B.; MALLY, A.; LIEDTKE, D. Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.24, p.13417, 2021.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n.1, p. 276-287, Nov. 1971. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8). Acesso em 07 jan. 2022.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p.248-254, May1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>. Acesso em 07 jan. 2022.

CONEGUNDES, J. L. M. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Siparuna guianensis* Aublet, an amazonian plant traditionally used by indigenous communities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113344, Jan. 2021.

COSTA, Í. C. et al. Characterization of polymeric nanoparticles filled with *Piper nigrum* essential oil by atomic force microscopy **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. e12981, 2021.

DINIZ, J. A. et al. Chemical composition of essential oils of different *Siparuna guianensis* chemotypes and their acaricidal activity against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): influence of α -bisabolol. **International Journal of Acarology**, v. 48, 1, p.36-42, 2022.

FARRERA, C.; FADEEL, B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. **Journal of immunology**, v. 191, n.5, p. 2647-2656, 2013.

FÉLIX, L. M. et al. Ketamine-induced oxidative stress at different developmental stages of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **RSC Advances**, v. 6, n. 66, p. 61254-61266, 2016.

FERREIRA, R. M. dos A. et al. Nano-emulsification enhances the larvicidal potential of the essential oil of *Siparuna guianensis* (Laurales: Siparunaceae) against *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 3, p. 788-796, May 2020.

FERREIRA, T. P. Influence of seasonality on the yield and composition of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet. **African Journal of Biotechnology**, v.16, n. 29, p. 1611-1618, July 2017.

FERREIRA, T. P. et al. Prolonged mosquitocidal activity of *Siparuna guianensis* essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007624, 2019.

FREITAS, P. R. et al. Abordagens terapêuticas nas doenças inflamatórias: uma revisão. **Interfaces**, v. 7, n. 2, 318-324, 2019.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in enzymology**, v. 77, p. 398-405, 1981. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77053-8). Acesso em 07 jan. 2022.

HASEGAWA, T. et al. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. **Elife**, v. 6, p. e22716, 2017.

HE, M. et al. Ginsenoside Rg1 Acts as a selective glucocorticoid receptor agonist with anti-inflammatory action without affecting tissue regeneration in zebrafish larvae, **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1107, 2020.

HENRY, K. M. et al. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 4, p. 633-642. Oct. 2013.

HUANG, X. et al. Evaluation of the oxidative stress status in zebrafish (*Danio rerio*) liver induced by three typical organic UV filters (BP-4, PABA and PBSA). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 2, p.651, 2020.

IMAN, V. et al. Anticancer and anti-inflammatory activities of girinimbine isolated from *Murraya koenigii*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 103-121, 2017.

KANG, M. C. et al. Antioxidant activity of polysaccharide purified from *Acanthopanax koreanum* Nakai stems *in vitro* and *in vivo* zebrafish model. **Carbohydrate polymers**, v. 127, p. 38-46, Aug. 2015.

KAWAKAMI, A.; FUKAZAWA, T.; TAKEDA, H. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. **Developmental dynamics:an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 231, n. 4, p. 693-699, Dec. 2004.

KJØRSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I. **Egg Quality in Fishes**. in: Blaxter, J. H. S., Southward, A. J. (Eds.), *Advances in Marine Biology*. Academic Press, pp. 71-113, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60199-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60199-6). Acesso em 07 jan. 2022.

LE GUYADER, D. et al. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 132-141, 2008.

LI, L. et al. Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during

zebrafish tail fin regeneration*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 30, p. 25353-25360, 2012.

LORENÇONI, M. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 252, p. 112562, Apr. 2020.

LORENZETTI, B. B. et al. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 1, p. 43-48, Aug. 1991.

LOURENÇO, A. M. et al. Essential oil of *Siparuna guianensis* as an alternative tool for improved lepidopteran control and resistance management practices. **Scientific Reports**, v. 8, n.1, p. 7215, 2018.

MARQUES, G. R. et al. Spray-dried thyme essential oil microparticles using different polymeric matrices. **Drying Technology**, v. 39, n. 12, p. 1-12, 2021.

MATHEW, L. K.; ANDREASEN, E. A.; TANGUAY, R. L. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits regenerative growth. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 257-265, Jan. 2006.

MELO, D. C.de et al. Anticariogenic and antimycobacterial activities of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 9, n. 1, Jan./ Mar. 2017.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n.12, 9252-9287, 2010.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p.213-220, 2016.

MOURA, W.de S. et al. Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, London, v. 146, p. 112142, Apr. 2020.

MOURA, W. S. et al. Cassava starch-based essential oil microparticles preparations: Functionalities in mosquito control and selectivity against non-target organisms. **Industrial Crops and Products**, London, n. 162, p. 113289, Apr. 2021.

MUTHULAKSHMI, S. et al. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. **Chemosphere**, v. 198, p.111-121, May 2018.

NGUYEN, T. H. et al. Anti-Inflammatory and antioxidant properties of the ethanol extract of *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish. **Antioxidants**, v. 9, n. 3, p. 192, 2020.

NIST, N. **EPA/NIH Mass Spectral Library**. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, 2014.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **Test No. 236:** Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2013 Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>. Acesso 01 de fev. 2022.

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

PAIVA, I. M. et al. Behavioral plasticity and gene regulation in the brain during an intermittent ethanol exposure in adult zebrafish population. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 192, p. 172909, May 2020.

POLEDNIK, K. M.; KOCH, A. C.; FELZIEN, L. K. Effects of essential oil from *Thymus vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. **Zebrafish**, v.15, n. 4, p. 361-371, Aug. 2018.

PORTELLA, A. C. F. et al. Physical and chemical characterization of essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 5, p. 844-849, 2014.

RAO, P. J.; SOWBHAGYA, H. B. Nanoencapsulation of spice oils. handbook of food bioengineering, v. 7, p. 179-207, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00007-2>. Acesso em:25 de fev. 2022.

RIELLA, K. R. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, n.143, v. 2, p. 656-663, Sept. 2012.

RUFINO, A. T. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 141-150, Mar. 2015.

SANTOS, D. et al. Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. **Chemosphere**, v. 261, p. 127748, Dec. 2020.

SANTOS, M.de F.; IORI, P. Medicinal plants in the introduction of environmental education in school: a review. **Conexão Ciência**, v. 12, n. 2, p. 132-138. 2017.

SANTOS, M. de F. et al. Stomatal analysis in leaves of *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae). **Research, Society and Development**, v. 11, n.1, p.e17111124722, 2022.

SILVA, M. T.; VALE, A. do; SANTOS, N. M. dos. Fish and apoptosis: studies in disease and pharmaceutical design. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 2, p. 170-183, 2008.
SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C. M. O.;SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, cap. 18, p.467-496, 2003.

SOUZA, M. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 582-586, Aug. 2003.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, Feb.2008.

SUN, L. et al. Effects of 17 α -ethinylestradiol on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. **Science of The Total Environment**, v. 653, p. 10-22, Feb. 2019.

SURENDRAN, S. et al. Myrcene-what are the potential health benefits of this flavouring and aroma agent?. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 1-14, July 2021.

TEAME, T. et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal frontiers : the review magazine of animal agriculture**, n. 9, v. 3, p. 68-77, July 2019.

ТКАЧЁВ, А.В. Исследование летучих веществ растений. Новосибирск: Офсет, 969 с, 2008.

VALENTINI, C. M. A.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet ("negramina"): a review. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2010.

VALENTINI, C. M. A. et al. Annual variation of yield and chemical composition of volatile components of *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1506-1509, 2010.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963. Dipinível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X). Acesso em: 02 de mar. 2022.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. Medicinal plants: safe cure?. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, June 2005.

VIROTE, B. do C. R. et al. Obesity induction in adult zebrafish leads to negative reproduction and offspring effects. **Reproduction**, v. 160, n. 6, p. 833-842, 2020.

WALTERS, K. B. et al. Muscle degeneration and leukocyte infiltration caused by mutation of zebrafish Fad24. **Developmental dynamics**, v. 238, n. 1, p. 86-99, Jan. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programme on traditional medicine. Regulatory situation of herbal medicines : a worldwide review**. World Health Organization, 1998. Diponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801>. Acesso em 12 mar. 2022.

XIA, Q. et al. A developmental toxicity assay of *Carpesii Fructus* on zebrafish embryos/larvae. **Toxicology Research (Camb)**, v. 6, n. 4, p. 460-467, July 2017a.

XIA, Q. et al. Assay for the developmental toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to zebrafish embryos/larvae. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 71-81, Jan. 2017b.

XIONG, G. et al. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish Shellfish Immunol**, v. 95, p. 399-410, Dec. 2019.

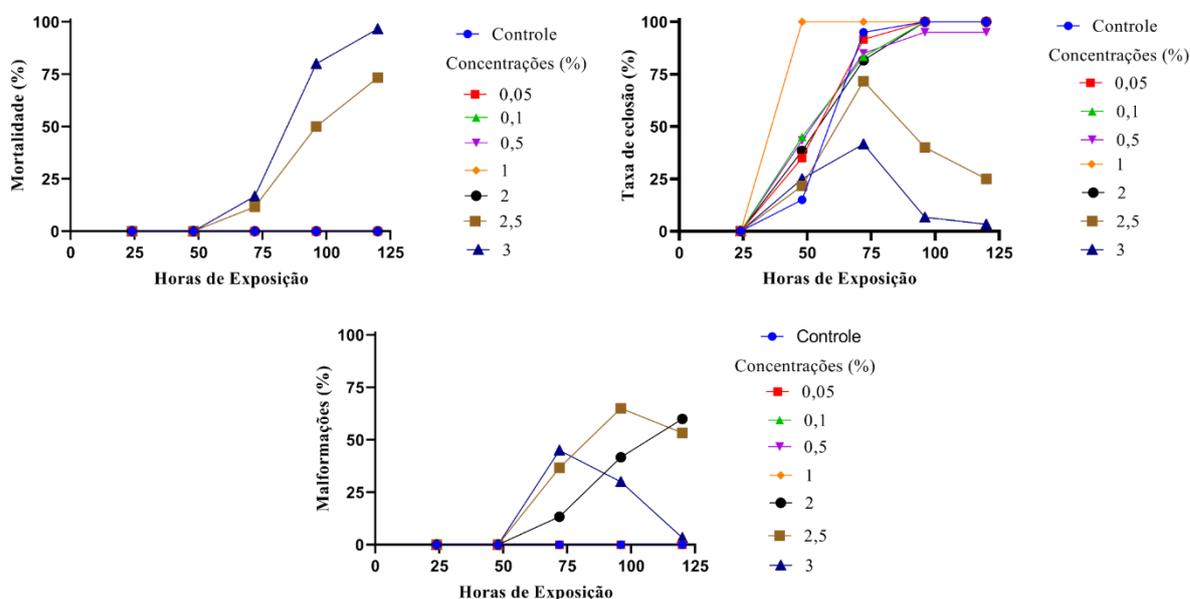
YANG, Y. et al. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an *in vivo* zebrafish model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 496, n. 2, p. 763-769, Feb. 2018.

YOSHINARI, N.; KAWAKAMI, A. Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. **The Biological bulletin**, v. 221, n. 1, p. 62-78. Aug. 2011.

ZHAO, C. et al. Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 62, p. 152959, Sept. 2019.

DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

Figura 1 - Desenvolvimento dos embriões e larvas zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao Dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,5; 1; 2; 2,5 e 3 %) em triplicata.



Legenda: (A) %Taxa de mortalidade; (B) Taxa de eclosão e (D) Porcentagem de malformações em embriões e larvas de zebrafish (n=3)

Fonte: Do autor (2022).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de folhas frescas de *Siparuna guianensis*

Compostos Identificados	IR _{Calc}	IR _{lit}	TR	Area%±DP
α -Pino	932	932	4,76	1,97 ± 0,03
Canfeno	946	947	5,11	0,09 ± 0,00
β -Pino	975	975	5,82	0,93 ± 0,01
β-Mirceno	991	991	6,19	24,72 ± 0,11
α -Felandreno	1005	1004	6,57	0,17 ± 0,00
3-Careno	1010	1010	6,75	0,70 ± 0,01
Limoneno	1027	1028	7,31	1,45 ± 0,01
<i>Cis</i> - β -Ocimeno	1035	1038	7,61	0,25 ± 0,00
<i>Trans</i> - β -Ocimeno	1045	1048	7,95	0,21 ± 0,00
NI	1102	-	9,87	0,27 ± 0,01
NI	1267	Nist	16,76	0,47 ± 0,00
2-Undecanono	1293	1293	17,92	2,04 ± 0,01
δ -Elemeno	1336	1436	19,74	0,60 ± 0,00
α -Copaeno	1374	1374	21,40	0,17 ± 0,00
β -Bourboneno	1383	1387	21,79	0,29 ± 0,00
β -Elemeno	1391	1390	22,13	2,02 ± 0,00
<i>E</i> -Cariofileno	1417	1417	23,24	0,86 ± 0,00
γ -Elemeno	1432	1434	23,89	0,18 ± 0,00

						“continua”
α -Humuleno	1451	1452	24,68	2,92	±	0,01
<i>allo</i> -aromadendreno	1458	1458	24,98	0,14	±	0,02
NI	1472	-	25,57	0,14	±	0,00
<i>Trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1476	1475	25,70	0,13	±	0,00
Germacreno D	1479	1480	25,87	8,16	±	0,02
β -Selineno	1484	1489	26,06	0,17	±	0,00
<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1489	1493	26,30	0,21	±	0,01
Biciclogermacreno	1495	1500	26,54	16,67	±	0,04
Curzereno	1499	1499	26,69	0,15	±	0,00
Germacreno A	1502	1507	26,85	0,48	±	0,00
γ -Cadineno	1513	1513	27,29	2,06	±	0,02
δ -Cadineno	1522	1522	27,65	1,23	±	0,00
Elemol	1548	1548	28,68	0,41	±	0,00
Germacreno B	1550	1559	28,78	2,30	±	0,01
(-)-Espathulenol	1554	MS,CG	28,94	1,15	±	0,00
NI	1564	-	29,35	0,22	±	0,00
NI	1569	-	29,53	0,28	±	0,00
Espathulenol	1575	1577	29,78	2,59	±	0,02
NI	1581	-	30,02	0,52	±	0,00
NI	1585	-	30,21	0,29	±	0,01
NI	1589	-	30,35	0,43	±	0,00
Humuleno-2,3-epóxido	1596	1604	30,64	2,63	±	0,01
β -Elemenona	1598	1604	30,73	1,07	±	0,02
Epóxido humuleno II	1606	1608	31,04	0,60	±	0,00
NI	1609	-	31,13	0,55	±	0,00
1-epi-cubenol	1626	1626	31,81	0,26	±	0,00
<i>Iso</i> -espatulenol	1636	1640	32,20	0,91	±	0,00
Cubenol	1640	1645	32,35	1,22	±	0,01
α-Muurolol	1645	1644	32,53	3,92	±	0,03
α -Cadinol	1653	1652	32,83	1,90	±	0,01
Siparunona	1660	1663	33,12	5,18	±	0,03
NI	1672	-	33,59	0,44	±	0,00
NI	1682	-	33,95	0,75	±	0,00
Atractilona	1689	MS, CG	34,22	0,75	±	0,01
				Total		94,12%

IR_{Calc}: Índices de retenção relativos à série de n-alcenos (C8-C20) na coluna HP-5MS em ordem de eluição. IR_{lit}: índices de retenção linear relatado na literatura TR: tempo de retenção. MS: espectrometria de massa, CG: Cromatografia gasosa. – ou NI: Não identificado. Em negrito foram destacados os compostos com teor superior a 3%. DP: desvio padrão (n=3).

Fonte: Do autor (2022).