



JANINA DE SALES GUILARDUCCI

**AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE E ATIVIDADE
MELANOGÊNICA DOS EXTRATOS DE *Sonchus oleraceus*:
UM ESTUDO EM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**LAVRAS-MG
2024**

JANINA DE SALES GUILARDUCCI

**AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE E ATIVIDADE MELANOGÊNICA DOS
EXTRATOS DE *Sonchus oleraceus*: UM ESTUDO EM MODELO ZEBRAFISH
(*Danio rerio*)**

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

Profª. Dra. Luciane Vilela Resende
Orientadora

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Coorientador

Prof. Dr. Fernando Costa Malheiros
Coorientador

**LAVRAS-MG
2024**

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

Guilarducci, Janina de Sales.

Avaliação da embriotoxicidade e atividade melanogênica dos extratos
de *Sonchus oleraceus*: Um estudo em modelo zebrafish (*Danio rerio*) /
Janina de Sales Guilarducci. - 2024.

105 p. : il.

Orientador(a): Luciane Vilela Resende.

Coorientador(a): Luis David Solis Murgas, Fernando Costa
Malheiros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Alimento funcional. 3. Toxicologia. I.
Resende, Luciane Vilela. II. Murgas, Luis David Solis. III. Malheiros,
Fernando Costa. IV. Título.

JANINA DE SALES GUILARDUCCI

**AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE E ATIVIDADE MELANOGÊNICA DOS
EXTRATOS DE *Sonchus oleraceus*: UM ESTUDO EM MODELO ZEBRAFISH
(*Danio rerio*)**

**EVALUATION OF EMBRYOTOXICITY AND MELANOGENIC ACTIVITY OF
Sonchus oleraceus EXTRACTS: A STUDY IN ZEBRAFISH MODEL (*Danio rerio*)**

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

APROVADA em 26 de março de 2024.

Profa. Dra. Laura Cristina Jardim Pôrto Pimenta	UFLA
Prof. Dr. Wanderley José Mantovani Bittencourt	UNILAVRAS
Prof. Dr. Fernando Costa Malheiros	UNNAWAVE
Prof. Dr. Luis David Solis Murgas	UFLA
Profa. Dra. Luciane Vilela Resende	UFLA

Documento assinado digitalmente

 gov.br

LUCIANE VILELA RESENDE

Data: 04/10/2024 08:06:39-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Luciane Vilela Resende
Orientadora

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Coorientador

Prof. Dr. Fernando Costa Malheiros
Coorientador

**LAVRAS-MG
2024**

*A Deus,
Ao meu pai Pedro Paulo de Oliveira Guilarducci (saudades) e aos meus queridos sobrinhos
Enrico Guilarducci e Silva, Antonella Guilarducci e Silva e Kauan Cristian de Sales Rocha.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, principalmente nos momentos em que minha única vontade era desistir. E mais uma vez Ele me fortaleceu para chegar ao fim desse desafio.

À minha orientadora Dra. Luciane Vilela Resende, pela orientação, empatia, paciência, ensinamentos e por acreditar em mim, mesmo quando eu já não acreditava. Por me acolher como filha e acima de tudo pelo seu exemplo de humildade, serei eternamente grata.

Ao meu coorientador Dr. Fernando Costa Malheiros por toda ajuda, confiança, por seus ensinamentos, paciência, dedicação ao projeto e luta sem medir esforços, quem admiro muito.

Ao meu coorientador Dr. Luis David Solis Murgas por me acolher na Ala de Peixes do Biotério Central, pelos ensinamentos, confiança, disponibilidade e pela paciência nas dificuldades enfrentadas.

À Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci pelos ensinamentos, conselhos, por toda ajuda prestada durante a execução dos experimentos e por tornar possível as análises cromatográficas.

Ao professor Dr. Wilson Magela por toda ajuda, conselhos, disponibilidade e apoio durante a execução deste trabalho.

Aos animais deste experimento que proporcionaram resultados promissores, minha eterna gratidão e respeito.

Ao setor de olericultura pela ajuda durante o cultivo da planta, em especial à técnica Stefany, Sr. Valdecir e Luizinho. Agradeço pela amizade, risadas, choros e ajuda nessa etapa do cultivo à Camila Garcia, Lissa Izabel e Jandeilson Pereira.

Ao NEPAD pela troca de conhecimento e em especial à Kiara, William, Pedro, Vinícius e Isabella pelos conselhos e dicas durante o experimento. Em especial Stefânia, Alice e Ione pela amizade, esforços e ajuda.

Agradeço ao Willian Cortez, técnico do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, e à técnica do Biotério Fernanda pelo empenho e ajuda de sempre, minha eterna gratidão. Ao Isaac Konig pela ajuda, ensinamentos e parceria de sempre. À técnica Stefânia Souza do Departamento de Zootecnia pelos ensinamentos durante as análises enzimáticas.

À técnica Anette do Laboratório de Fitoquímica pela ajuda, dicas e suporte durante as análises e produção dos extratos, sou eternamente grata. Ao João Pedro pela colaboração. Aos amigos do Horto de Plantas Medicinais, em especial ao Senhor Dico e Giulia.

Ao técnico do laboratório de análises enzimáticas do DAG, Sr. Celso, pela ajuda e por ser tão prestativo e não medir esforços em ajudar os discentes, minha gratidão.

Ao NEMAC e NEPRON pela troca de conhecimentos e pelas amizades. Em especial Vytória e Júlia pelo apoio. Aos colegas do PPGPMAC pelos momentos, conversas e troca de conhecimentos. Ao professor Gavilanes, pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares agradeço pela colaboração e apoio, e aos professores do mesmo programa agradeço a troca de conhecimentos, pois vocês foram de extrema relevância nessa etapa.

Agradeço também à empresa Unnawave pelo apoio com as análises de imagem por inteligência artificial. Em especial ao Pedro Fagundes pela dedicação, esforços e ensinamentos.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa concedida, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, agradeço pela possibilidade de realização deste trabalho e apoio durante a execução.

À minha mãe Maria Aparecida de Sales Guilarducci (*saudades*) por seu amor incondicional, luta, dedicação e humildade. Ao meu pai Pedro Paulo de Oliveira Guilarducci por sempre acreditar em mim, apoio e ensinamentos de vida.

Aos meus irmãos Daniela de Sales Guilarducci, Flávia de Sales Guilarducci e Pedro Júnior Guilarducci, pelo apoio, cuidado, união e amor. Ao meu noivo, Daniel Ferreira, por compreender cada momento, apoio e entusiasmo durante todo o percurso.

Aos meus queridos sobrinhos Antonella Guilarducci e Silva, Enrico Guilarducci e Silva e Kauan Cristian de Sales Rocha, pelo amor incondicional e principalmente pelas demonstrações de afeto e carinho.

Ao meu afilhado Lucas Sales, pela admiração. Aos meus cunhados Rafael de Almeida, Erton Rocha e Richelle Mendes, pela paciência e apoio. À minha querida Beatriz, por alegrar os meus dias. À minha prima e amiga Priscila Evelling, pelas gargalhadas, apoio, paciência em meus desabafos e compreensão. Aos meus amigos da Inspire que fizeram parte desse processo, em especial Joel Resende, pela amizade. Aos meus tios e primos pelo apoio. Aos meus animais de estimação Poly (*saudades*) e Jack, pela companhia e amor.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram, minha gratidão.

“O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.

Faça o bem assim mesmo.

Veja que, ao final das contas, é tudo entre você e Deus!

Nunca foi entre você e os outros.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO GERAL

O vitiligo é um distúrbio de pigmentação da pele ocasionado pela destruição dos melanócitos. É uma patologia considerada estética, porém, muitas vezes negligenciada. Sua patogênese inclui diversas causas metabólicas e inflamatória, e o tratamento convencional ainda é um desafio para os portadores e profissionais da saúde. *Sonchus oleraceus* é uma hortaliça não convencional outrora muito utilizada na alimentação humana. Atualmente tem sido alvo de pesquisadores devido às suas propriedades medicinais. Tem sido indicada na medicina popular para o controle do vitiligo. No entanto, estudos dos efeitos toxicológicos e uso racional seguro ainda são escassos, assim como estudos do potencial uso dessa planta no processo da melanogênese. Diante desse contexto, objetivou-se avaliar os efeitos dos extratos (etanólico e aquoso) das folhas de *S. oleraceus* obtida em sistema de cultivo agroecológico e em diferentes estádios fenológicos (vegetativo e reprodutivo) na atividade melanogênica e toxicidade em embriões e larvas de zebrafish. Inicialmente determinou-se a composição química dos extratos por meio de HPLC. Os testes de embriotoxicidade basearam-se nas diretrizes da OCDE nº 236, de 2013, e foram realizados em embriões até 5 dias pós-fertilização (5 dpf). As doses utilizadas para avaliação dos efeitos teratogênicos e letalidade foram: 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,020; e 0,010 mg/mL. Os resultados demonstraram que o ácido chicórico está presente em todos os extratos em diferentes concentrações. Independentemente do solvente de extração, doses de 0,312 mg/mL e inferiores não apresentaram efeitos teratogênicos, e a sobrevivência dos embriões foi acima de 90%. Observou-se que o extrato que apresentou maior letalidade e deformidade em menores doses foi o C1ET (extrato hidroetanólico na fase vegetativa) aos 5 dpf, apresentando $LC_{50} = 0,689$ mg/mL e $EC_{50} = 0,386$ mg/mL, conseqüentemente maior IT = 1,785. Os principais efeitos teratogênicos encontrados foram atraso no desenvolvimento, edema de saco vitelínico e pericárdio e lordose, evidenciados na dose de 0,625 mg/mL. Os resultados deste estudo indicaram que os efeitos toxicológicos são dose-dependentes e que as atividades biológicas podem ser influenciadas pelo estágio fenológico da planta, bem como pelo solvente de extração. Os ensaios da atividade melanogênica foram realizados até os 7 dpf. As doses utilizadas foram: 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; e 0,020 mg/mL. Nossos achados não demonstraram diferença significativa na atividade das enzimas CAT, SOD e GPx para os extratos C1AQ (extrato aquoso, fase vegetativa), C1ET (extrato hidroetanólico, fase vegetativa) e C2ET (extrato hidroetanólico, fase reprodutiva) ($p > 0,05$), porém, esses extratos demonstraram aumento no número de pigmentos de forma dose-dependente ($p < 0,05$). Foi demonstrada uma redução significativa da GST no extrato C2ET nas doses inferiores a 0,020 mg/mL. Já para o extrato C2AQ (extrato aquoso, fase vegetativa), esse mesmo efeito foi encontrado em doses superiores ($p < 0,05$). Todos os extratos foram capazes de estimular a melanogênese através do aumento do número de fragmentos de pigmentação, área pigmentada e intensidade relativa dose-dependente. Portanto, os resultados deste estudo indicam que os extratos de *S. oleraceus* são capazes de estimular a melanogênese conforme o solvente de extração, estágio fenológico da planta e dose-resposta.

Palavras-chave: Plantas medicinais; alimento funcional; toxicologia; melanogênese; vitiligo; estresse oxidativo.

GENERAL ABSTRACT

Vitiligo is a skin pigmentation disorder caused by the destruction of melanocytes. It is considered an aesthetic pathology, but it is often neglected. Its pathogenesis includes several metabolic and inflammatory causes, and conventional treatment is still a challenge for patients and health professionals. *Sonchus oleraceus* is an unconventional vegetable that was once widely used in human nutrition. It has recently become the target of researchers due to its medicinal properties. It has been indicated in folk medicine for the control of vitiligo. However, studies on its toxicological effects and safe rational use are still scarce, as are studies on the potential use of this plant in the melanogenesis process. In this context, the objective of this study was to evaluate the effects of extracts (ethanolic and aqueous) of *S. oleraceus* leaves obtained in an agroecological cultivation system and at different phenological stages (vegetative and reproductive) on the melanogenic activity and toxicity in zebrafish embryos and larvae. Initially, the chemical composition of the extracts was determined by HPLC. Embryotoxicity tests were based on OECD guidelines No. 236 of 2013 and were performed on embryos up to 5 days post-fertilization (5 dpf). The doses used to evaluate teratogenic effects and lethality were: 2.5; 1.25; 0.625; 0.312; 0.156; 0.078; 0.039; 0.020; and 0.010 mg/mL. The results demonstrated that chicoric acid is present in all extracts at different concentrations. Regardless of the extraction solvent, doses of 0.312 mg/mL and lower did not show teratogenic effects, and embryo survival was above 90%. It was observed that the extract that presented the greatest lethality and deformity at lower doses was C1ET (hydroethanolic extract in the vegetative phase) at 5 dpf, presenting $LC_{50} = 0.689$ mg/mL and $EC_{50} = 0.386$ mg/mL, consequently higher $IT = 1.785$. The main teratogenic effects found were delayed development, yolk sac and pericardial edema and lordosis, evidenced at the dose of 0.625 mg/mL. The results of this study indicated that the toxicological effects are dose-dependent and that the biological activities can be influenced by the phenological stage of the plant, as well as by the extraction solvent. The melanogenic activity tests were performed up to 7 dpf. The doses used were: 0.312; 0.156; 0.078; 0.039; and 0.020 mg/mL. Our findings did not demonstrate significant differences in the activity of CAT, SOD and GPx enzymes for extracts C1AQ (aqueous extract, vegetative phase), C1ET (hydroethanolic extract, vegetative phase) and C2ET (hydroethanolic extract, reproductive phase) ($p > 0.05$); however, these extracts demonstrated an increase in the number of pigments in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). A significant reduction in GST was demonstrated in the C2ET extract at doses below 0.020 mg/mL. For the C2AQ extract (aqueous extract, vegetative phase), this same effect was found at higher doses ($p < 0.05$). All extracts were able to stimulate melanogenesis by increasing the number of pigment fragments, pigmented area and relative intensity in a dose-dependent manner. Therefore, the results of this study indicate that *S. oleraceus* extracts are capable of stimulating melanogenesis depending on the extraction solvent, plant phenological stage and dose-response.

Keywords: Medicinal plants; functional food; toxicology; melanogenesis; vitiligo; oxidative stress.

INDICADORES DE IMPACTO

Diante dos desafios enfrentados pela comunidade científica, a *Sonchus oleraceus* é uma planta alimentícia não convencional extremamente promissora para reverter distúrbios inflamatórios, metabólicos e neuropsicológicos que estão envolvidos com a patogênese do vitiligo. À vista do contexto patológico do vitiligo, a repigmentação da pele e/ou prevenção da despigmentação influenciam em diversos fatores, principalmente no bem-estar, fatores psicossociais, além da melhora de parâmetros metabólicos e imunológicos através da redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias, além da manutenção e equilíbrio homeostáticos das enzimas do sistema antioxidante. Os resultados demonstraram efeitos promissores na repigmentação da pele e com poucos efeitos citotóxicos, além de ser extremamente acessível e de baixo custo, visto que o tratamento convencional muitas vezes se torna inacessíveis devido ao alto custo. Nossos achados fornecem informações importantes para o uso de plantas medicinais como tratamento alternativo em saúde pública, oferecendo novas perspectivas de cuidado de saúde aos portadores de doenças dermatológicas despigmentantes, proporcionando uma abordagem inovadora, assim como um auxílio no desenvolvimento de políticas públicas de saúde e incentivo ao uso de plantas medicinais. Em relação aos impactos da inovação, este estudo indica o potencial terapêutico e preventivo do uso da *Sonchus oleraceus* em patologias da pele, como vitiligo, além disso, o uso de inteligência artificial possibilitou análises de imagens que podem auxiliar em novas pesquisas científicas tanto no prognóstico, tratamento, acompanhamento da evolução e diagnóstico da patologia por imagens, propiciando novas alternativas para métodos menos invasivos e controle efetivo do uso de fitofármacos e fitoterápicos.

IMPACT INDICATORS

Given the challenges faced by the scientific community, *Sonchus oleraceus* is an extremely promising unconventional food plant for reversing inflammatory, metabolic and neuropsychological disorders that are involved in the pathogenesis of vitiligo. In view of the pathological context of vitiligo, skin repigmentation and/or prevention of depigmentation influence several factors, mainly well-being, psychosocial factors, in addition to improving metabolic and immunological parameters through the reduction of pro-inflammatory cytokines and increase of anti-inflammatory cytokines, in addition to maintaining and homeostatic balance of the enzymes of the antioxidant system. The results demonstrated promising effects on skin repigmentation and with few cytotoxic effects, in addition to being extremely accessible and low cost, since conventional treatment often becomes inaccessible due to its high cost. Our findings provide important information for the use of medicinal plants as an alternative treatment in public health, offering new perspectives for health care for patients with depigmenting dermatological diseases, providing an innovative approach, as well as aiding in the development of public health policies and encouraging the use of medicinal plants. Regarding the impacts of innovation, this study indicates the therapeutic and preventive potential of the use of *Sonchus oleraceus* in skin pathologies, such as vitiligo. In addition, the use of artificial intelligence enabled image analysis that can assist in new scientific research in both prognosis, treatment, monitoring of the evolution and diagnosis of pathology by images, providing new alternatives for less invasive methods and effective control of the use of phytopharmaceuticals and phytotherapeutics.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Serralha (<i>Sonchus oleraceus</i>).....	21
---	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1 - <i>Sonchus oleraceus</i> em fase vegetativa aos 23 dias após o transplante.....	68
Figura 2 - <i>Sonchus oleraceus</i> em fase reprodutiva aos 35 dias após o transplante.....	69
Figura 3 - Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS (modo negativo) representativo dos extratos de <i>S. oleraceus</i>	70
Figura 4 - Espectro ESI-MS/MS no modo negativo do íon de m/z 472.9 [M-H] ⁻	70
Figura 5 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD representativo do extrato aquoso (1) e hidroetanólico (2) de <i>S. oleraceus</i>	71
Figura 6 - Letalidade (LC50), deformidades (EC50) e índice teratogênico (TI) de embriões e larvas de zebrafish expostos em extratos de <i>S. oleraceus</i> em 5 dias pós fertilização.	72
Figura 7 - Percentual de sobrevivência em embriões e larvas de zebrafish expostos a diferentes extratos de <i>S. oleraceus</i> , ao longo de 120 hpf.	73
Figura 8 - Percentual de deformidades de embriões e larvas de zebrafish submetidas ao extrato de <i>S. oleraceus</i> , ao longo do tempo de 120 hpf.	74
Figura 9 - Taxa de eclosão de embriões e larvas de zebrafish submetidas ao extrato de <i>S. oleraceus</i> , ao longo do tempo e 72 hpf.....	75
Figura 10 - Principais deformidades encontradas em extratos de <i>S. oleraceus</i> e desenvolvimento normal de embriões e larvas de zebrafish.....	76

ARTIGO 2

Figura 1 - Protocolo de melanogênese ao longo do tempo em embriões e larvas de zebrafish em exposição ao PTU e tratadas com extratos provenientes de <i>S. oleraceus</i> ao longo do tempo.....	96
Figura 2 - Imagens demonstrativas obtidas de larvas de zebrafish após exposição ao PTU e tratadas com extratos das folhas de <i>S. oleraceus</i>	96
Figura 3 - Fluxograma de análises de imagem através da inteligência artificial.....	97

Figura 4 - Etapas de processamento de imagens para avaliação da capacidade melanogênica dos extratos de <i>S. oleraceus</i> em larvas de zebrafish expostas ao PTU.....	98
Figura 5 - Atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com Extrato etanólico (70%) da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase vegetativa (C1ET).....	99
Figura 6 - Atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com Extrato aquoso da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase vegetativa (C1AQ).....	100
Figura 7 - Atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com Extrato etanólico (70%) da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase reprodutiva (C2ET).....	101
Figura 8 - Atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato aquoso da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase reprodutiva (C2AQ).....	102
Figura 9 - Análise das imagens através de inteligência artificial em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato etanólico (70%) da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase vegetativa (C1ET).....	103
Figura 10 - Análise das imagens através de inteligência artificial em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato aquoso da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase vegetativa (C1AQ).....	103
Figura 11 - Análise das imagens através de inteligência artificial em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato etanólico (70%) da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase reprodutiva (C2ET).....	104
Figura 12 - Análise das imagens através de inteligência artificial em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato aquoso da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase reprodutiva (C2AQ).....	104

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Extratos de *Sonchus oleraceus* para ensaios embriotoxicológicos em Zebrafish. ...77

Tabela 2 - Concentração de ácido chicórico dos extratos de *S. oleraceus*.77

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPk	Proteína quinase ativada
AQP3	Aquaporina-3
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
FABP-2	Proteína ligadora de ácidos graxos
GPx	Glutathiona peroxidase
GST	Glutathiona-S-transferase
HDLc	Colesterol de Lipoproteína de alta densidade
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-32	Interleucina 32
IFN- γ	Interferon gama
iNOS	Proteína óxido nítrico sintase induzível
K ⁺	Potássio
LDLc	Colesterol de Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
Mg ²⁺	Magnésio
MITF	Fator de transcrição associado a microftalmia
mL	Mililitro
MO	Matéria orgânica
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
NLRP1	Inflamassoma
P	Fósforo
PANCs	Plantas alimentícias não convencionais
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TYR	Tirosinase
α -MSH	Hormônio estimulador de α -melanócitos

LISTA DE SIGLAS

C1AQ	Extrato aquoso da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase vegetativa
C2AQ	Extrato aquoso da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase reprodutiva
C1ET	Extrato etanólico (70%) da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase vegetativa
C2ET	Extrato etanólico (70%) da folha seca de <i>Sonchus oleraceus</i> em fase reprodutiva
hpf	Horas pós-fertilização
dpf	Dias pós-fertilização
LC ₅₀	Concentração capaz de causar 50% de mortalidade
EC ₅₀	Concentração capaz de causar 50% de deformidade
TI	Índice teratogênico

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	18
1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEORICO	20
2.1 Serralha (<i>Sonchus oleraceus</i> Linn)	20
2.2 Cultivo e compostos bioativos da serralha (<i>Sonchus oleraceus</i>)	21
2.3 <i>Sonchus oleraceus</i> e propriedades terapêuticas	22
2.4 Patogênese e implicações terapêuticas na abordagem do vitiligo	23
2.5 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo experimental em toxicidade e atividade melanogênica	26
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	40
ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE DOS EXTRATOS AQUOSO E ETANÓLICO DE <i>Sonchus oleraceus</i> SUBMETIDA AO CULTIVO ORGÂNICO EM DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA: UM ESTUDO EM ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>)	40
ARTIGO 2 - INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL MELANOGÊNICO DOS EXTRATOS DE <i>Sonchus oleraceus</i> EM LARVAS DE ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>)	78
ANEXO	104

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O vitiligo é uma doença pigmentar adquirida, de etiologia indeterminada, com incidência mundial superior a 1%, que acarreta diversos prejuízos psicossociais ao portador. Muitos estudos demonstraram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão do vitiligo (Nascimento *et al.*, 2024). Pacientes com vitiligo apresentam níveis significativamente aumentados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e superóxido dismutase (SOD) em lesões cutâneas ou séricas (Jain *et al.*, 2011). Além disso, os níveis de catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSH-Px) e glutatona reduzida (GSH) são diminuídos, indicando um desequilíbrio no sistema antioxidante em pacientes com vitiligo (He *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2021).

A pesquisa em busca de novos fármacos de origem natural revela alvos promissores para auxiliar na estabilização ou repigmentação da pele. Nesse cenário, *Sonchus oleraceus* Linn (família: Asteraceae), uma planta alimentícia não convencional popularmente conhecida no Brasil como serralha, tem sido alvo dos pesquisadores devido a suas propriedades terapêuticas (Guarrera; Savo, 2013). A serralha possui substâncias antioxidantes como flavonoides, compostos fenólicos, sesquiterpenos, entre outras (Chen; Teng; Cao, 2019; Saxena; Kumar, 2020; Sergio *et al.*, 2020). Essas substâncias estão relacionadas principalmente com a atividade antioxidante e anti-inflamatória da planta (Aissani *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021). O consumo da *S. oleraceus* regularmente na alimentação tem sido considerado capaz de promover a saúde e longevidade auxiliando na diminuição de incidência de doenças crônicas (Li *et al.*, 2018).

Essa espécie tem sido usada na medicina popular principalmente para enterite, diarreia, náuseas, vômitos, pneumonia, disfunção hepática e biliares, apendicite, inchaço da garganta e anemia. Recentemente, Lima *et al.* (2020) encontraram resultados promissores que sugerem o efeito dessa planta medicinal com o aumento de melanina em zebrafish (*Danio rerio*). Mediante os resultados prévios, torna-se relevante confirmar os possíveis efeitos da *S. oleraceus* no aumento da pigmentação da pele, por meio de um aprofundamento incluindo outras análises, com consequente detalhamento dos mecanismos metabólicos e inflamatórios envolvidos nessa patogênese. Esses autores também analisaram os níveis de toxicidade de extratos de plantas de serralha de crescimento espontâneo em áreas de cultivo orgânico e convencional, e constataram que a toxicidade em zebrafish é dose-dependente.

Porém, estudos sobre o uso seguro de plantas ainda é escasso, principalmente no que abrangem os efeitos toxicológicos. A padronização do sistema de cultivo, época de colheita, identificação e quantificação fitoquímica de uma planta irá impactar no controle de qualidade, eficácia e segurança como fitoterápico (Ahmad; Abdallah; Kamil, 2021). É relatado que as substâncias bioativas de uma planta podem variar de acordo com o estágio fenológico (Dobón-Suárez *et al.*, 2021) da parte da planta utilizada, bem como com o solvente e método de extração (Aissani *et al.*, 2021). Contudo, estudos sobre essas variações (cultivo, extração e dose) não foram explorados conjuntamente na espécie, e os efeitos toxicológicos ainda são escassos. Além disso, padronizar essas variações torna-se imprescindível na produção de produtos fitoterápicos que possam auxiliar na repigmentação da pele, beneficiando portadores do vitiligo. Em suma, espera-se que a *S. oleraceus* possa ser uma alternativa terapêutica acessível, de fácil cultivo e segura. Por fim, expandir o conhecimento acerca da planta em diversas áreas do conhecimento proporcionará uma abordagem inovadora, além do incentivo ao uso consciente de plantas medicinais de forma eficaz e segura.

Em detrimento de inúmeros benefícios à saúde encontrados para a espécie, estudos de toxicidade ainda são escassos. E, não obstante, o uso do modelo biológico zebrafish cresce exponencialmente na ciência, visto que os peixes são sensíveis à exposição química durante o desenvolvimento inicial (Hill *et al.*, 2005), assim como estudos recentes relacionados à genômica mostram grande relação entre o zebrafish e os processos metabólicos de pigmentação humana (Bin *et al.*, 2015; Motiani *et al.*, 2018). Logo, utilizá-lo como ferramenta em pesquisa torna-se crucial, principalmente devido à rapidez dos resultados.

Todavia, em relação à patogênese do vitiligo, estudos preliminares comprovaram que a *S. oleraceus* é uma planta extremamente promissora, tanto em sua utilização por via oral como tópica para controle do vitiligo. Atualmente, prever o curso da doença tem sido um desafio para os profissionais devido à dificuldade de se estabelecer biomarcadores, sendo assim, os tratamentos apenas fornecem uma resolução temporária e/ou limitante.

Portanto, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos dos extratos (etanólico e aquoso) das folhas de *S. oleraceus*, obtida por sistema orgânico de cultivo e em diferentes estágios fenológicos (vegetativo e reprodutivo), na atividade melanogênica e toxicidade em embriões e larvas de zebrafish.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Serralha (*Sonchus oleraceus* Linn)

A *S. oleraceus* é popularmente conhecida como serralha, ou serraia, no Brasil. Pertencente à família Asteraceae, nativa da Europa, Norte da África e Ásia Ocidental, atualmente é encontrada em quase todas as partes do mundo. No Brasil é considerada uma planta invasora resistente a agroquímicos (Hereward *et al.*, 2018; Vilela *et al.*, 2009), alimentícia e medicinal. Trata-se de uma herbácea anual ou bienal, caules ocos e lisos, suas folhas são planas, pinatífidas e um pouco espinhosas, as aurículas são deltadas a lanceoladas, quase retas e agudas, suas flores são amarelas e seus frutos são levemente comprimidos, com margens arredondadas (Cho *et al.*, 2019), conforme Figura 1.

Análises filogenéticas com base na sequência do genoma do cloroplasto revelaram uma característica anfidiplóide. Acredita-se que a espécie se originou da *S. asper*, compartilhando características genéticas comuns, apesar das diferenças morfológicas e citológicas (Cho *et al.*, 2019). É uma planta invasora de difícil controle devido à sua rápida maturidade, produção prolífica das sementes, que são altamente dispersivas, e resistência a herbicidas, como glifosato (Gitsopoulos *et al.*, 2023; Peerzada; O'Donnell; Adkins, 2019). Além disso, as sementes podem germinar durante todo o ano, principalmente em períodos chuvosos (Widderick *et al.*, 2010).

É uma planta invasora prejudicial ao crescimento e desenvolvimento do algodoeiro devido à sua resistência ao glifosato, prejudicando a lucratividade da cultura do algodão (Thornby; Werth; Walker, 2013). Contudo, um grupo de pesquisa recomenda o uso de *S. oleraceus* no cultivo orgânico com uma abordagem ambientalmente segura, melhorando a nutrição e potencializando os benefícios à saúde das sementes de feijão produzidas, pois o crescimento e a produtividade do feijão aumentaram significativamente (Hassan; Saleh; Abdelgawad, 2018). Todavia, também tem sido demonstrado que a *S. oleraceus* pode ser promissora como atrativo para polinizadores, contribuindo para a preservação da biodiversidade (Morrison *et al.*, 2021).

Considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC), a serralha é consumida na dieta mediterrânea devido à sua composição nutricional, sendo fonte de fibras, tiamina, riboflavina, carotenoides, como xantofilas (violaxantina, neoxantina, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina), e boa fonte de α -tocoferol (vitamina E) (Panfili *et al.*, 2020). Flores, folhas e caules de *S. oleraceus* são usados em tortas de vegetais, sopas e saladas frescas ou cozidas no vapor (Chrysargyris; Goumenos; Tzortzakis, 2023). Também foi demonstrado seu potencial

como conservante de alimentos minimamente processados devido à presença de compostos com função antioxidante (Qiao *et al.*, 2021).

Na China, a serralha como PANC foi considerada capaz de promover a saúde e longevidade, apresentando-se como fonte sustentável de alimentos saudáveis que podem ajudar a controlar a prevalência de doenças crônicas e reduzir o impacto da agricultura no meio ambiente (Li *et al.*, 2018). E, por inúmeros benefícios, estudiosos já consideram a planta como nutracêutico (Nobela *et al.*, 2022). Além dos benefícios nutricionais pelo consumo da *S. oleraceus* em comunidades, promovendo a segurança alimentar, tem sido estimulado seu cultivo entre pequenos agricultores, trazendo benefícios financeiros e estimulando a economia local (Seal; Chaudhuri; Pillai, 2023). Por fim, a *S. oleraceus* possui diversos efeitos terapêuticos a serem explorados devido à presença de diversos compostos bioativos (Guarrera; Savo, 2013).

Figura 1 - Serralha (*Sonchus oleraceus*).



Fonte: Da autora (2022).

2.2 Cultivo e compostos bioativos da serralha (*Sonchus oleraceus*)

Em relação ao cultivo de plantas medicinais, este envolve diversos processos que influenciará na qualidade de um fitoterápico. Para que seja garantida a qualidade, torna-se totalmente relevante controlar cultivo, colheita e armazenamento, até a extração das substâncias bioativas (Carvalho; Costa; Carnellosi, 2010). As substâncias bioativas são provenientes do metabolismo secundário das plantas, cuja composição está intimamente relacionada com alguns fatores internos (genética, estágio de desenvolvimento, idade da planta, etc.) e externos, como: ambientais, agronômicos que incluem condições de cultivo, fatores abióticos, entre outros (Pavarini *et al.*, 2012).

Prontamente, controlar as condições de cultivo de plantas medicinais torna-se extremamente relevante, pois evita a variabilidade fenotípica e genética, além de ser seguro quanto à identificação da espécie e manejo das condições de cultivo, que influenciará diretamente na composição química da planta, bem como no aumento da produção de biomassa (Bai *et al.*, 2020; Kessler; Kalske, 2018; Mishra *et al.*, 2020). A *S. oleraceus* é uma planta muito versátil, de fácil manejo e ciclo rápido. Isso acontece devido à adaptabilidade ambiental de plantas invasoras, pois mesmo em um novo ambiente elas conseguem alterar sua morfologia, características fenotípicas e comportamento, que são úteis para sua sobrevivência ao novo ambiente (Anjum *et al.*, 2022). Recentemente, um estudo com ênfase em cultivo hidropônico de *S. oleraceus* observou que doses de 200 mg L⁻¹ de nitrogênio contribuíram para o crescimento da planta, bem como para o aumento na concentração de flavonoides, fenóis e atividade antioxidante (Chrysargyris; Tzortzakis, 2023).

Em relação às substâncias bioativas, e considerando alguns estudos fitoquímicos da *S. oleraceus*, foi relatada a presença de ômega-3 (Chen *et al.*, 2021), compostos fenólicos, flavonoides, taninos, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, quinonas, esteroides (Saxena; Kumar, 2020), ácido cafárico, ácido chicórico (Sergio *et al.*, 2020), ácido clorogênico, ácido cafeico (Chen; Teng; Cao, 2019), vilosol, ácido ferúlico, β-sitosterol, ácido ursólico e rutina (Li *et al.*, 2017), apigenina (Alrekabi; Hamad, 2018), quercetina (Salim *et al.*, 2023), entre outros.

Não obstante, atualmente pesquisadores encontraram na espécie polifenóis, sesquiterpenos, cumarinas e flavonoides. Porém, relataram compostos que ainda não tinham sido encontrados em *S. oleraceus*, sendo eles: taxifolina, daidzeína, equol, isokaempferida, hesperidina, eugenol, ácido gentísico, ácido cinurênico, piperina, salsolinol, escopoletina, ostrutina, ageratriol, verprósido, ácido azelaico e ácido mesacônico (Nouidha *et al.*, 2023).

2.3 *Sonchus oleraceus* e propriedades terapêuticas

Inúmeros trabalhos relatam os potenciais benefícios do uso de *S. oleraceus*. Recentemente, foi demonstrado o efeito antiobesidade de compostos lipídicos encontrados na planta por meio da ativação do AMPk que regulou a expressão de genes adipogênicos, reduzindo a diferenciação e acúmulo de lipídeos em adipócitos (Chen *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que estudiosos indicam o aumento do consumo de *S. oleraceus* devido à presença significativa de fibras e baixa densidade calórica, visto que alimentos com alta densidade calórica estão diretamente relacionados com o aumento de doenças crônicas não

transmissíveis, principalmente obesidade e doenças cardiovasculares (De Paula Filho; Barreira; Pinheiro-Sant'Ana, 2022).

Alguns fitocomplexos obtidos a partir da extração, utilizando o etanol como solvente de *S. oleraceus*, apresentaram-se como potentes antidiabéticos, sem causar danos hepáticos e renais em ratos diabéticos induzidos por aloxana (Salim *et al.*, 2023). Os efeitos anti-inflamatórios de nanoemulsões de extrato fenólico de *Sonchus oleraceus* foram observados em ratos diabéticos, com diminuições significativas na atividade de NF-kB, TNF- α e IL-6 (Chen *et al.*, 2020a). Foi também demonstrado potencial uso como antidiabético a partir do extrato hidroetanólico (90%) de *S. oleraceus*, auxiliando na homeostase da glicemia através de uma dose de 400 mg/kg/dia e apresentou efeitos comparados ao da metformina (Chen *et al.*, 2020b). Por fim, foi demonstrado também diminuição da glicemia e lipoproteína de baixa densidade (LDLc), aumento da lipoproteína de alta densidade (HDLc) com melhora nas células β -pancreáticas na dose de 300 mg/kg/dia do extrato etanólico durante 56 dias de tratamento (Salim *et al.*, 2023).

Utilizando substâncias bioativas relatadas na espécie, foi realizada a extração de ácido clorogênico e ácido cafeico com administração oral de 10 mg/kg em modelo de sepse induzida por lipopolissacarídeos (LPS), obtendo redução de citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α , assim como uma regulação negativa da expressão de iNOS e COX-2 (Chen *et al.*, 2019). Resultados semelhantes foram também relatados por Li *et al.* (2017).

Além dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes relatados (Aissani *et al.*, 2021; Chiu *et al.*, 2020; Hameed; Al-Alh; Jumaa, 2021; Ou *et al.*, 2014; Teugwa *et al.*, 2013), atividade antitumoral (Huyan *et al.*, 2016; Yin; Kwon; Wang, 2007). Também têm sido relatadas atividade antibacteriana (Xia *et al.*, 2011) e atividade significativa contra *Escherichia coli* (Tanvir *et al.*, 2023); atividade anticolite ulcerativa (Alothman *et al.*, 2018); potencial uso como agente antienvhecimento (Ou; Rades; Mcdowell, 2015); efeito nefroprotetor (Torres-González *et al.*, 2018); efeito ansiolítico (Vilela; Soncini; Giusti-Paiva, 2009); auxílio em transtornos depressivos (Vilela *et al.*, 2010); antifúngico (El-Desouky, 2021), anti-leishmania (Al Nasr, 2020), atividade antiparasitária (Elshikh *et al.*, 2023), atividade anticolinesterase (Aissani *et al.*, 2021), entre outros.

2.4 Patogênese e implicações terapêuticas na abordagem do vitiligo

O pigmento melanina é um polímero responsável pela absorção de luz ultravioleta. Sua estrutura molecular é constituída de produtos intermediários da oxidação da tirosina pela

enzima tirosinase, que forma grânulos intracelulares nos melanócitos (Riley, 1997). A absorção de luz pela melanina tem várias funções biológicas, incluindo proteção de fotorreceptores, termorregulação, quelante catiônico, antioxidante, camuflagem, entre outros (Cordero; Casadevall, 2020; Diepgen; Mahler, 2002).

Na pele, apenas os melanócitos são especializados em produzir melanina, mas as células sintetizadoras de melanina também estão presentes no olho (no epitélio pigmentado da retina, coroide e íris), ouvido, meninges, cérebro e coração (Vachtenheim; Borovanský, 2010). Os distúrbios de despigmentação da pele basicamente são ocasionados pela destruição dos melanócitos e, conseqüentemente, causam manchas na pele, além de hipopigmentação da retina e em maior gravidade deficiência visual (Hsu; Liou; Jiang, 2020). A principal doença relacionada à perda dos melanócitos é o vitiligo.

O vitiligo é um distúrbio assintomático, esteticamente desfigurante, que resulta na formação de manchas despigmentadas na pele e mucosas, apresentando-se de duas formas bem conhecidas: vitiligo segmentar e não segmentar (mais comum) (Ezzedine *et al.*, 2015). Pode ser classificado como progressivo ou estável, e deve-se considerar a extensão que pode ser limitada (patologia localizada) ou extensa (patologia generalizada) (Bishnoi; Parsad, 2018).

Clinicamente, o tratamento inclui interromper a despigmentação da pele e/ou repigmentar o local afetado, assim, algumas abordagens terapêuticas incluem a estimulação da diferenciação e proliferação de melanócitos por meio de análogos do hormônio estimulador de α -melanócitos (α -MSH) (Picardo *et al.*, 2015). No que se refere à fisiologia da transcrição, o fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) é um ativador transcricional de vários genes que codificam proteínas localizadas em melanossomos, assim como da tirosinase (TYR), que está relacionada com a biogênese de melanina e transporte de melanossomos. Logo, uma redução de sua atividade influenciará diretamente na hipopigmentação da pele (Lai *et al.*, 2018; Vachtenheim; Borovanský, 2010), tanto do fator de transcrição quanto da principal enzima (TYR) (Hum *et al.*, 2012).

A fisiopatologia ainda é complexa, mas inclui: autotoxicidade, neuroinflamação, autoimunidade e disfunção mitocondrial (Chang *et al.*, 2021; Willemsen *et al.*, 2019; Yi *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Acredita-se que uma das principais causas do vitiligo converge na destruição autoimune dos melanócitos mediada principalmente pelo envolvimento do aumento de células T CD8⁺ citotóxicas mediadas principalmente por interferon gama (IFN- γ), interleucina 1 β e interleucina 12 (Boissy; Spritz, 2009; Lee, 2012; Wang *et al.*, 2016). Recentemente, um estudo populacional com 50 portadores do vitiligo não segmentar e 40

indivíduos saudáveis demonstrou que o aumento da interleucina 32 (IL-32), do gene e suas isoformas α e β afetou o desenvolvimento e progressão do vitiligo (Farag *et al.*, 2024).

Além disso, tem sido demonstrado um possível envolvimento da inflamação através da ativação do inflamassoma (Speeckaert; Van Geel, 2017), que irá desencadear cascatas de ativação de vias do fator nuclear kappa B (NF- κ B), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β , entre outras) (Kelley *et al.*, 2019). Polimorfismos no NLRP1 (inflamassoma) demonstraram associação com o vitiligo, além de um risco aumentado para outras doenças autoimunes, principalmente através do aumento da interleucina 1 β (Calabrese *et al.*, 2024). Um outro achado importante foi que a proteína ligadora de ácidos graxos (FABP-2) pode desempenhar um papel crucial no diagnóstico precoce do vitiligo, provocada principalmente pela disbiose intestinal, e os autores sugerem como biomarcador de doenças autoimunes (Shaker; El-Tahlawi; Fawzy, 2024).

Um outro mecanismo foi demonstrado através da Aquaporina-3 (AQP3), uma proteína do canal de água e glicerol que regula a sinalização redox promovendo a captação de H₂O₂ através da membrana celular (Milković; Gašparović, 2021; Wang *et al.*, 2021). AQP3 reduz a sobrevivência de queratinócitos com consequente apoptose de melanócitos e aumento exacerbado de ROS (espécie reativa de oxigênio) (Kim; Kim; Lee, 2023). Logo, alguns estudos têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo, resultante do metabolismo celular e interação com o meio ambiente (Iannella *et al.*, 2016; Sravani *et al.*, 2009). O estresse oxidativo ocasionado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio leva à redução da expressão de E-caderina, uma molécula dependente de cálcio, que se liga aos melanócitos (Nakazawa *et al.*, 1995; Picardo; Bastonini, 2015). No vitiligo com a expressão reduzida dessa molécula diminui o contato melanócito-queratinócito, e assim os melanócitos migram para a epiderme, ocorrendo a apoptose e, consequentemente, a despigmentação da pele (Bishnoi; Parsad, 2018).

O dano oxidativo prolongado resulta em apoptose e vacuolização de melanócitos e queratinócitos, reduzindo o fator de crescimento dos melanócitos (células-tronco), normalmente secretado pelos queratinócitos (Cario-André *et al.*, 2007). Os melanócitos no vitiligo têm maior sensibilidade ao estresse oxidativo devido à expressão reduzida de catalase e glutatona peroxidase, que são enzimas potencialmente antioxidantes devido à inativação principalmente de peróxido de hidrogênio, íon hidroxila, superóxido, entre outros radicais livres (Shi *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2016; Yildirim *et al.*, 2004). Os estudos têm demonstrado que o aumento da superóxido dismutase está intimamente relacionada à inibição da síntese de melanina (Kim *et al.*, 2018). Logo, avaliar a supressão dessa enzima torna-se relevante, uma vez que pesquisadores demonstraram o papel da regulação na expressão de genes da SOD. Entre

várias, uma bem fundamentada é a correlação entre o NF-Kappa B e expressão desses genes, basicamente NF- κ B, e outros fatores de transcrição importantes, como p53, interação exercendo um efeito positivo ou negativo na expressão do gene *sod2* (Miao; St. Clair, 2009). Logo, essa relação pode explicar alterações da atividade dessa enzima conforme a progressão da doença.

Os antioxidantes (compostos bioativos) têm demonstrado um auxílio promissor tanto administrados sistemicamente quanto topicamente (Dell'anna *et al.*, 2007; Parsad; Pandhi; Juneja, 2003). Recentemente, utilizando um fitoterápico Erzhi (na proporção 1:1 de frutos secos de *Ligustrum lucidum* WTAiton e partes aéreas secas de *Eclipta prostrata* L., demonstrou-se que 1 mg/mL do extrato aquoso foi capaz de estimular a melanogênese em larvas de zebrafish em uma única exposição ao composto, demonstrando um aumento do pigmento melanina e da ação da tirosinase, e o mesmo resultado também foi demonstrado em células de melanoma B16F10 (Hong *et al.*, 2024).

O vitiligo ainda é uma doença negligenciada em seu tratamento, pois os profissionais consideram muitas vezes como uma patologia estética, pouco considerando os fatores imunológicos e do estresse oxidativo, que ao longo do tempo irão repercutir não somente nos fatores psicossociais, mas também em um risco significativamente aumentado no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Logo, estimular a pesquisa de fitofármacos que possam auxiliar na patogênese da doença através de efeitos terapêuticos, com ênfase em atividade antioxidante e anti-inflamatória, é de suma importância, visto a complexidade da fisiopatologia do vitiligo.

2.5 Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental em toxicidade e atividade melanogênica

O modelo zebrafish tem sido aderido amplamente em pesquisas na área da saúde. Isso se deve às favoráveis características que contribuíram para sua popularidade, sendo elas: rápido desenvolvimento, tamanho pequeno (medem aproximadamente 5 cm em sua fase adulta), fácil manipulação, baixo custo, rápida reprodução, transparência óptica, entre outros. É um peixe popularmente conhecido como zebrafish (*Danio rerio*) (Lawrence, 2007).

Esse modelo experimental tem sido muito utilizado em estudos de diversas patologias humanas, devido à sua semelhança evolutiva com os mamíferos (Lieschke; Currie, 2007; Salmi; Tan; Cox, 2019). O teste de embriotoxicidade utilizando o zebrafish (tanto embriões quanto peixes adultos) pode ser extremamente útil devido à possibilidade de realizar testes de

toxicidade intermediários, permitindo uma previsão rápida dos possíveis impactos de substâncias químicas e outras substâncias nos seres humanos (Chahardehi; Arsad; Lim, 2020).

Além disso, é um modelo excelente que propõe uma boa quantidade de embriões, de rápido ciclo de desenvolvimento e transparência dos embriões, facilitando a visibilidade (Cai *et al.*, 2024). Em um artigo de revisão, os autores relatam que o desenvolvimento embrionário dos peixes começa em uma série de ciclos celulares rápidos e síncronos, sendo consideradas: clivagem (0-2 hpf), blástula (30% epibolia, 2-4 hpf), gastrulação (50% epibolia, 4-11 hpf), segmentação (formação de somitos, 11-24 hpf) e eclosão (72 hpf), sendo estas denominadas fases embrionárias, e após eclosão atingem a fase larval (é possível identificar alterações como lordose, edemas de saco vitelínico e pericárdio, entre outras) (Dey *et al.*, 2023).

Caracterizar a segurança geral de plantas medicinais/produto fitoterápico é uma necessidade em saúde pública, uma vez que as informações disponíveis sobre eles são muito escassas (Mitchell *et al.*, 2022). No geral, as plantas medicinais são consideradas “seguras” apenas por serem naturais (Sarecka-Hujar; Szulc-Musioł, 2022), porém, diversos compostos fitoquímicos podem apresentar alto risco de toxicidade e, por inúmeras vezes, grande parte dos efeitos benéficos ou toxicológicos desses compostos permanecem desconhecidos (Dubey *et al.*, 2018). Sendo assim, o modelo zebrafish é uma ferramenta prática e rápida acerca dos resultados toxicológicos.

O modelo zebrafish atraiu a atenção de pesquisadores em todo mundo para ensaios embriotoxicológicos em plantas, a fim de verificar a segurança da utilização de plantas para fins terapêuticos. Em um estudo com três tipos de cultivares de erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum* L.) foram verificados em embriões e larvas de zebrafish a mortalidade, efeitos teratogênicos e taxa de eclosão; os pesquisadores demonstraram que doses menores que 10 µg/mL do extrato aquoso são seguras e não possuem efeitos teratogênicos. Em contrapartida, altas concentrações do extrato vegetal indicaram riscos potenciais para o desenvolvimento de embriões humanos e devem ser usados com cautela durante a gravidez (Atalar *et al.*, 2023).

Utilizando dois tipos de solventes de extração (acetato de etila e etanol) em erva-de-tigre (*Centella asiática*), observou-se edema de saco vitelínico e pericárdio, assim como ausência de somitos, sendo o LC₅₀ = 26,61 ppm do extrato com acetato de etila considerado moderado, e o extrato etanólico LC₅₀ = 808,81 ppm com menor toxicidade. Em um estudo com óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* DC.) observou-se que a toxicidade foi dependente da concentração e do tempo, com um valor de LC₅₀ de 9,02 µg/mL, e que as deformidades encontradas, como edema pericárdico e do saco vitelino, deformidade da cauda e lordose, foram evidentes na concentração de 6,25 µg/mL (Duarte da Silva *et al.*, 2023).

Considerada uma PANC, a chicória (*Eryngium foetidum* Linn) foi submetida a ensaios toxicológicos em diferentes solventes de extração, sendo eles: aquoso, etanólico e metanólico. Dependendo do solvente de extração, da concentração utilizada e do tempo de exposição, os extratos causaram mortalidade, alteraram o tempo de eclosão e promoveram alterações nas atividades enzimáticas em concentrações superiores a 0,625 mg/mL (Castro *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo e respostas antioxidantes têm sido cada vez mais alvo de estudos e metodologias espectrofotométricas para avaliação de enzimas antioxidantes, tais como catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD), entre outros derivados metabólicos relacionados a esse processo, amplamente difundidos em vários estudos com o zebrafish (Guo *et al.*, 2019; Harishkumar *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020). Além disso, alguns estudos relacionados à genômica mostram grande relação entre o zebrafish e os processos metabólicos de pigmentação humana (Bin *et al.*, 2015; Motiani *et al.*, 2018). Não obstante, o zebrafish tem sido modelo para pesquisas envolvendo melanogênese tanto na indústria medicinal quanto na cosmética, devido à sua confiabilidade em avaliar muitos agentes despigmentantes (Chen *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017, 2018).

Um estudo de revisão analisou os dados do National Center for Biotechnology Information Search (NCBI), juntamente com dados de bioinformática e alguns artigos disponíveis e confirmaram cerca de 51 compostos bioativos incluindo extratos e formulações utilizando o zebrafish, sendo 44% deste total avaliaram o efeito sobre o teor de melanina e os demais envolveu fenótipos e inibição da tirosinase (principal enzima envolvida no processo depigmentação da pele) (Lajis, 2018).

De fato, um estudo utilizando um flavonoide (tribulosídeo) proveniente da *Tribulus terrestris* L. demonstrou atividade melanogênica em larvas de zebrafish e células humanas, aumentando a transcrição do MITF e tirosinase (Cao *et al.*, 2024). Contudo, pesquisas envolvendo compostos bioativos provenientes de plantas medicinais que auxiliem na repigmentação da pele e sua possível relação com o estresse oxidativo ainda são escassas utilizando o modelo zebrafish.

Mediante o exposto, buscar alternativas seguras que auxiliem na repigmentação da pele é de suma importância, não somente pelos fatores psicossociais relacionados ao vitiligo, mas também no controle metabólico e funcionamento celular, a fim de evitar complicações futuras. Logo, o sistema pigmentar do zebrafish torna-se uma ferramenta estratégica muito útil para estudos correlacionados com o processo da melanogênese.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A investigação dos efeitos toxicológicos de extratos de *S. oleraceus* contribuirá para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou fitofármacos com potencial uso terapêutico e que sejam seguros quanto aos efeitos colaterais. Além disso, a busca por alternativas de baixo custo e acessíveis aos portadores de vitiligo torna-se de suma importância, contribuindo na melhoria do estado de saúde físico e emocional, bem como estimulando o uso racional e seguro de plantas medicinais.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; ABDALLAH, El T.; KAMIL, Mohammad. Scientific studies on aerial parts of *Sonchus oleraceus* Linn. **Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, [Morocco], v. 7, n. 2, p. 194–214, May 2021.
- AISSANI, Fatine *et al.* Algerian *Sonchus oleraceus* L.: a comparison of different extraction solvent on phytochemical composition, antioxidant properties and anti-cholinesterase activity. **Advances in Traditional Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 1–12, Feb. 2021.
- AL NASR, Ibrahim. In vitro anti-leishmanial assessment of some medicinal plants collected from Al Qassim, Saudi Arabia. **Acta Parasitologica**, [Poland], v. 65, n. 3, p. 696–703, Sept. 2020.
- ALOTHMAN, Esraa A. *et al.* Evaluation of anti-ulcer and ulcerative colitis of *Sonchus oleraceus* L. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [Saudi Arabia], v. 26, n. 7, p. 956–959, Nov. 2018.
- ALREKABI, Dalia G.; HAMAD, Maha. N. Phytochemical investigation of *Sonchus oleraceus* (Family: Asteraceae) cultivated in Iraq, isolation and identification of quercetin and apigenin. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 2242–2248, Sept. 2018.
- ANJUM, Farida *et al.* Seed coat morphology and sculpturing of selected invasive alien plants from Lesser Himalaya Pakistan and their systematic implications. **BioMed Research International**, [United States], v. 2022, July 2022.
- ATALAR, Mehmet Nuri *et al.* LC-ESI-MS/MS analysis of secondary metabolites of different St. John's wort (*Hypericum perforatum*) extracts used as food supplements and evaluation of developmental toxicity on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **South African Journal of Botany**, [South Africa], v. 159, p. 580–587, Aug. 2023.
- BAI, Chengke *et al.* Growth years and post-harvest processing methods have critical roles on the contents of medicinal active ingredients of *Scutellaria baicalensis*. **Industrial Crops and Products**, [Netherlands], v. 158, Dec. 2020.
- BIN, Bum-Ho *et al.* Membrane-associated transporter protein (MATP) regulates melanosomal pH and influences tyrosinase activity. **PLoS ONE**, [United States], v. 10, n. 6, June 2015.
- BISHNOI, Anuradha; PARSAD, Davinder. Clinical and molecular aspects of vitiligo treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, [United States], v. 19, n. 5, May 2018.
- BOISSY, Raymond E.; SPRITZ, Richard A. Frontiers and controversies in the pathobiology of vitiligo: Separating the wheat from the chaff. **Experimental Dermatology**, [Denmark], v. 18, n. 7, p. 583–585, July 2009.

CAI, Haoxing *et al.* Tributyltin causes generational neurodevelopmental toxicity and the protective effect of folic acid in zebrafish. **Journal of Environmental Sciences**, [China], v. 137, p. 615–625, Mar. 2024.

CALABRESE, Laura *et al.* Role of the NLRP1 inflammasome in skin cancer and inflammatory skin diseases. **British Journal of Dermatology**, [England], v. 190, n. 3, p. 305–315, Feb. 2024.

CANTER, Peter H.; THOMAS, Howard; ERNST, Edzard. Bringing medicinal plants into cultivation: Opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, [Netherlands], v. 23, n. 4, 180-185, Apr. 2005.

CAO, Yan *et al.* Tribuloside acts on the PDE/cAMP/PKA pathway to enhance melanogenesis, melanocyte dendricity and melanosome transport. **Journal of Ethnopharmacology**, [Ireland], v. 323, Apr. 2024.

CARIO-ANDRÉ, Muriel *et al.* The melanocytorrhagic hypothesis of vitiligo tested on pigmented, stressed, reconstructed epidermis. **Pigment Cell Research**, [*s.l.*], v. 20, n. 5, p. 385–393, Oct. 2007.

CASTRO, Tassia Flavia Dias *et al.* The toxicological effects of *Eryngium foetidum* extracts on zebrafish embryos and larvae depend on the type of extract, dose, and exposure time. **Toxicology Research**, [England], v. 11, n. 5, p. 891, Oct. 2022.

CHAHARDEHI, Amir Modarresi; ARSAD, Hasni; LIM, Vuanghao. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. **Plants**, [Basel], v. 9, n. 10, Oct. 2020.

CHANG, Tsung-Hsien *et al.* Association between vitiligo and subsequent risk of dementia: A population-based cohort study. **Journal of Dermatology**, [Japan], v. 48, n. 1, p. 28–33, Jan. 2021.

CHEN, Chih-Yu *et al.* Lipid extract from a vegetable (*Sonchus oleraceus*) attenuates adipogenesis and high fat diet-induced obesity associated with AMPK activation. **Frontiers in Nutrition**, [Switzerland], v. 8, Apr. 2021.

CHEN, Lei *et al.* Anti-inflammatory effect of self-emulsifying delivery system containing *Sonchus oleraceus* Linn extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, [England], v. 135, Jan. 2020a.

CHEN, Lei *et al.* *Sonchus oleraceus* Linn extract enhanced glucose homeostasis through the AMPK/Akt/ GSK-3 β signaling pathway in diabetic liver and HepG2 cell culture. **Food and Chemical Toxicology**, [England], v. 136, Feb. 2020b.

CHEN, Lei *et al.* *Sonchus oleraceus* Linn protects against LPS-induced sepsis and inhibits inflammatory responses in RAW264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, [Ireland], v. 236, p. 63–69, May 2019.

CHEN, Lei; TENG, Hui; CAO, Hui. Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, [England], v. 127, p. 182–187, May 2019.

CHEN, Wang-Chuan *et al.* Discovery of highly potent tyrosinase inhibitor, T1, with significant anti-melanogenesis ability by zebrafish in vivo assay and computational molecular modeling. **Scientific Reports**, [England], v. 5, Jan. 2015.

CHIU, Jasper Z. S. *et al.* Chlorogenic acid supplementation benefits zebrafish embryos exposed to auranofin. **Pharmaceutics**, [Switzerland], v. 12, n. 12, p. 1–8, Dec. 2020.

CHO, Myong-Suk *et al.* Sow thistle chloroplast genomes: Insights into the plastome evolution and relationship of two weedy species, *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). **Genes**, [Switzerland], v. 10, n. 11, Nov. 2019.

CHRYSARGYRIS, Antonios; GOUMENOS, Christos; TZORTZAKIS, Nikolaos. Use of medicinal and aromatic plant residues for partial peat substitution in growing media for *Sonchus oleraceus* production. **Agronomy**, [Basel], v. 13, n. 4, Apr. 2023.

CHRYSARGYRIS, Antonio; TZORTZAKIS, Nikolaos. Optimising fertigation of hydroponically grown sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.): The impact of the nitrogen source and supply concentration. **Agricultural Water Management**, [Netherlands], v. 289, Nov. 2023.

CORDERO, Radames J. B.; CASADEVALL, Arturo. Melanin. **Current Biology**, v. 30, n. 4, p. R142–R143, Feb. 2020.

DE PAULA FILHO, Galdino Xavier; BARREIRA, Tibério Fontenele; PINHEIRO-SANT'ANA, Helena Maria. Chemical composition and nutritional value of three *Sonchus* species. **International Journal of Food Science**, [England], v. 2022, Mar. 2022.

DELL'ANNA, Maria Lucia *et al.* Antioxidants and narrow band-UVB in the treatment of vitiligo: A double-blind placebo controlled trial. **Clinical and Experimental Dermatology**, [England], v. 32, n. 6, p. 631–636, Nov. 2007.

DEY, Abhipsha *et al.* DNA repair genes play a variety of roles in the development of fish embryos. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [Switzerland], v. 11, Mar. 2023.

DIEPGEN, T. L.; MAHLER, V. Photoprotective properties of skin melanin. **British Journal of Dermatology**, [England], v. 61, n. s. 61, p. 7-10, May 2002.

DOBÓN-SUÁREZ, Alicia *et al.* Influence of the phenological stage and harvest date on the bioactive compounds content of green pepper fruit. **Molecules**, [Switzerland], v. 26, n. 11, May 2021.

DUARTE DA SILVA, Kiara Cândido *et al.* Embriotoxic and antioxidant effects of *Cymbopogon citratus* leaf volatile oil on zebrafish. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 33, n. 4, p. 778–789, June 2023.

DUBEY, Nawal K. *et al.* Common toxic plants and their forensic significance. *In: Natural products and drug discovery: an integrated approach*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. p. 349–374.

EL-DESOUKY, Tarek A. Evaluation of effectiveness aqueous extract for some leaves of wild edible plants in Egypt as anti-fungal and anti-toxicogenic. **Heliyon**, [United Kingdom], v. 7, n. 2, Feb. 2021.

ELSHIKH, Ahmed A. *et al.* *In-vitro* investigation of anti-parasite, anti-oxidant activities, cytotoxicity and GC/MS analysis of ehanolic extracts for *Rhynchosia memnonia* var. *memnonia* and *Sonchus oleraceus* used in sudanese ethnomedicine. **ChemistrySelect**, [Germany], v. 8, n. 12, Mar. 2023.

EZZEDINE, Khaled *et al.* Vitiligo. The Lancet. **Anais eletrônicos...** Lancet Publishing Group, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25596811/>. Acesso em: 13 maio 2021.

FARAG, Azza Gaber Antar *et al.* IL32:A novel pro-inflammatory cytokine involved in non-segmental vitiligo pathogenesis. **Human Gene**, [s.l.], v. 39, Feb. 2024.

GITSOPOULOS, K. *et al.* Looking beyond glyphosate for site-specific fallow weed control in Australian grain production. **Agronomy**, [s.l.], v. 13, n. 7, July 2023.

GUARRERA, P. M.; SAVO, V. Perceived health properties of wild and cultivated food plants in local and popular traditions of Italy: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, [Ireland], v. 146, n. 13, Apr. 2013.

GUO, Zhen *et al.* The enrichment and purification of hexabromocyclododecanes and its effects on thyroid in zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [England], v. 185, Dec. 2019.

HAMEED, Ashwaq Talib; AL-ALH, Nbaa Mutea Abid; JUMAA, Asmaa Wajeh. Antioxidant activity and phytominerals study of some asteraceae species growth in western of Iraq. **Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 2239–2245, Jan. 2021.

HARISHKUMAR, Rajendran *et al.* Toxicity and selective biochemical assessment of quercetin, gallic acid, and curcumin in zebrafish. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 42, n. 12, p. 1969–1976, 2019.

HASSAN, Mahmoud O.; SALEH, Ahmed M.; ABDELGAWAD, Hamada. *Sonchus oleraceus* residue improves nutritive and health-promoting value of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A metabolic study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [United States], v. 66, n. 9, p. 2092–2100, Mar. 2018.

HE, Yuanmin *et al.* Dysregulated autophagy increased melanocyte sensitivity to H₂O₂-induced oxidative stress in vitiligo. **Scientific Reports**, [England], v. 7, n. 1, p. 1–11, Feb. 2017.

HEREWARD, James P. *et al.* Complete chloroplast genome of glyphosate resistant *Sonchus oleraceus* L. from Australia, with notes on the small single copy (SSC) region orientation. **Mitochondrial DNA Part B: Resources**, [*s.l.*], v. 3, n. 1, p. 363–364, Jan. 2018.

HILL, Adrian J. *et al.* Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, [United States], v. 86, n. 1, p. 6–19, July 2005.

HONG, S. Wei *et al.* Integrative pharmacology reveals the mechanisms of Erzhi pills, A traditional Chinese formulation, stimulating melanogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, [Ireland], v. 324, Apr. 2024.

HSU, Chia-Hao; LIOU, Gunn-Guang; JIANG, Yun-Jin. Nicastrin deficiency induces tyrosinase-dependent depigmentation and skin inflammation. **Journal of Investigative Dermatology**, [United States], v. 140, n. 2, p. 404-414.e13, Feb. 2020.

HUM, J. M. *et al.* A small molecule inhibitor of Mitf-E-box DNA binding and its depigmenting effect in melan-a cells. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [England], v. 26, n. 10, p. 1291–1297, Oct. 2012.

HUYAN, Ting *et al.* Anti-tumor effect of hot aqueous extracts from *Sonchus oleraceus* (L.) L. and *Juniperus sabina* L - Two traditional medicinal plants in China. **Journal of Ethnopharmacology**, [Ireland], v. 185, p. 289–299, June 2016.

IANNELLA, Giannicola *et al.* Vitiligo: Pathogenesis, clinical variants and treatment approaches. **Autoimmunity Reviews**, [United States], v. 15, n. 4, p. 335-343, Apr. 2016.

JAIN, Anju *et al.* Study of oxidative stress in vitiligo. **Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB**, [*s.l.*], v. 26, n. 1, p. 78–81, Jan. 2011.

KELLEY, Nathan *et al.* The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [United States], v. 20, n. 13, July 2019.

KESSLER, André; KALSKE, Aino. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. **Annual Reviews**, [*s.l.*], v. 49, p. 115-138, Nov. 2018.

KIM, Hae-Young *et al.* Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. **Life Sciences**, [England], v. 210, p. 201–208, Oct. 2018.

KIM, Nan-Hyung; KIM, Ha Jung; LEE, Ai-Young. Aquaporin-3 downregulation in vitiligo keratinocytes increases oxidative stress of melanocytes. **Biomolecules & Therapeutics**, [South Korea], v. 31, n. 6, p. 648–654, Nov. 2023.

LAI, Xuelei *et al.* Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. **Chemistry - A European Journal**, [*s.l.*], v. 24, n. 1, p. 47-55, Jan. 2018.

LAJIS, Ahmad Firdaus B. A Zebrafish Embryo as an animal model for the treatment of hyperpigmentation in cosmetic dermatology medicine. **Medicina**, [Lithuania], v. 54, n. 3, July 2018.

- LAWRENCE, Christian. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, [Netherlands], v. 269, n. 1-4, p. Sept. 2007.
- LEE, Ai-Young. Role of keratinocytes in the development of vitiligo. **Annals of Dermatology**, [South Korea], v. 24, n. 2, p. 115-125, May 2012.
- LEE, Dae Young. *et al.* Melanogenesis inhibition activity of floralginsenoside A from *Panax ginseng* berry. **Journal of Ginseng Research**, [South Korea], v. 41, n. 4, p. 602–607, Oct. 2017.
- LEE, Yeong Ro *et al.* Skin depigmenting action of silkworm (*Bombyx mori* L.) droppings in zebrafish. **Archives of Dermatological Research**, [Germany], v. 310, n. 3, p. 245–253, Apr. 2018.
- LI, Qi *et al.* The anti-inflammatory effect of *Sonchus oleraceus* aqueous extract on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells and mice. **Pharmaceutical Biology**, [Netherlands], v. 55, n. 1, p. 799–809, Jan. 2017.
- LI, Shuli *et al.* Clinical significance of serum oxidative stress markers to assess disease activity and severity in patients with non-segmental vitiligo. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [Switzerland], v. 9, Dec. 2021.
- LI, Xiang-Yong *et al.* Identification of a sustainable two-plant diet that effectively prevents age-related metabolic syndrome and extends lifespan in aged mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [United States], v. 51, p. 16–26, Jan. 2018.
- LIESCHKE, Graham J.; CURRIE, Peter D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, [England], v. 8, p. 353-367, May 2007.
- LIMA, K. K. C. **Análise genética, composição fenólica e das capacidades antioxidantes in vitro, e embriotóxicas e melanogênica em zebrafish de extratos de *Sonchus oleraceus*.** 2020. 120 p. Tese (Doutorado em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.
- MIAO, Lu; ST. CLAIR, Daret K. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, [United States], v. 47, n. 4, p. 344-356, Aug. 2009.
- MILKOVIĆ, Lidija; GAŠPAROVIĆ, Ana Čipak. AQP3 and AQP5-potential regulators of redox status in breast cancer. **Molecules**, [Basel], v. 26, n. 9, May 2021.
- MISHRA, Manoj Kumar *et al.* An efficient protocol for clonal regeneration and excised root culture with enhanced alkaloid content in *Thalictrum foliolosum* DC.— an endemic and important medicinal plant of temperate Himalayan region. **Industrial Crops and Products**, [Netherlands], v. 152, Sept. 2020.
- MITCHELL, Constance A. *et al.* The Botanical Safety Consortium: A public-private partnership to enhance the botanical safety toolkit. **Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP**, [United States], v. 128, Feb. 2022.

- MORRISON, Jane *et al.* The attractiveness of five common mediterranean weeds to pollinators. **Agronomy**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. 1314, July 2021.
- MOTIANI, Rajender K. *et al.* STIM 1 activation of adenylyl cyclase 6 connects Ca²⁺ and cAMP signaling during melanogenesis . **The EMBO Journal**, [s.l.], v. 37, n. 5, Mar. 2018.
- NAKAZAWA, Kiko *et al.* Ca²⁺ and UVB radiation have no effect on e-cadherin-mediated melanocyte-keratinocyte adhesion. **Pigment Cell Research**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 255–262, Oct. 1995.
- NASCIMENTO, Ana Carolina Machado *et al.* Vitiligo - aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos e manejo terapêutico. **Brazilian Journal of Health Review**, [Paraná], v. 7, n. 1, p. 6139–6151, fev. 2024.
- NOBELA, O. *et al.* Tapping into the realm of underutilised green leafy vegetables: Using LC-IT-Tof-MS based methods to explore phytochemical richness of *Sonchus oleraceus* (L.) L. **South African Journal of Botany**, [South Africa], v. 145, p. 207–212, Mar. 2022.
- NOUIDHA, Sameh *et al.* Metabolomics profiling of Tunisian *Sonchus oleraceus* L. extracts and their antioxidant activities. **Chemistry & Biodiversity**, [Switzerland], v. 20, n. 8, Aug. 2023.
- OU, Zong-Quan *et al.* Influence of postharvest processing and storage conditions on key antioxidants in pūhā (*Sonchus oleraceus* L.). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [England], v. 66, n. 7, p. 998–1008, July 2014.
- OU, Zong-Qua.; RADES, Thomas; MCDOWELL, Arlene. Anti-ageing effects of *Sonchus oleraceus* L. (pūhā) leaf extracts on H₂O₂-induced cell senescence. **Molecules**, [Switzerland], v. 20, n. 3, p. 4548–4564, Mar. 2015.
- PANFILI, Gianfranco *et al.* Bioactive compounds in wild asteraceae edible plants consumed in the mediterranean diet. **Plant Foods for Human Nutrition**, [Netherlands], v. 75, n. 4, p. 540–546, Dec. 2020.
- PARSAD, Davinder; PANDHI, R.; JUNEJA, A. Effectiveness of oral Ginkgo biloba in treating limited, slowly spreading vitiligo. **Clinical and Experimental Dermatology**, [England], v. 28, n. 3, p. 285–287, May 2003.
- PAVARINI, Daniel Petinatti *et al.* Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, [Netherlands], v. 176, n. 1–4, p. 5–16, Sept. 2012.
- PEERZADA, Arslan Masood; O'DONNELL, Chris; ADKINS, Steve. Biology, impact, and management of common sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, [Germany], v. 41, n. 136, Aug. 2019.
- PICARDO, Mauro *et al.* Vitiligo. **Nature Reviews Disease Primers**, [England], v. 1, June 2015.

PICARDO, Mauro; BASTONINI, Emanuela. A new view of vitiligo: Looking at normal-appearing skin. **Journal of Investigative Dermatology**, [United States], July 2015.

QIAO, Liping *et al.* Novel browning alleviation technology for fresh-cut products: Preservation effect of the combination of *Sonchus oleraceus* L. extract and ultrasound in fresh-cut potatoes. **Food Chemistry**, [England], v. 348, June 2021.

RILEY, P. A. Melanin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [*s.l.*], v. 29, n. 11, p. 1235–1239, Nov. 1997.

SALIM, Nesreen S. *et al.* Phenolic profiles, antihyperglycemic, anti-diabetic, and antioxidant properties of Egyptian *Sonchus oleraceus* Leaves Extract: An in vivo study. **Molecules**, [Switzerland], v. 28, n. 17, p. 6389, Sept. 2023.

SALMI, Talhah M.; TAN, Vicky W. T.; COX, Andrew G. Dissecting metabolism using zebrafish models of disease. **Biochemical Society Transactions**, [England], v. 47, n. 1, p. 305-315, Feb. 2019.

SARECKA-HUJAR, Beata; SZULC-MUSIOŁ, Beata. Herbal medicines-are they effective and safe during pregnancy? **Pharmaceutics**, [Switzerland], v. 14, n. 1, Jan. 2022.

SAXENA, Akhil; KUMAR, Jagdeep. Phytochemical screening, metal-binding studies and applications of floral extract of *Sonchus oleraceus* as a corrosion inhibitor. **Journal of Bio-and Tribo-Corrosion**, [*s.l.*], v. 6, n. 2, p. 1–10, June 2020.

SEAL, Tapan; CHAUDHURI, Kausik; PILLAI, Basundhara. Nutritional and toxicological aspects of selected wild edible plants and significance for this society. **South African Journal of Botany**, [South Africa], v. 159, n. 3, p. 219–230, Aug. 2023.

SERGIO, Lucrezia *et al.* Bioactive phenolics and antioxidant capacity of some wild edible greens as affected by different cooking treatments. **Foods**, [Switzerland], v. 9, n. 9, Sept. 2020.

SHAKER, Olfat; EL-TAHLAWI, Samar; FAWZY, Mina. Intestinal fatty acid bind protein as a biomarker for vitiligo. **Journal of the Egyptian Women's Dermatologic Society**, [*s.l.*], v. 21, n. 1, p. 52, 2024.

SHI, M.-H. *et al.* Meta-analysis of the association between vitiligo and the level of superoxide dismutase or malondialdehyde. **Clinical and Experimental Dermatology**, [England], v. 42, n. 1, p. 21–29, Jan. 2017.

SPEECKAERT, Reinhart; VAN GEEL, Nanja. Vitiligo: An update on pathophysiology and treatment options. **American Journal of Clinical Dermatology**, [New Zealand], v. 18, n. 6, p. 733-744, Dec. 2017.

SRAVANI, P. V. *et al.* Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, [*s.l.*], v. 75, n. 3, p. 268–271, May/June 2009.

TANVIR, Rabia *et al.* Fatty acid based antimicrobials from *Streptomyces* sp. SORS-24, an endophyte isolated from *Sonchus oleraceus*. **Letters in Applied Microbiology**, [England], v. 76, n. 8, Aug. 2023.

TEUGWA, Clautilde Mofor *et al.* Antioxidant and antidiabetic profiles of two African medicinal plants: *Picralima nitida* (Apocynaceae) and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [England], v. 13, July 2013.

THORNBY, David; WERTH, Jeff; WALKER, Steven. Managing glyphosate resistance in Australian cotton farming: Modelling shows how to delay evolution and maintain long-term population control. **Crop and Pasture Science**, [*s.l.*], v. 64, n. 8, p. 780–790, Oct. 2013.

TORRES-GONZÁLEZ, Liliana *et al.* Nephroprotective effect of *Sonchus oleraceus* extract against kidney injury induced by ischemia-reperfusion in Wistar rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [United States], v. 2018, 2018.

VACHTENHEIM, Jiri; BOROVSANSKÝ, Jan. “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: Central role of MITF. **Experimental Dermatology**, [Denmark], v. 19, n. 7, p. 617-627, July 2010.

VILELA, Fabiana Cardoso *et al.* Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [Ireland], v. 124, n. 2, p. 306–310, July 2009.

VILELA, Fabiana Cardoso; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [Ireland], v. 124, n. 2, p. 325–327, July 2009.

VILELA, Fabiana Cardoso *et al.* Antidepressant-like activity of *Sonchus oleraceus* in mouse models of immobility tests. **Journal of Medicinal Food**, [United States], v. 13, n. 1, p. 219–222, Feb. 2010.

WANG, X. X. *et al.* Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo. **British Journal of Dermatology**, [England], v. 174, n. 6, p. 1318–1326, June 2016.

WANG, Yawei *et al.* AQP3-mediated H₂O₂ uptake inhibits LUAD autophagy by inactivating PTEN. **Cancer Science**, [Japan], v. 112, n. 8, p. 3278–3292, Aug. 2021.

WIDDERICK, Michael J. *et al.* Germination, emergence, and persistence of *Sonchus oleraceus*, a major crop weed in subtropical Australia. **Weed Biology and Management**, [Japan], v. 10, n. 2, p. 102–112, June 2010.

WILLEMSSEN, Marcella *et al.* Skin-resident memory T cells as a potential new therapeutic target in vitiligo and melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, [*s.l.*], v. 32, n. 5, p. 612-622, Sept. 2019.

XIA, Dao-Zong *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (*Sonchus spp.*) in China. **Natural Product Research**, [England], v. 25, n. 20, p. 1893–1901, Dec. 2011.

- XIAO, Bi-Huan *et al.* Glutathione peroxidase level in patients with vitiligo: A meta-analysis. **BioMed Research International**, [United States], v. 2016, n. 10, p. 1-11, Apr. 2016.
- XU, Yangguang *et al.* The enantioselective enrichment, metabolism, and toxicity of fenoxaprop-ethyl and its metabolites in zebrafish. **Chirality**, [United States], v. 32, n. 7, p. 990–997, July 2020.
- YI, Xiuli *et al.* SIRT3-dependent mitochondrial dynamics remodeling contributes to oxidative stress-induced melanocyte degeneration in vitiligo. **Theranostics**, [Australia], v. 9, n. 6, p. 1614–1633, Feb. 2019.
- YILDIRIM, Mehmet *et al.* The role of oxidants and antioxidants in generalized vitiligo at tissue level. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [England], v. 18, n. 6, p. 683–686, Nov. 2004.
- YIN, Jie; KWON, Gu-Joong; WANG, Myeong-Hyeon. The antioxidant and cytotoxic activities of *Sonchus oleraceus* L. extracts. **Nutrition Research and Practice**, [South Korea], v. 1, n. 3, p. 189-194, Sept. 2007.
- ZHANG, Zhao *et al.* Mitochondrial NCKX5 regulates melanosomal biogenesis and pigment production. **Journal of Cell Science**, [England], v. 132, n. 14, July 2019.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE DOS EXTRATOS AQUOSO
E ETANÓLICO DE *Sonchus oleraceus* SUBMETIDA AO CULTIVO ORGÂNICO EM
DIFERENTES ÉPOCAS DE COLHEITA: UM ESTUDO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico Brazilian Journal of Pharmacognosy

(Versão preliminar)

Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos toxicológicos no desenvolvimento embrionário em zebrafish dos extratos das folhas secas de *S. oleraceus* cultivada em sistema de cultivo orgânico em diferentes tipos de solventes de extração (etanólico e aquoso) e estádios fenológicos da planta (vegetativo e reprodutivo). Os extratos foram obtidos por meio de sistema de refluxo simples, evaporados a 40 °C e liofilizados. Os ensaios embriotoxicológicos foram realizados até 5 dias pós-fertilização (dpf). As doses utilizadas para avaliação da embriotoxicidade foram: 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,020 e 0,010 mg/mL de meio para embriões. Nossos achados demonstraram que, independentemente do sistema de cultivo ou solvente de extração, doses iguais e inferiores a 0,312 mg/mL não apresentaram efeitos teratogênicos, e a sobrevivência foi acima de 90%. Observamos que o extrato que apresentou maior letalidade e deformidade em menores doses foi o extrato hidroetanólico da folha seca de *S. oleraceus* em fase de colheita vegetativa (C1ET), em 5 dias pós-fertilização, com a dose de 0,689 mg/mL, causando 50% de mortalidade, e com a dose de 0,386 mg/mL sendo capaz de levar a 50% de deformidades (EC50); conseqüentemente, maior índice teratogênico (IT) no valor de 1,785. Os principais efeitos teratogênicos encontrados foram atraso no desenvolvimento, edema de saco vitelínico e pericárdio e lordose, evidenciados na dose de 0,625 mg/mL. Doses acima de 1,25 mg/mL apresentam alto percentual de letalidade. Portanto, os resultados deste estudo indicam que os efeitos toxicológicos são dose-dependentes e que as atividades biológicas podem ser influenciadas pelo estágio fenológico da planta, bem como pelo solvente de extração.

Palavras-chave: toxicidade, plantas medicinais, dose-resposta, citotoxicidade, letalidade.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the toxicological effects of extracts from dried leaves of *S. oleraceus* grown in an organic cultivation system in different types of extraction solvents (ethanolic and aqueous) and phenological stages of the plant (vegetative and reproductive) on embryonic development in zebrafish. The extracts were obtained by means of a simple reflux system, evaporated at 40 °C and lyophilized. Embryotoxicological tests were performed up to 5 days post-fertilization (dpf). The doses used to evaluate embryotoxicity were: 2.5; 1.25; 0.625; 0.312; 0.156; 0.078; 0.039; 0.020 and 0.010 mg/mL of embryo medium. Our findings demonstrated that, regardless of the cultivation system or extraction solvent, doses equal to or lower than 0.312 mg/mL did not present teratogenic effects, and survival was above 90%. We observed that the extract that presented the highest lethality and deformity at lower doses was the hydroethanolic extract of the dry leaf of *S. oleraceus* in the vegetative harvest phase (C1ET), 5 days after fertilization, with the dose of 0.689 mg/mL, causing 50% mortality, and with the dose of 0.386 mg/mL being capable of leading to 50% deformities (EC50); consequently, a higher teratogenic index (TI) of 1.785. The main teratogenic effects found were delayed development, yolk sac and pericardial edema, and lordosis, evidenced at the dose of 0.625 mg/mL. Doses above 1.25 mg/mL present a high percentage of lethality. Therefore, the results of this study indicate that the toxicological effects are dose-dependent and that the biological activities can be influenced by the phenological stage of the plant, as well as by the extraction solvent.

Keywords: toxicity, medicinal plants, dose-response, cytotoxicity, lethality.

Introdução

Sonchus oleraceus Linn é uma planta pertencente à família Asteraceae, nativa da Europa, Norte de África e Ásia Ocidental. Teve uma significativa propagação pela América, China e região Sul da Austrália (Chauhan *et al.* 2006) e atualmente é encontrada em várias partes do mundo (CABI 2023). Conhecida popularmente como serralha, chicória-brava ou serraia no Brasil, a *Sonchus oleraceus* é considerada uma planta invasora resistente a vários agroquímicos (Peerzada *et al.* 2019) e prejudicial à cultura do algodoeiro, entre outros (Thornby *et al.* 2013).

Entretanto, é muito apreciada na alimentação, principalmente devido ao sabor amargo, sendo utilizada comumente em saladas, decocções e infusões (Vilela *et al.* 2009). *S. oleraceus* é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC) (De Oliveira *et al.* 2022), muito utilizada na medicina chinesa devido à associação entre seu consumo e longevidade, e isto se deve aos inúmeros benefícios à saúde atribuídos às substâncias bioativas presentes na planta (Li *et al.* 2018).

Em relação às substâncias bioativas, e considerando alguns estudos fitoquímicos da *S. oleraceus*, foram relatadas a presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, quinonas, esteroides (Saxena e Kumar 2020), ácido cafárico, ácido chicórico (Sergio *et al.* 2020), ácido clorogênico, ácido cafeico (Chen *et al.* 2019), vilosol, ácido feruláico, β -sitosterol, ácido ursólico, rutina (Li *et al.* 2017), quercetina e apigenina (Alrekabi e Hamad 2018) e alguns sesquiterpenos (Zhang *et al.* 2020). Estas substâncias estão diretamente relacionadas com a atividade biológica da planta, sendo recentemente demonstrados os efeitos anti-hiperglicêmicos (Salim *et al.* 2023); atividade antimicrobiana (Tanvir *et al.* 2023); atividade antioxidante (Nouidha *et al.* 2023); atividade antiparasitária (Elshikh *et al.* 2023); gastroproteção (Vecchia *et al.* 2022); atividade ansiolítica e outras amplamente relatadas em estudos de revisão (Li e Yang 2018; Puri *et al.* 2018).

Embora inúmeros benefícios à saúde relatados para a espécie, estudos de toxicidade ainda são escassos. De fato, efeitos tóxicos no fígado, rins e pulmões provenientes do extrato metanólico e aquoso da parte aérea da *S. oleraceus* foram demonstrados em camundongos (Aissani *et al.* 2022). Não obstante, o modelo zebrafish (*Danio rerio*) cresce exponencialmente na ciência, visto que os peixes são sensíveis à exposição química durante o desenvolvimento inicial (Hill *et al.* 2005), proporcionando análises de embriotoxicidade e efeitos teratogênicos, além de inúmeras vantagens, como baixo custo, alta fecundidade e rápido desenvolvimento (Lawrence 2007; Selderslaghs *et al.* 2009). Um estudo avaliou o potencial benéfico do ácido clorogênico, comumente encontrado na serralha, em embriões e larvas de zebrafish (Chiu *et al.* 2020). Entretanto, os estudos relacionados à planta utilizando modelo zebrafish ainda são totalmente escassos.

Mediante o contexto, as substâncias bioativas de uma planta podem variar de acordo com o estágio fenológico (Dobón-Suárez *et al.*, 2021), com a parte da planta utilizada, bem como com o solvente e método de extração (Aissani *et al.* 2021). Todavia, estudos sobre essas variações não foram explorados conjuntamente na espécie. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos toxicológicos no desenvolvimento embrionário em zebrafish dos extratos das folhas secas de *S. oleraceus* cultivada em sistema de cultivo orgânico em diferentes tipos de solventes de extração (etanólico e aquoso) e estádios fenológicos da planta (vegetativo e reprodutivo).

Material e Métodos

Apreciação ética

Os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com o Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados sob protocolo nº 014/2019 no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras, UFLA, localizada em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Cultivo de *Sonchus oleraceus*

O cultivo da serralha foi em condições de campo, localizado a 21°14'S, 45°00'W, com altitude de 918 metros, em sistema de cultivo agroecológico. As sementes foram adquiridas no banco de germoplasma de plantas alimentícias não convencionais (PANCs) da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Realizou-se a semeadura na primavera (setembro de 2021), utilizando substrato comercial. Foram semeadas (5-6 sementes) por célula em bandeja de poliestireno e mantidas em casa de vegetação. Após as plântulas emergirem, foi realizado o desbaste quinze dias após a semeadura e mantida uma planta por célula.

Os resultados da análise do solo da área de cultivo foram: MO: 25,22 g.dm⁻³; pH: 6,71; P: 105,12 mg.dm⁻³; K⁺: 243,58 mg.dm⁻³; Ca²⁺ e Mg²⁺: 48,91 e 13,21 mmolc.dm⁻³, respectivamente; e V = 86,21%.

A partir dos dados obtidos na análise do solo, dois dias antes do transplântio realizou-se a adubação com esterco aviário estabilizado (2-2,5 L/m²), conforme preconizado para a espécie (Santos *et al.* 2012). Realizou-se o transplântio das mudas (n = 140) quando as plantas atingiram no mínimo 5 folhas verdadeiras, totalizando vinte e nove dias após semeadura. A irrigação foi por gotejamento a cada 4 horas em canteiro a pleno sol. Foi realizado o levantamento dos canteiros com enxada até o alcance de aproximadamente 0,25 metros de altura, com espaçamento de 20 cm² entre as plantas. Não foi realizado nenhum tipo de aplicação química para controle de doenças e pragas, apenas solução contendo água e detergente neutro.

Utilizou-se como alternativa para atrair polinizadores o cultivo de coentro e alface nas bordas dos canteiros. No total foram necessários 5,67 metros de canteiro.

Durante o cultivo, realizou-se manualmente (capina) o controle do crescimento de outras espécies, a fim de diminuir a competição por nutrientes do solo. O controle foi realizado a cada 3 dias até o final do experimento. Aos vinte e três dias após o transplântio, realizou-se a primeira colheita na fase vegetativa da planta ($n = 60$), conforme Figura 1. Aos trinta e cinco dias após o transplântio, realizou-se a segunda colheita na fase reprodutiva da planta ($n = 60$), quando as plantas apresentavam no mínimo 3 pendões florais, conforme Figura 2. Foi realizada no período da manhã a colheita das folhas (parte aérea) da planta em ambos os estádios fenológicos em que se encontrava. Por fim, foi depositada, sob o número 58897, a exsicata da planta no Herbário da EPAMIG (Empresa Agropecuária de Minas Gerais), em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Obtenção das amostras vegetais

No pós-colheita, as folhas de *S. oleraceus* oriundas do cultivo agroecológico foram colhidas no período da manhã (6-8h). As folhas foram desidratadas em estufa de circulação de ar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ até peso constante. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas empregando-se peneira de 0,3 mm. O pó das folhas foi armazenado em frasco de vidro protegido da luz e conservado em ultrafreezer a -80 °C até a preparação dos extratos.

Preparo dos extratos

O método extrativo foi adaptado da metodologia descrita por Aissani *et al.* (2021). Desse modo, extratos aquosos e hidroetanólicos a 70% (5% m/v) foram preparados por refluxo

de 20 minutos a partir da fervura. Em seguida, os extratos foram filtrados a vácuo em funil de Büchner, concentrados em rotavapor a 40 °C sob pressão reduzida e mantidos em dessecador a vácuo até secura. Posteriormente, foram liofilizados seguindo a metodologia de Smach *et al.* (2015), mantidos em frascos sob proteção da luz e armazenados em *freezer* a -20 °C, até as análises cromatográficas. Foram preparados quatro extratos, quais sejam: C1AQ - extrato aquoso de folhas da primeira colheita (fase vegetativa); C2AQ - extrato aquoso de folhas da segunda colheita (fase reprodutiva); C1ET - extrato hidroetanólico de folhas da primeira colheita (fase vegetativa); e C2ET - extrato hidroetanólico de folhas da segunda colheita (fase reprodutiva).

Preparo da amostra para análise de cromatografia líquida

Os extratos liofilizados (5 mg) foram pesados diretamente em microtubos de 1,5 mL e solubilizados em 1.000 µL de água ultrapura, e em seguida agitação em vórtex por 2 minutos e centrifugação a 10.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante (10 µL) foi injetado automaticamente em sistemas de cromatografia líquida.

Análises cromatográficas

Caracterização do ácido chicórico nas amostras

A presença do ácido chicórico nos extratos C1AQ, C2AQ, C1ET e C2ET foi caracterizada empregando-se cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (UHPLC-MS/MS) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (HPLC-DAD). À exceção da análise por UHPLC-MS/MS, as

demais foram comparadas com padrão autêntico de ácido chicórico (Supelco®; $\geq 98.0\%$ de pureza). A análise por UHPLC-MS/MS não foi comparada ao padrão, pois a quantidade existente no momento dessas análises não foi suficiente.

As análises por UHPLC-MS/MS foram realizadas em um sistema Dionex™ Ultimate™ 3000 System, junto a Fleet LCQ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), consistindo em um forno desgaseificador de solvente, uma bomba de ultra-alta pressão, um amostrador automático e um controlador de temperatura da coluna. Empregou-se uma coluna Acquity UHPLC BEH C18 (2,1 mm x 150 mm x 1,7 μm , Waters, Milford, MA), com fluxo de 0,45 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 40 °C e a fase móvel foi água, contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). Empregou-se eluição em gradiente: 0–5 min, 5% (B); 5–25 min, 5–100% (B); 25–30 min, 100% (B); 30–31 min, 100–5% (B); e 31–36 min, 5% (B). O espectrômetro de massas (MS), equipado com fonte de *electrospray* (ESI), foi operado no modo de ionização negativo. O nitrogênio de alta pureza (N₂) foi usado como “sheath gas” (20 unidades arbitrárias) e “auxiliary gas” (10 unidades arbitrárias). O hélio de alta pureza (He) foi usado como gás de colisão (“collision gas”). Os parâmetros MS foram os seguintes: tensão de fonte 5 kV, tensão capilar 7 V, tensão de lente do tubo 65 V e temperatura capilar 400 °C. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa de 100–1000 m/z. Para os estudos de fragmentação, foi utilizado um CID (Collision Induced Dissociation) de 35 eV.

A caracterização do ácido chicórico nas amostras por HPLC-DAD foi realizada em sistema Agilent 1200 Series (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha), equipado com bomba quaternária (G1311A), sistema de desgaseificação (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A) e detector de arranjo de diodos (G1315D), com detector ultravioleta de comprimento de onda variável (G1315D), conectado ao computador com sistema controlado pelo *software* EzChrom, versão OpenLAB. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa Eclipse XDB-C18 (5 μm × 150 mm × 4,6 mm I.D.) (Agilent

Technologies®, EUA), com pré-coluna, mantida a 35 °C. A eluição empregou água (A) e acetonitrila (B), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fosfórico, como segue: 0-5 min, 30% B; 5-8 min, 30-70% B; 8-10 min, 70-30; e 10-15 min, 30% B. O volume de injeção de amostras foi de 10 µL, a taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e a detecção no comprimento de onda a 320 nm. A presença do ácido chicórico nas amostras foi realizada por meio de comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e coinjeção com ácido chicórico de referência.

Quantificação do ácido chicórico

A quantificação do ácido chicórico foi realizada por HPLC-DAD empregando-se o método do padrão externo (Ribani *et al.* 2004) nas mesmas condições de análises realizadas para a caracterização do ácido chicórico. Para a construção da curva analítica, a faixa de concentração do ácido chicórico foi estimada a partir das áreas relativas do pico de interesse nas amostras e a partir de uma solução de referência com concentração de 0,50 mg mL⁻¹.

A linearidade do método foi determinada a partir de duas curvas analíticas construídas com cinco pontos em dias diferentes. Cada ponto das curvas foi obtido por injeção em triplicata de diferentes volumes (2 a 10 µL) de uma solução de ácido chicórico de referência a 0,50 mg mL⁻¹. As curvas analíticas foram determinadas em relação à massa injetada (µg) de ácido chicórico.

Os dados obtidos para cada curva de calibração foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, e os coeficientes de determinação (R²) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ($p < 0,05$) no *software* Graph Pad Prism 6. As amostras foram analisadas em quintuplicata e os teores de ácido chicórico foram expressos em mg por grama de extrato (mg g⁻¹).

Manejo das matrizes de reprodutores zebrafish (*Danio rerio*)

Os procedimentos experimentais foram conduzidos na Ala de Peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Adultos de zebrafish (*Danio rerio*), linhagem WT (selvagem), com aproximadamente 7 meses, foram adquiridos no Biotério Central da UFLA. Os animais foram mantidos em *rack* de recirculação de água (Hidrus, modelo ZEB-40), a 27 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), pH 7,4 ($\pm 0,1$) e 0,8 ($\pm 0,3$) mOsm (controle automatizado), ciclo claro/escuro 14:10, alimentados quatro vezes ao dia, com ração comercial Alcon basic®, SC, BRA, (2x), e náuplios de artêmia salina (2x), escalados da seguinte forma: as 09h00 ração comercial, 12h00 náuplios de artêmia, 14h00 ração comercial e 17h00 náuplios de artêmia. Em todos os momentos eles foram alimentados até saciedade aparente (Paiva *et al.*, 2020). Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados diariamente e corrigidos quando necessário conforme preconizado para a espécie, e foram mantidos até no máximo 12 peixes por aquário de 3 litros (Lawrence e Mason 2012).

Protocolo de reprodução e obtenção dos embriões

Fêmeas e machos foram mantidos juntos em aquários com capacidade máxima de 3 litros, separados na noite anterior por grades específicas para estimular a desova. Para a reprodução foi feita a proporção de 1 macho para cada fêmea (Spence *et al.* 2008), e uma hora antes do término do ciclo escuro foram mantidos em criadeira (ZebClean, Alesco, SP, BR) de fundo gradeado a fim de evitar canibalismo dos embriões (Adatto *et al.* 2011).

Os embriões foram coletados cuidadosamente com auxílio de pipeta Pasteur e transferidos para placas de Petri em até 60 minutos pós-fertilização. Em seguida lavados três vezes em meio para embriões contendo azul de metileno 0,2% a fim de diminuir qualquer risco

de contaminação proveniente do processo de reprodução (Peneyra *et al.*, 2020). O meio para embriões utilizado foi descrito por Di Chiacchio *et al.* (2021), e consistiu em preparar uma solução estoque composta por 0,1875 g de carbonato de cálcio, 1,875 g de bicarbonato de sódio, 3 g de sal marinho e 1 L de água destilada. Posteriormente, o meio foi diluído em água destilada, sendo 20% do volume da solução estoque. Por fim, os embriões (n = 40) foram distribuídos aleatoriamente em placas de Petri contendo meio para embriões sem azul de metileno a fim de evitar o mínimo de interferência nas análises toxicológicas em estufa a 28 °C por 6 horas.

Preparo do meio para embriões contendo os extratos

Os extratos foram pesados em balança de precisão, diluídos em meio para embriões e mantidos em banho ultrassônico por 10 minutos sobre o abrigo da luz. Em seguida, foram centrifugados a 4.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, utilizando-se apenas o sobrenadante. As concentrações foram baseadas em um estudo prévio utilizando 14 concentrações de extratos de *S. oleraceus* (dados não publicados) de nosso grupo de pesquisa e, posteriormente, foram selecionadas 9 concentrações de trabalho, sendo elas: 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,312 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,078 mg/mL, 0,039 mg/mL, 0,020 mg/mL e 0,010 mg/mL; e o controle foi exposto apenas em meio para embriões.

Ensaio de toxicidade aguda em embriões e larvas de zebrafish

Os testes toxicológicos foram realizados em conformidade com a diretriz da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) nº 236: (FET/Test) *Fish Embryo Acute Toxicity* (OCDE 2013). Em 6 horas pós-fertilização (hpf), foram selecionados 40 embriões para cada tratamento e mantidos em placas de Petri com volume total de 12 mL.

O controle foi exposto apenas em meio para embriões. Os tratamentos foram: (A) C1ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa, (B) C1AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa (C), C2ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva, e (D) C2AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva.

Durante toda a execução do ensaio, os embriões foram mantidos em estufa a 28 °C (\pm 1°C) e em ciclo claro/escuro 12:12. Após 24 hpf, foram selecionados 20 embriões e distribuídos em microplacas de 96 poços (1 embrião por poço), com volume total de 200 μ L (meio para embrião + extrato). As placas foram vedadas com Parafilm a fim de evitar evaporação do meio (Duarte da Silva *et al.* 2023). O teste foi considerado válido quando o controle obteve mortalidade inferior a 10% no final da exposição de 120 horas. O desenvolvimento foi monitorado por cinco dias de avaliação, sendo considerado 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf, 96 hpf e 120 hpf (horas pós-fertilização). Com auxílio de microscópio óptico (Olympus, modelo CX22LED, Japão) com câmera acoplada (Motic30), os embriões foram monitorados e as alterações encontradas fotografadas.

Os parâmetros analisados foram: formação de somitos, pigmentação dos olhos e corpo, presença de batimentos cardíacos, destacamento e malformações de cauda, edemas de pericárdio e saco vitelino (OCDE, 2013), lordose, movimentos espontâneos, presença de circulação dorsal e atraso no desenvolvimento (Alafiatayo *et al.* 2019; Hallare *et al.* 2004). Os testes foram realizados em triplicata (Basnet *et al.* 2017). Ao final do experimento, os animais que estavam vivos foram eutanasiados com overdose de tricáina 250 mg/L (Duarte da Silva *et al.* 2023).

Avaliação da taxa de eclosão, sobrevivência, deformidades e mortalidade

Todos os parâmetros foram analisados diariamente por meio da porcentagem efetiva de cada tratamento/concentração pelo número total de embriões ($n = 20$) em triplicata. Independentemente da alteração morfológica apresentada, todos foram considerados ao final da avaliação diária com deformidades.

Análise da dose-resposta dos extratos

As concentrações foram convertidas em *log* e obtidas as curvas sigmóides ajustando-se adequadamente aos dados. A dose-resposta foi obtida através do EC₅₀ (deformados) e LC₅₀ (mortalidade). O índice teratogênico foi calculado como a razão entre LC₅₀/EC₅₀, conforme sugerido por Alafiatayo *et al.* (2019).

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 10. Inicialmente foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Os dados avaliados ao longo do tempo são apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados que não passaram no teste de normalidade foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste post-hoc de comparações múltiplas de *Dunnett's*, através do valor mediano ao nível de significância $p < 0,05$. Os dados para EC₅₀ e LC₅₀ foram transformados em *log* da concentração para aproximar de uma distribuição normal e avaliados através *log agonist vs response (Variable slop)* a fim de analisar a resposta biológica. Os dados de quantificação do ácido chicórico foram submetidos ao teste de média *Scott Knott* utilizando o programa estatístico SISVAR, versão 5.6.

Resultados

Caracterização do ácido chicórico nas amostras

O perfil cromatográfico por UHPLC-MS/MS indicou um pico com tempo de retenção (TR) em 10,4 minutos, referente ao íon fragmento m/z 472,9 Da (Fig. 3). Esse pico apresentou perfil de fragmentação por ESI-MS/MS no modo negativo (Fig. 4) compatível com um éster cafeico do ácido tartárico. O íon molecular desprotonado $[M-H]^-$ de m/z 472,9 Da sugere a forma molecular $C_{22}H_{17}O_{12}^-$, característica do ácido chicórico desprotonado. No espectro ESI-MS/MS do íon fragmento m/z 472,9 $[M-H]^-$ é possível observar os fragmentos de m/z 311, 293, 179 e 162 característicos dessa molécula (Carazzone *et al.* 2013; Zheleva-Dimitrova *et al.* 2023). O pico base em m/z 311 indica a perda de uma porção cafeoila $[M-H-162]^-$. O fragmento em m/z 293 corresponde à perda de uma unidade cafeoila, seguida de desidratação $[M-H-162-18]^-$. O fragmento em m/z 179 sugere a ocorrência de resíduo de ácido cafeico, devido à perda de uma unidade cafeoiltartárica $[M-H-162-132]^-$ (Carazzone *et al.* 2013). Por fim, o íon fragmento em m/z 162 é característico da perda de um resíduo cafeoila e outro de ácido tartárico $[M-H-162-149]^-$, levando à identificação do ácido dicafeoiltartárico, também conhecido como ácido chicórico.

A caracterização do ácido chicórico por HPLC-DAD foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e coinjeção com padrão. A Figura 5 ilustra a presença de ácido chicórico na amostra pela sobreposição dos tempos de retenção da amostra, da coinjeção e do padrão de ácido chicórico em 3,97 minutos. O pico correspondente ao ácido chicórico na amostra apresentou homogeneidade espectral com o espectro do pico do padrão, atestando a seletividade do método.

Quantificação do ácido chicórico

As curvas analíticas obtidas em dois dias consecutivos indicaram relação linear com base na massa injetada e nas áreas dos picos relacionados, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9982 e 0,9999. Estes valores indicam a existência de relação linear entre a massa injetada de ácido chicórico (μg) *versus* a área do pico correspondente, sendo obtidos coeficientes de determinação (R^2) entre 0,9982 e 0,9999. A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das duas retas foram equivalentes e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios, resultando na equação média $y = 6.517.065 x + 29.055$ e com R^2 médio de 0,9994. A concentração do ácido chicórico nas amostras \pm o desvio padrão ($n = 5$) está apresentada na Tabela 2.

Teste de toxicidade aguda (LC_{50} , EC_{50} e índice teratogênico) em embriões e larvas de zebrafish

Os testes demonstraram que a dose, a época de colheita e o solvente de extração afetaram todos os parâmetros avaliados. Observou-se que o extrato que apresentou maior letalidade e deformidade em menores doses foi o C1ET (Fig.6A) aos 5 dpf, apresentando $LC_{50} = 0,689$ mg/mL e $EC_{50} = 0,386$ mg/mL, conseqüentemente maior índice de teratogenicidade (IT 1,785). Apresentaram semelhança entre os parâmetros os extratos C1AQ (Fig. 6B): $LC_{50} = 1,149$ mg/mL, $EC_{50} = 0,717$ mg/mL e IT = 1,603; e C2ET (Fig. 3C): $LC_{50} = 1,181$ mg/mL, $EC_{50} = 0,727$ mg/mL e IT = 1,624. Ademais, o C2AQ (Fig. 6D) apresentou $LC_{50} = 0,725$ mg/mL e IT = 1,135, porém, o EC_{50} foi de 0,639 mg/mL, demonstrando que a dose para deformidades foi maior quando comparado o mesmo parâmetro com o extrato C1ET.

Teste de sobrevivência ao longo do tempo e 120 hpf

A sobrevivência nos controles foi acima de 94,33% ao final de 120 hpf em todos os ensaios realizados. Foi demonstrado 100% de mortalidade para as doses 2,5 e 1,25 mg/mL dos extratos C2AQ (Fig. 4B) e C1ET (Fig. 7C) em até 48 hpf; e C2ET em até 72 hpf (Fig. 7D). Para o extrato C1AQ, apenas a dose de 2,5 mg/mL atingiu 100% de mortalidade em 48 hpf (Fig. 7A). Para o extrato C1AQ (Fig. 7E), observou-se que a mortalidade foi maior para a dose 1,25 mg/mL ($F_{(9,20)} = 43,21$, $p < 0,0001$) quando comparada às demais doses. Os extratos C2AQ (Fig. 7F) e C2ET (Fig. 7H) apresentaram menor sobrevivência na dose 0,625 mg/mL $p = 0,0017$ e $p = 0,003$, respectivamente. O extrato C1ET (Fig. 7G) apresentou alta mortalidade para as doses 2,5; 1,25 e 0,625 mg/mL ($F_{(9,20)} = 121,9$, $p < 0,0001$). Em contrapartida, as doses menores que 0,312 mg/mL para todos os extratos demonstraram semelhança ao controle com sobrevivência acima de 85% ao longo da exposição (Fig. 7 A-D).

Teste de deformidades ao longo do tempo e 120 hpf

Para o parâmetro deformidade, as principais alterações encontradas nos extratos foram destacamento de cauda, lordose e edemas (saco vitelínico e pericárdio), conforme Figura 10. Também foram observados atrasos no desenvolvimento dos embriões dependentes da dose até 48 hpf para os extratos C2ET e C2AQ, conforme Figura 8 (B e D) e Figura 10. Em relação ao extrato C1AQ (Fig. 8A), este apresentou 100% de deformidades para a dose de 1,25 mg/mL. Para a dose de 0,625 mg/mL do C1ET (Fig. 8C), observou-se que em até 96 hpf atingiu 100% de deformidades, ou seja, demonstrando efeitos tóxicos. Foi observado que doses inferiores a 0,312 mg/mL apresentaram menor percentual de deformidades para os extratos C1AQ, C2AQ

e C2ET (Fig. 8A, B e D). Em contrapartida, o C1ET (Fig. 8C) apresentou considerável efeito em deformidades na dose de 0,312 mg/mL, apresentando uma média de 25% entre as triplicatas.

Em relação à análise dos extratos em 5 dpf, os extratos C2AQ ($F_{(7,16)} = 11,25$, $p < 0,0001$) e C2ET ($F_{(7,16)} = 6,409$, $p = 0,0005$), dose de 0,625 mg/mL, apresentaram maior percentual de deformidades quando comparados às demais concentrações (Figura 8F e 8H, respectivamente). Em relação ao C1ET (Fig.8G), doses de 0,625 e 0,312 mg/mL ($F_{(7,16)} = 620,2$, $p < 0,0001$), apresentou maior percentual de deformidades quando comparado aos demais grupos. E o extrato C1AQ (Fig.8E), doses de 1,25 mg/mL ($F_{(8,18)} = 66,94$, $p < 0,0001$), apresentou maior número de deformados quando comparada a dose de 0,625 mg/mL ($p = 0,0022$), que por sua vez apresentou maior deformidade em relação a menores concentrações.

Teste da taxa de eclosão ao longo do tempo e 72 hpf

Para o parâmetro taxa de eclosão para o C1AQ (Fig.9A), observou-se 100% de eclosão em 3 dpf para doses inferiores a 312 mg/mL; a dose de 1,25 mg/mL atingiu apenas 75% de eclosão em 5 dpf. Para C2AQ (Fig.9B), doses inferiores a 0,156 mg/mL apresentaram 100% de eclosão ao 3º dia pós-fertilização; 80% para dose de 0,312 mg/mL; e dose de 0,625 mg/mL atingiu 100% de eclosão aos 5 dias pós-fertilização. Em relação ao extrato C1ET (Fig. 9C), semelhantemente ao C2AQ, doses inferiores a 0,156 mg/mL atingiram 100% de eclosão, enquanto que na dose de 0,312 mg/mL 100% de eclosão ocorreram em 5 dpf; e para a dose de 0,625mg/mL apenas 80% de eclosão em 5 dpf. Para o extrato C2ET, todos estavam 100% eclodidos em doses inferiores a 0,625 mg/mL em até 4 dpf, exceto para a dose de 1,25 mg/mL, que atingiu apenas 38% de eclosão em 5 dpf, demonstrando atraso no desenvolvimento.

O extrato C2AQ (Fig. 9F) obteve menor taxa de eclosão aos 3 dpf para a dose de 0,625 mg/mL ($F_{(7,16)} = 55,83$, $p < 0,0001$); menores taxas de eclosão foram encontradas

semelhantemente para as doses de 0,625 mg/mL e 0,312 mg/mL ($F_{(7,16)} = 1318$, $p < 0,0001$) no extrato C1ET (Fig. 9G). A dose de 1,25 mg/mL ($F_{(8,18)} = 41,9$, $p < 0,0001$) apresentou menor taxa de eclosão quando comparada à dose de 0,625 mg/mL ($p = 0,0325$) e demais doses para o extrato C1AQ (Fig. 9E). O extrato C2ET apresentou comportamento semelhante ao C1AQ, sendo que a dose de 1,25 ($F_{(8,18)} = 24,81$ mg/mL, $p < 0,0001$) também apresentou menor taxa de eclosão quando comparada à dose de 0,625 mg/mL ($p = 0,0001$) e quando comparada às demais.

No geral, a taxa de eclosão corrobora indiretamente o teste de deformidades, visto que os extratos C1ET e C2ET ~ 12% dos animais que não estavam eclodidos apresentaram pelo menos uma deformidade associada. O controle apresentou 100% de eclosão em até 3 dpf, conforme esperado para a espécie.

Discussão

Nossa pesquisa demonstrou que a planta em fase reprodutiva apresentou maiores efeitos tóxicos dose-dependentes quando comparada à planta em fase vegetativa. O extrato aquoso em fase vegetativa (C1AQ) demonstrou-se mais seguro quanto a deformidades (efeito colateral) quando comparado ao extrato etanólico (C1ET). Todavia, é possível afirmar que em todos os extratos as doses inferiores a 0,312 mg/mL são mais seguras independentemente da fase da planta ou solvente de extração. As diferenças estatísticas encontradas para deformidades mostraram que ocorreu heterogeneidade dentro do grupo associado aos embriões não eclodidos, e que os efeitos foram dose-dependentes.

O C1ET apresentou maior TI (Fig. 6- A~D), sendo na seguinte ordem: C1ET > C2ET > C1AQ > C2AQ. Este índice sugere que essas substâncias podem causar deformidades graves sem serem letais, porém aquelas que apresentarem maior letalidade podem apresentar baixas

deformidades em menores doses (Lee *et al.* 2013). A hipótese para o atraso no desenvolvimento dos embriões é que a exposição aguda pode provocar alterações nas funções metabólicas essenciais para suprir uma necessidade momentânea, restabelecendo-se em seguida, visto que muitos embriões conseguiram alcançar o desenvolvimento normal até 5 dpf, porém não é sabido os efeitos ao atingir a fase adulta. É importante ressaltar que a dose de 2,5 mg/mL foi 100% letal para todos os extratos em até 48 hpf.

Nossos achados confirmaram a presença de uma substância majoritária em todos os extratos, sendo ela o ácido chicórico. Porém, o solvente de extração e o estágio fenológico da planta influenciaram consideravelmente na quantidade dessa substância. A presença de ácido chicórico em *S. oleraceus* é bem documentada na literatura (Ou *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2020; Yang *et al.* 2022). Similarmente, em um estudo com extrato metanólico obtido de folhas desidratadas de *S. oleraceus*, o ácido chicórico foi o composto de maior concentração, entretanto, também foi relatada a presença de ácido caftárico e ácido clorogênico (Ou *et al.* 2014).

Um estudo com vegetais folhosos, incluindo *S. oleraceus*, detectou vários derivados do ácido cafeico, entre eles o ácido chicórico (Sergio *et al.* 2020). Outro estudo realizado no Mediterrâneo, no oeste da Ilha de Creta na Grécia, analisou dois períodos de cultivo (no início e final da primavera) de várias plantas da família Asteraceae, cujo ponto de colheita das folhas foi em fase comestível, e os pesquisadores também demonstraram a presença do ácido chicórico em *S. oleraceus*, em ambas as épocas de cultivo (Petropoulos *et al.* 2019). Logo, podemos inferir que o ácido chicórico está intimamente relacionado com a atividade biológica de *S. oleraceus*. Entretanto, estudos que avaliam os efeitos toxicológicos dessa substância, sejam em células ou modelos animais, ainda são escassos.

Um estudo com as partes aéreas de *S. oleraceus* seca em temperatura ambiente demonstrou diferentes atividades biológicas conforme os sete diferentes tipos de solventes de

extração, e os principais efeitos biológicos foram demonstrados principalmente na inibição da colinesterase (Aissani *et al.* 2021). Corroborando nossos achados, os autores desse estudo também demonstraram diferentes efeitos toxicológicos (dose-dependentes) em relação ao tipo de solvente utilizado, conseqüentemente as atividades biológicas podem sofrer grandes variações (devido à sinergia) em decorrência da presença das substâncias presentes em cada extrato.

Não obstante, utilizando o modelo zebrafish, o ácido clorogênico encontrado amplamente em *S. oleraceus* apresentou efeito protetor contra deformidades e contribuiu para o desenvolvimento normal dos embriões em doses inferiores a 250 µM ao longo de 5 dpf (Chiu *et al.* 2020). Resultados similares foram encontrados por nosso estudo em doses inferiores a 0,312 mg/mL, independentemente do solvente de extração e estágio fenológico da planta. Ainda referente ao estudo da exposição ao ácido clorogênico, os autores concluem que extratos provenientes da *S. oleraceus* têm potencial para fornecer maiores efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário (Chiu *et al.* 2020).

Em um estudo com artêmias (*Artemia salina* L), o extrato etanólico de *S. oleraceus* a 80% apresentou baixa toxicidade (LC₅₀ = 1000 µg/mL) (Elshikh *et al.* 2023). Um outro estudo, porém utilizando o extrato aquoso, encontrou LC₅₀ igual a 5.120 ppm, também indicando baixa toxicidade em artêmias salinas (Lima *et al.* 2009). Um estudo utilizando nanopartículas do extrato aquoso de *S. oleraceus*, contendo óxido de zinco, provocou mortalidade de 95% de *E. coli* em até 5 horas de exposição e não apresentou toxicidade em células normais (Tariq *et al.* 2021). Logo, é importante enfatizar que efeitos tóxicos em microrganismos resistentes que prejudicam a saúde humana e animal são desejáveis. Todavia, sugerimos que doses superiores a 1,25 mg/mL devem ser investigadas em bactérias resistentes e parasitas, que possuem grande importância em saúde pública, contribuindo para elucidação e novas possibilidades em atividade antibacteriana e antiparasitária.

Um estudo demonstrou efeitos protetores contra inseticidas em parâmetros hematológicos, hepáticos e renais no soro de frangos de corte utilizando a *S. oleraceus* em concentração de 1% como aditivo alimentar acrescida na alimentação dos animais (Nassar e El-Naggar 2021). Também um estudo utilizando os extratos etanólico e diclorometânico de *S. oleraceus* em camundongos Swiss não apresentou toxicidade em doses inferiores a 5000 mg/kg (Vilela *et al.* 2009).

Recentemente, foram avaliadas em várias plantas silvestres alimentícias a toxicidade hemolítica, a genotoxicidade e a citotoxicidade em níveis celulares e genômicos. Dentre as espécies relatadas, a *S. oleraceus* também foi analisada, e os autores consideraram todas as plantas seguras para o consumo alimentar (Seal *et al.* 2023). Logo, estudos do uso seguro de *S. oleraceus* como potente fitoterápico devem ser estimulados, visto que no processo de extração concentram-se as substâncias bioativas, diferentemente da quantidade e disponibilidade dessas como alimento.

Corroborando nossos achados, a PANC chicória (*Eryngium foetidum* Linn) foi submetida aos ensaios toxicológicos em zebrafish em diferentes solventes de extração, sendo eles aquoso, etanólico e metanólico, e os autores concluíram que os extratos causaram maior mortalidade e alteraram o tempo de eclosão em concentrações superiores a 0,625 mg/mL, de acordo com o tempo de exposição (Castro *et al.* 2022).

Outras plantas medicinais que apresentam diferentes atividades biológicas também apresentaram efeitos embriotóxicos. O estudo de revisão demonstrou LC₅₀ de 0,70 mg/mL em rizomas de *Curcuma xanthorriza* (gingibre) e LC₅₀ de 345,96 mg/L de flores de *Carthamus tinctorius* (cártamo), com considerável atraso na taxa de eclosão, ambas em 96 hpf, entre outras espécies também relatadas (Jayasinghe e Jayawardena 2019), corroborando LC₅₀ encontrado similarmente em nosso estudo, bem como o atraso no desenvolvimento. Portanto, é perceptível

que o modelo zebrafish possui maior sensibilidade a algumas substâncias bioativas, o que, em contrapartida, não seja eficazmente demonstrado em cultura de células (Hill *et al.* 2012).

Todavia, o atraso no desenvolvimento embrionário é um fator a ser considerado, pois a planta na fase reprodutiva deve ser utilizada com cautela, principalmente em gestantes no primeiro trimestre. Recentemente, um estudo referente ao uso de plantas medicinais na gestação, parto e pós-parto demonstrou o uso incorreto e indiscriminado, e cerca de 9,7% são referentes à família Asteraceae, porém, os possíveis efeitos toxicológicos e teratogênicos devem ser explorados em pesquisa (Jan *et al.* 2023).

Atualmente, a pesquisa em toxicologia tem por finalidade identificar substâncias bioativas capazes de gerar uma toxicidade específica em curto período (Bambino e Chu 2017), assim como anomalias congênitas através de pesquisas em teratologia. Logo, o modelo zebrafish tem sido adotado em triagem de fármacos como modelo viável e confiável (Zakaria *et al.* 2018) e como modelo complementar em desenvolvimento de mamíferos (Nishimura *et al.* 2016). Desse modo, o modelo zebrafish, através do uso de embriões e larvas, cresce exponencialmente acerca dos mecanismos de toxicidade, sendo um modelo capaz de elucidar o uso seguro de plantas medicinais (Chahardehi *et al.* 2020) e, portanto, estudos utilizando-o devem ser estimulados.

Por fim, é importante ressaltar que as substâncias presentes em cada extrato terão influência do solvente de extração, visto que substâncias polares são melhores extraídas em solventes polares e substâncias apolares em solventes apolares (Nawaz *et al.* 2020). A toxicidade de cada extrato variou em decorrência da presença de substâncias bioativas no fitocomplexo, tanto pela influência do solvente de extração quanto pelo estágio fenológico da planta.

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que os efeitos toxicológicos são dose-dependentes e que as atividades biológicas podem ser influenciadas pelo estágio fenológico da planta, bem como pelo solvente de extração. Doses iguais ou inferiores a 0,312 mg/mL demonstraram baixíssima ou nenhuma toxicidade em todos os extratos, doses iguais ou superiores a 0,625 mg/mL apresentaram maior percentual para deformidades e doses de 2,5 mg/mL apresentaram alta toxicidade aguda contra zebrafish em estágios iniciais de desenvolvimento. Sugerimos que o extrato C1AQ é o mais seguro para o uso terapêutico.

Agradecimentos

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro e bolsas de estudo e de produtividade. À Profa. Suzana Leitão, Profa. Ivana Leal e Dra. Simony Carvalho Mendonça, da Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos (CA-DPNA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pelas análises de UHPLC-UVMS-MS.

Referências

- Adatto I, Lawrence C, Thompson M, Zon LI (2011) A new system for the rapid collection of large numbers of developmentally staged zebrafish embryos. PLoS One 6. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021715>
- Aissani F, Grara N, Bensouici C, Bousbia A, Ayed H, Idris MHM, Teh LK (2021) Algerian *Sonchus oleraceus* L.: a comparison of different extraction solvent on phytochemical composition, antioxidant properties and anti-cholinesterase activity. Adv Tradit Med 22:383-394. <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00553-y>
- Aissani F, Grara N, Guelmamene R (2022) Phytochemical screening and toxicity investigation of hydro-methanolic and aqueous extracts from aerial parts of *Sonchus oleraceus* L. in Swiss albino mice. Comp Clin Path 31:509–528. <https://doi.org/10.1007/S00580-022->

03349-X/FIGURES/10

- Alafiatayo AA, Lai KS, Syahida A, Mahmood M, Shaharuddin NA (2019) Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of curcuma longa extract on Zebrafish (*Danio rerio*). Evidence-based Complement Altern Med 2019:1-10. <https://doi.org/10.1155/2019/3807207>
- Alrekabi DG, Hamad MN (2018) Phytochemical investigation of *Sonchus oleraceus* (Family:Asteraceae) cultivated in Iraq, isolation and identification of quercetin and apigenin. J Pharm Sci Res 10:2242-2248.
- Bambino K, Chu J (2017) Zebrafish in toxicology and environmental health. Curr Top Dev Biol 124:331–367. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2016.10.007>
- Basnet RM, Guarienti M, Memo M (2017) Zebrafish Embryo as an in vivo model for behavioral and pharmacological characterization of methylxanthine drugs. Int J Mol Sci 18. <https://doi.org/10.3390/IJMS18030596>
- Castro TFD, Carneiro WF, Reichel T, Fabem SL, Machado MRF, De Souza KKC, Resende LV, Murgas LDS (2022) The toxicological effects of *Eryngium foetidum* extracts on zebrafish embryos and larvae depend on the type of extract, dose, and exposure time. Toxicol Res 11:891-899. <https://doi.org/10.1093/TOXRES/TFAC067>
- Chahardehi AM, Arsad H, Lim V (2020) Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. Plants 9:1–35. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9101345>
- Chauhan BS, Gill G, Preston C (2006) Factors affecting seed germination of annual sowthistle (*Sonchus oleraceus*) in southern Australia. Weed Sci 54:854–860. <https://doi.org/10.1614/WS-06-047R.1>
- Chen L, Teng H, Cao H (2019) Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. Food Chem Toxicol 127:182–187. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.038>
- Chiu JZS, Hold I, Newman TAC, Horsfield JA, McDowell A (2020) Chlorogenic acid supplementation benefits zebrafish embryos exposed to auranofin. Pharm 12:1–8. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121199>
- Cho MS, Kim JH, Kim CS, Mejías JA, Kim SC (2019) Sow thistle chloroplast genomes: Insights into the plastome evolution and relationship of two weedy species, *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). Genes 10:881. <https://doi.org/10.3390/genes10110881>
- De Oliveira MF, Vaz LM de C, Rocha MDM (2022) Unconventional Food Plants (UFP) in the Shangrilá Municipal Park, São Paulo, SP. Rev Bras Meio Ambient 10:204–217. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.7321803>
- De Paula Filho GX, Barreira TF, Pinheiro-Sant’Ana HM (2022) Chemical composition and nutritional value of three sonchus species. Int J Food Sci 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4181656>
- Di Chiacchio IM, Paiva IM, Abreu DJM de, Carvalho EEN, Martínez PJ, Carvalho SM, Mulero V, Murgas LDS (2021) Bee pollen as a dietary supplement for fish: Effect on the reproductive performance of zebrafish and the immunological response of their offspring. Fish Shellfish Immunol 119:300-307. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.012>
- Dobón-Suárez A, Giménez MJ, Castillo S, García-Pastor ME, Zapata PJ (2021) Influence of the phenological stage and harvest date on the bioactive compounds content of green

- pepper fruit. *Mol* 26:3099. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113099>
- Duarte da Silva KCD, Virote B do CR, Santos M de F, Castro TFD, Martins MS de A, Carneiro, WF, Murgas LDS (2023) Embriotoxic and antioxidant effects of *Cymbopogon citratus* leaf volatile oil on zebrafish. *Rev Bras Farmacogn* 33:778–789. <https://doi.org/10.1007/S43450-023-00410-W>
- Elshikh AA, Elnour M, Elkamali H, Elbalola A, Garbi M (2023) In-vitro investigation of anti-parasite, anti-oxidant activities, cytotoxicity and GC/MS analysis of ethanolic extracts for *Rhynchosia memnonia* var. *memnonia* and *Sonchus oleraceus* used in Sudanese Ethnomedicine. *ChemistrySelect* 8. <https://doi.org/10.1002/SLCT.202204036>
- Hallare AV, Köhler HR, Triebkorn R (2004) Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* 56:659–666. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.04.007>
- Hill A, Mesens N, Steemans M, Xu JJ, Aleo MD (2012) Comparisons between in vitro whole cell imaging and in vivo zebrafish-based approaches for identifying potential human hepatotoxicants earlier in pharmaceutical development. *Drug Metab Rev* 44:127–140. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.645578>
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE (2005) Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 86:6–19. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFI110>
- Jan M, Mir TA, Jan HA, Bussmann RW, Anneaus S (2023) Ethnomedicinal study of plants utilized in pregnancy, childbirth and postpartum healthcare in Kashmir Himalaya. *J Herb Med* 42. <https://doi.org/10.1016/J.HERMED.2023.100767>
- Jayasinghe CD, Jayawardena UA (2019) Toxicity assessment of herbal medicine using zebrafish embryos: A systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7272808>
- Lawrence C (2007) The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquac* 269:1-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- Lawrence C, Mason T (2012) Zebrafish housing systems: A review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR J* 53:179–191. <https://doi.org/10.1093/ILAR.53.2.179>
- Lee SH, Kang JW, Lin T, Lee JE, Jin DI (2013) Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. *Biomed Res Int* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/726478>
- Li Q, Dong DD, Huang QP, Li J, Du YY, Li B, Li HQ, Huyan T (2017) The anti-inflammatory effect of *Sonchus oleraceus* aqueous extract on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells and mice. *Pharm Biol* 55:799–809. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1280514>
- Li XM, Yang PL (2018) Research progress of *Sonchus* species. *Int J Food Prop* 21:147–157. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1415931>
- Li XY, Liu YH, Wang B, Chen CY, Zhang HM, Kang JX (2018) Identification of a sustainable two-plant diet that effectively prevents age-related metabolic syndrome and extends lifespan in aged mice. *J Nutr Biochem* 51:16–26. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.09.003>
- Lima JM, Silva CA, Rosa MB, Santos JB, Oliveira TG, Silva MB (2009) Prospecção fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. *Planta Daninha* 27:7–11. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582009000100002>

- Nassar AMK, El-Naggar AS (2021) Beneficial effects of smooth sowthistle (*Sonchus oleraceus*) as feed additive against side effects of malathion insecticide to broilers. *Pestic Res J* 33:87–98. <https://doi.org/10.5958/2249-524X.2021.00024.8>
- Nawaz H, Shad MA, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N (2020) Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian J Pharm Sci* 56. <https://doi.org/10.1590/S2175-97902019000417129>
- Nishimura Y, Inoue A, Sasagawa S, Koiwa J, Kawaguchi K, Kawase R, Maruyama T, Kim S, Tanaka T (2016) Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenit Anom* 56:18–27. <https://doi.org/10.1111/CGA.12142>
- Nouidha S, Selmi S, Guignonis JM, Pourcher T, Chekir-Ghedira L, Kilani-Jaziri S (2023) Metabolomics profiling of Tunisian *Sonchus oleraceus* L. extracts and their antioxidant activities. *Chem Biodivers* 20. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202300290>
- Ou ZQ, Schmierer DM, Strachan CJ, Rades T, McDowell A (2014) Influence of postharvest processing and storage conditions on key antioxidants in pūhā (*Sonchus oleraceus* L.). *J Pharm Pharmacol* 66:998–1008. <https://doi.org/10.1111/JPHP.12220>
- Paiva IM, Sartori BM, Castro TFD, Lunkes LC, Virote B do CR, Murgas LDS, de Souza RP, Brunialti-Godard AL (2020) Behavioral plasticity and gene regulation in the brain during an intermittent ethanol exposure in adult zebrafish population. *Pharmacol Biochem Behav* 192. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2020.172909>
- Peerzada AM, O'Donnell C, Adkins S (2019) Biology, impact, and management of common sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.). *Acta Physiol Plant* 41. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2920-z>
- Peneyra SM, Lerpriyapong K, Riedel ER, Lipman NS, Lieggi C (2020) Impact of pronase, sodium thiosulfate, and methylene blue combinations on development and survival of sodium hypochlorite surface-disinfected zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Zebrafish* 17. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2020.1917>
- Petropoulos SA, Fernandes Â, Tzortzakis N, Sokovic M, Ciric A, Barros L, Ferreira ICFR (2019) Bioactive compounds content and antimicrobial activities of wild edible Asteraceae species of the Mediterranean flora under commercial cultivation conditions. *Food Res Int* 119:859–868. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.10.069>
- Puri AV, Khandagale PD, Ansari YN (2018) A review on ethnomedicinal, pharmacological and phytochemical aspects of *Sonchus oleraceus* Linn. (Asteraceae). 8.
- Salim NS, Abdel-Alim M, Said HEM, Foda MF (2023) Phenolic profiles, antihyperglycemic, anti-diabetic, and antioxidant properties of egyptian *Sonchus oleraceus* leaves extract: An in vivo study. *Molecules* 28. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28176389/S1>
- Saxena A, Kumar J (2020) Phytochemical screening, metal-binding studies and applications of floral extract of *Sonchus oleraceus* as a corrosion inhibitor. *J Bio-Tribo-Corrosion* 6:1–10. <https://doi.org/10.1007/s40735-020-00349-8>
- Seal T, Chaudhuri K, Pillai B (2023) Nutritional and toxicological aspects of selected wild edible plants and significance for this society. *South African J Bot* 159:219–230. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2023.05.044>
- Selderslaghs IWT, Van Rompay AR, De Coen W, Witters HE (2009) Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish

- embryo. *Reprod Toxicol* 28:308–320. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2009.05.004>
- Sergio L, Boari F, Pieralice M, Linsalata V, Cantore V, Di Venere D (2020) Bioactive phenolics and antioxidant capacity of some wild edible greens as affected by different cooking treatments. *Foods* 9. <https://doi.org/10.3390/foods9091320>
- Smach MA, Hafsa J, Charfeddine B, Dridi H, Limem K (2015) Effects of sage extract on memory performance in mice and acetylcholinesterase activity. *Ann Pharm Fr* 73:281-288. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2015.03.005>
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev* 83:13–34. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2007.00030.X>
- Tanvir R, Sajid I, Rehman Y, Hasnain S (2023) Fatty acid based antimicrobials from *Streptomyces sp.* SORS-24, an endophyte isolated from *Sonchus oleraceus*. *Lett Appl Microbiol* 76. <https://doi.org/10.1093/LAMBIO/OVAD080>
- Tariq M, Khan AU, Rehman AU, Ullah S, Jan AU, Zakareya KZUH, Muhammad N, Islam ZU, Yuan Q (2021) Green synthesis of ZnO@GO nanocomposite and its' efficient antibacterial activity. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 35. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2021.102471>
- Thornby D, Werth J, Walker S (2013) Managing glyphosate resistance in Australian cotton farming: Modelling shows how to delay evolution and maintain long-term population control. *Crop Pasture Sci* 64:780–790. <https://doi.org/10.1071/CP13109>
- Vecchia CAD, Locateli G, Serpa PZ, Gomes DB, Ernetti J, Miorando D, Zanatta MEDC, Nunes RKS, Wildner SM, Gutiérrez MV, Vilegas W, Somensi LB, Silva LM, Roman WA (2022) *Sonchus oleraceus* L. Promotes Gastroprotection in Rodents via Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antisecretory Activities. *Evidence-based Complement. Altern Med* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7413231>
- Vilela FC, Soncini R, Giusti-Paiva A (2009) Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *J Ethnopharmacol* 124:325–327. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.029>
- Zakaria ZZ, Benslimane FM, Nasrallah GK, Shurbaji S, Younes NN, Mraiche F, Da'As SI, Yalcin HC (2018) Using zebrafish for investigating the molecular mechanisms of drug-induced cardiotoxicity. *Biomed Res Int* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1642684>
- Zhang H, Wang Y, Wang S, Wang Q, Wang T, Zhu J, Liu B (2020) Cytotoxic sesquiterpenes from *Sonchus oleraceus*. *Anticancer Agents Med Chem* 20:709–714. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200101152934>

ANEXOS – FIGURAS

Figura 1 - *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa aos 23 dias após o transplante.



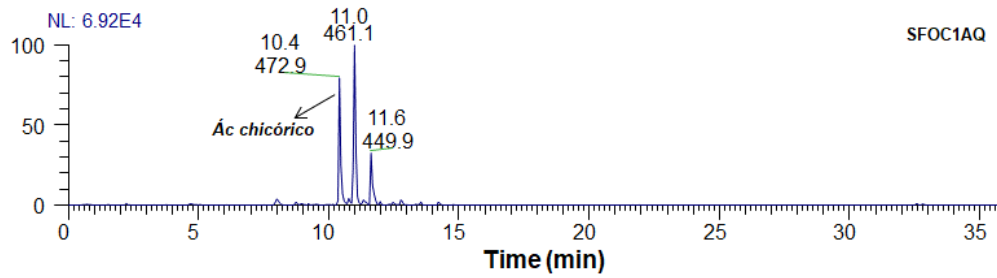
Fonte: Da autora (2023).

Figura 2 - *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva aos 35 dias após o transplante.



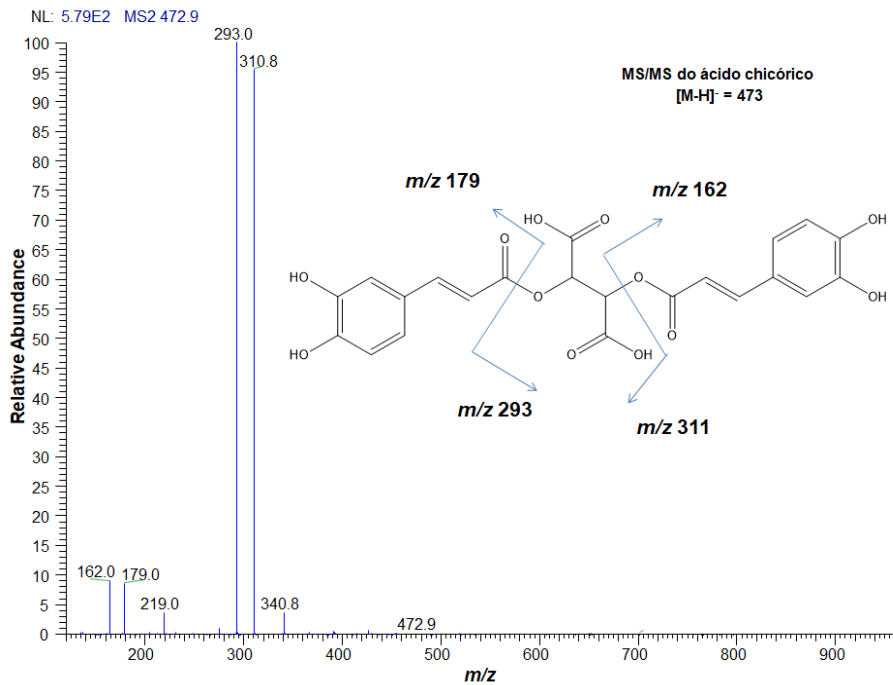
Fonte: Da autora (2023).

Figura 3 - Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS (modo negativo) representativo dos extratos de *S. oleraceus*.



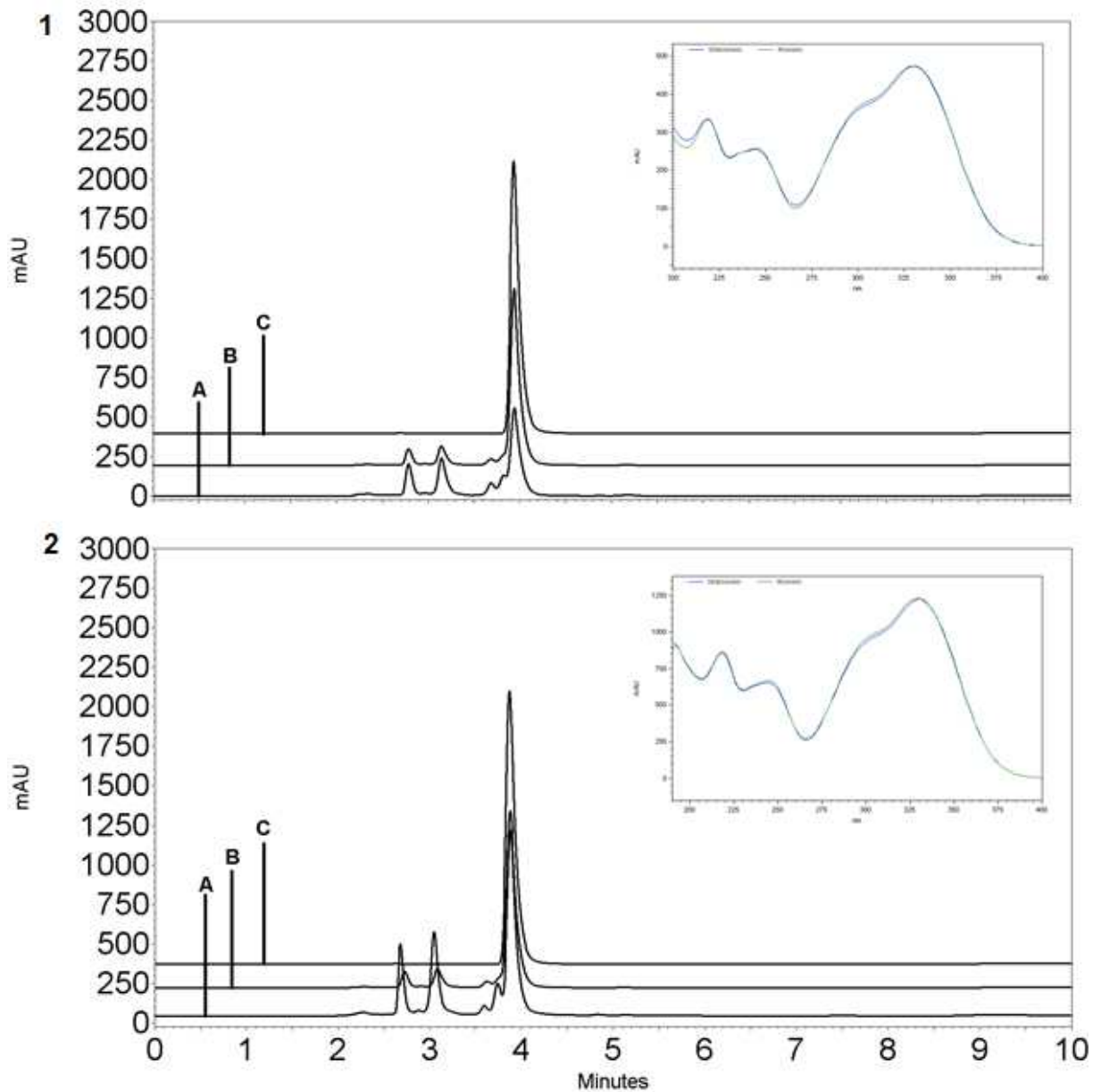
Fonte: Da autora (2024).

Figura 4 - Espectro ESI-MS/MS no modo negativo do íon de m/z 472.9 $[M-H]^-$.



Fonte: Da autora (2024).

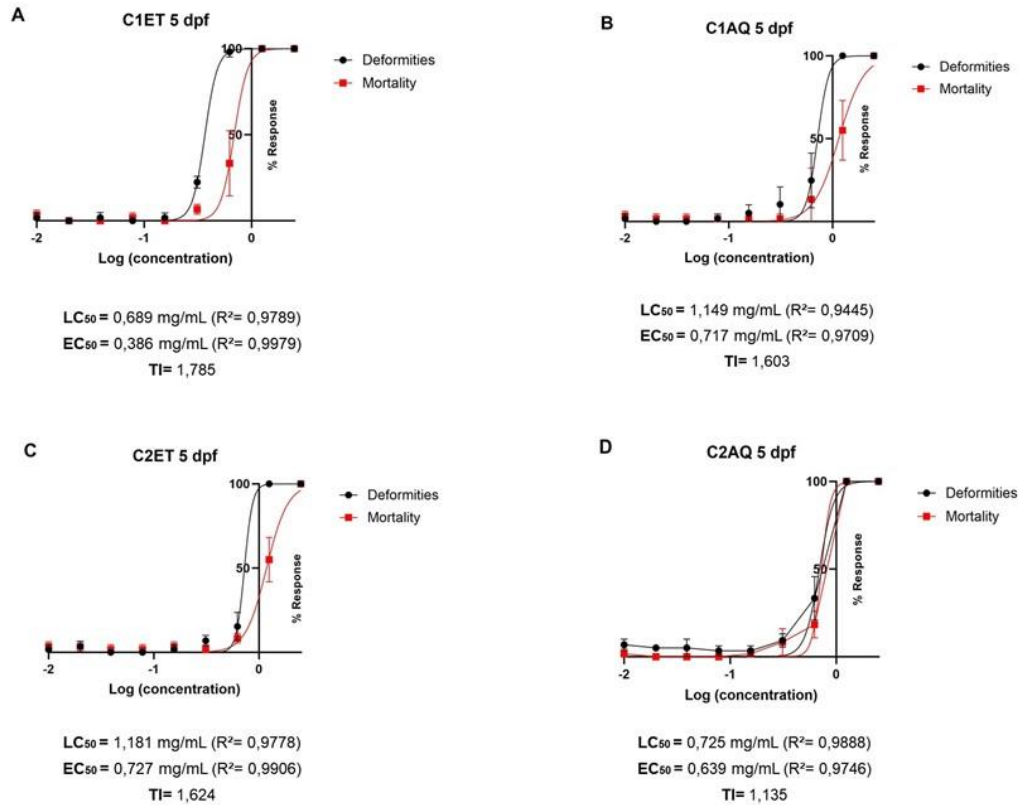
Figura 5 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD representativo do extrato aquoso (1) e hidroetanólico (2) de *S. oleraceus*.



Legenda: A: amostra; B: Coinjeção da amostra com o padrão de ácido chicórico; C: padrão de ácido chicórico. Os espectros no UV foram obtidos *on-line* pelo detector DAD para a amostra e o padrão de ácido chicórico a 320 nm.

Fonte: Da autora (2024).

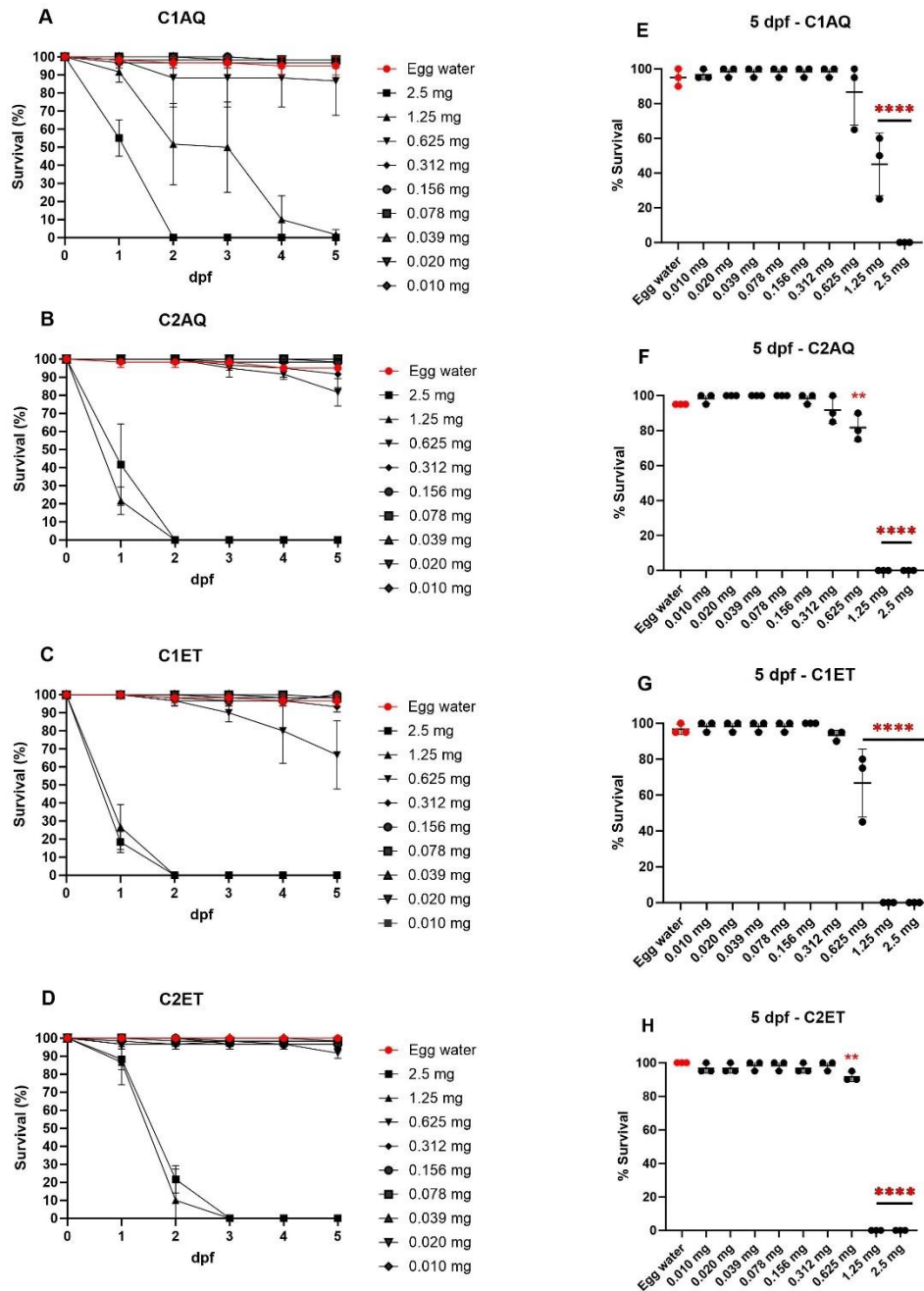
Figura 6 - Letalidade (LC50), deformidades (EC50) e índice teratogênico (TI) de embriões e larvas de zebrafish expostos em extratos de *S. oleraceus* em 5 dias pós fertilização.



Legenda: (A) C1ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa (B) C1AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa (C) C2ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva (D) C2AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva. LC₅₀ = concentração letal mínima capaz de causar 50% de letalidade (mg/mL); EC₅₀ = concentração mínima capaz de causar 50% de deformidades (mg/mL); e TI = índice teratogênico é razão entre LC₅₀/EC₅₀.

Fonte: Da autora (2024).

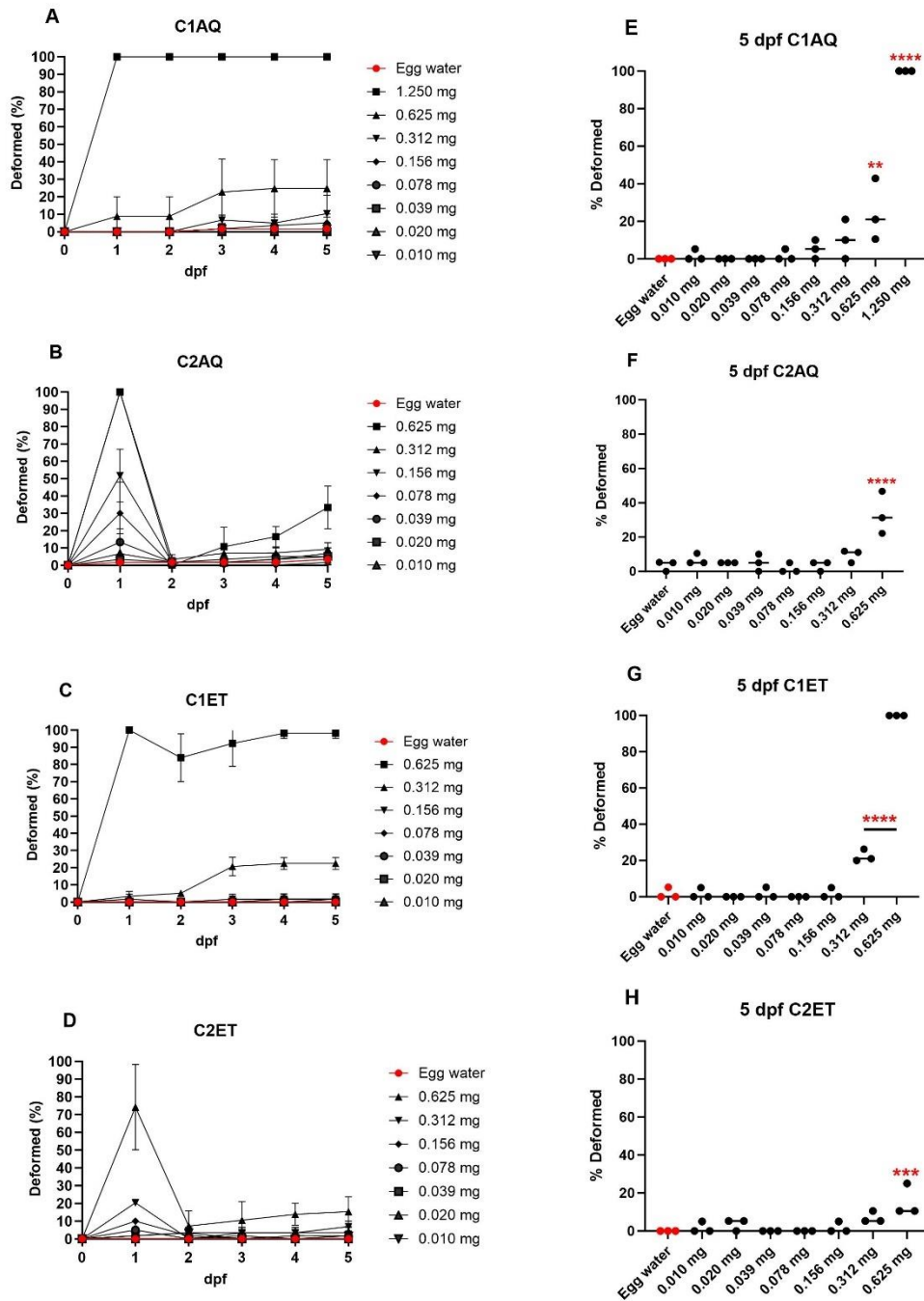
Figura 7 - Percentual de sobrevivência em embriões e larvas de zebrafish expostos a diferentes extratos de *S. oleraceus*, ao longo de 120 hpf.



Legenda: Taxa de sobrevivência (%) ao longo do tempo e de 5 dpf (dias pós-fertilização) em doses de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,020; 0,010 mg/mL e controle apenas meio de cultivo para embriões. (A) C1AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa; (B) C2AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva; (C) C1ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa; (D) C2ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva. **** p < 0,0001 e ** p > 0,001.

Fonte: Da autora (2024).

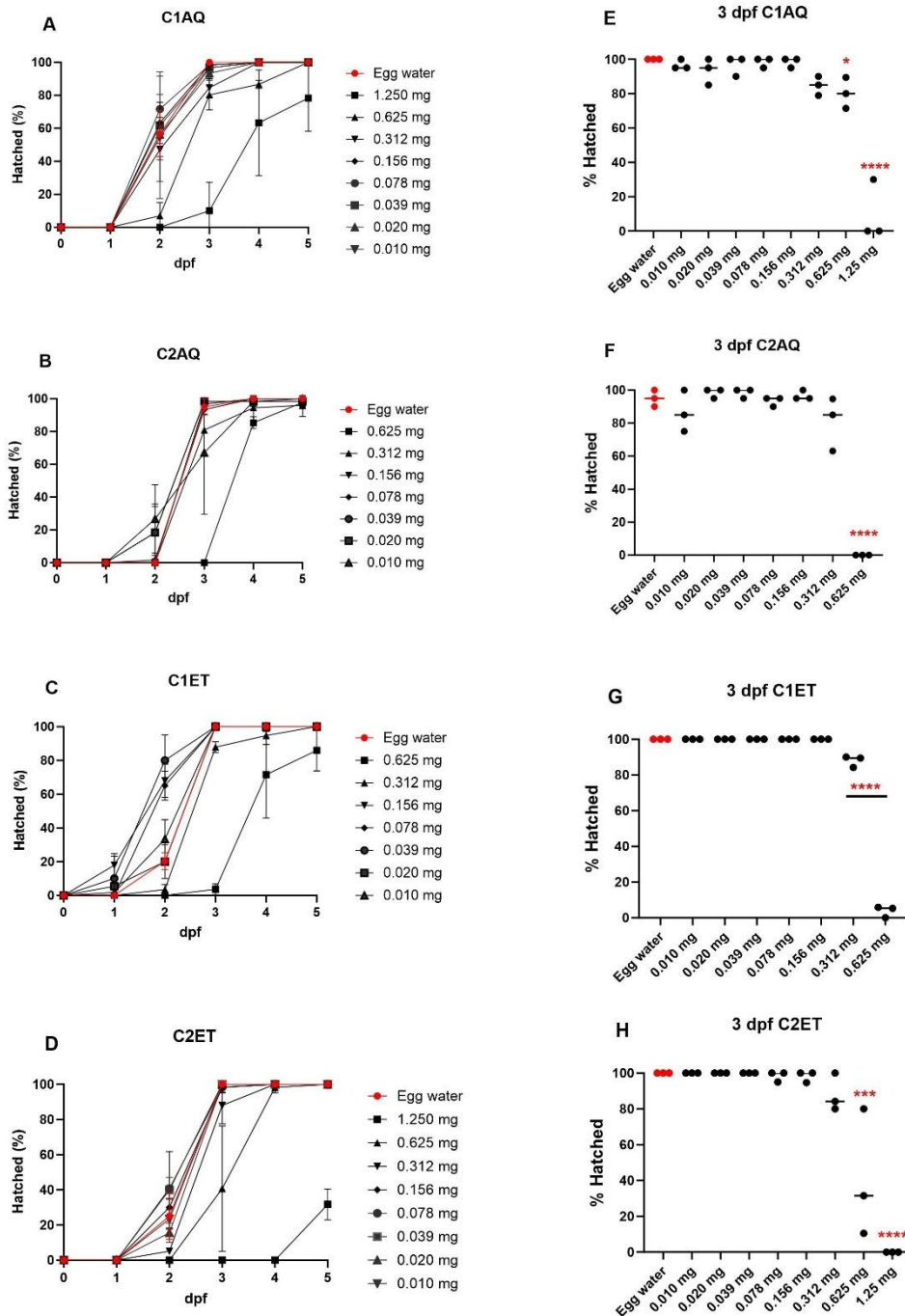
Figura 8 - Percentual de deformidades de embriões e larvas de zebrafish submetidas ao extrato de *S. oleraceus*, ao longo do tempo de 120 hpf.



Legenda: Percentual de deformidades ao longo do tempo e de 5 dpf (dias pós-fertilização) em doses de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,020; 0,010 mg/mL e controle apenas meio de cultivo para embriões. (A) C1AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa; (B) C2AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva; (C) C1ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa; (D) C2ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva **** p < 0,0001; *** p > 0,0001 e ** p > 0,001.

Fonte: Da autora (2024).

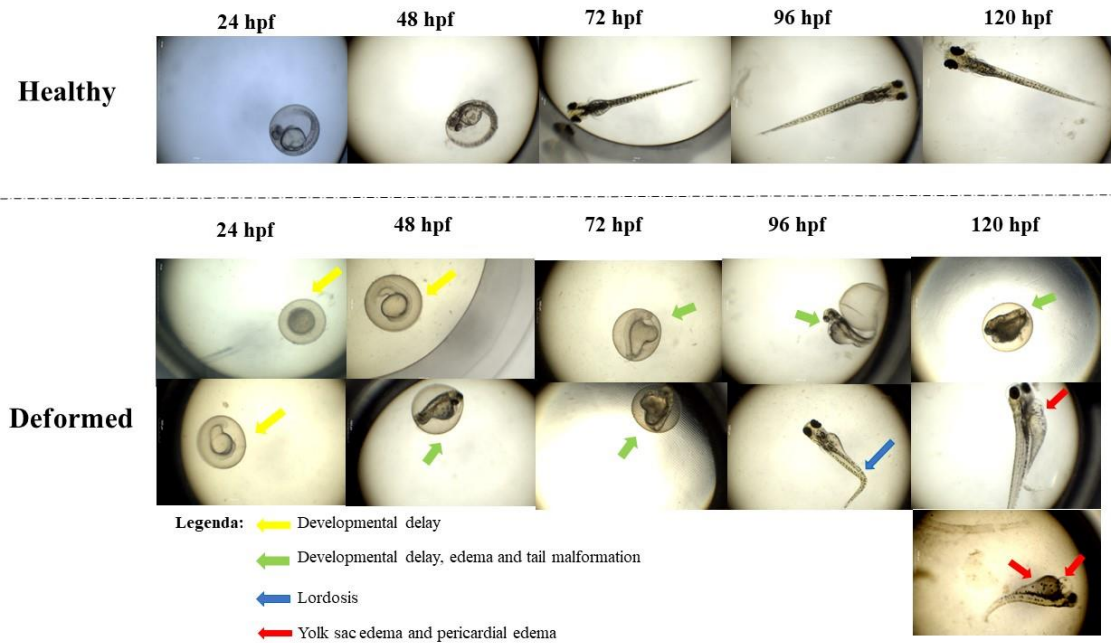
Figura 9 - Taxa de eclosão de embriões e larvas de zebrafish submetidas ao extrato de *S. oleraceus*, ao longo do tempo e 72 hpf.



Legenda: Taxa de eclosão ao longo do tempo e de 3 dpf (dias pós-fertilização) em doses de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,020; 0,010 mg/mL e controle apenas meio de cultivo para embriões. (A) C1AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa; (B) C2AQ – Extrato aquoso *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva; (C) C1ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa; (D) C2ET – Extrato etanólico *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva **** $p < 0,0001$; *** $p > 0,0001$ e * $p > 0,001$.

Fonte: Da autora (2024).

Figura 10 - Principais deformidades encontradas em extratos de *S. oleraceus* e desenvolvimento normal de embriões e larvas de zebrafish.



Fonte: Da autora (2024).

ANEXOS - TABELAS

Tabela 1 - Extratos de *Sonchus oleraceus* para ensaios embriotoxicológicos em Zebrafish.

Estádio Fenológico	Solvente	Sigla
Folha, fase vegetativa	Etanol 70%	C1ET
Folha, fase vegetativa	Aquoso	C1AQ
Folha, fase reprodutiva	Etanol 70%	C2ET
Folha, fase reprodutiva	Aquoso	C2AQ

Fonte: Da autora (2024).

Tabela 2 - Concentração de ácido chicórico dos extratos de *S. oleraceus*.

Extrato	Ácido chicórico \pmDP (mg g⁻¹ extrato)
C1AQ	31,00 \pm 0,22 a
C2AQ	42,00 \pm 0,18 b
C1ET	32,29 \pm 0,11 c
C2ET	46,76 \pm 0,26 d

Legenda: Aos dados apresentados se referem a média \pm desvio padrão ($n = 5$) e letras diferentes diferem entre si pelo teste de variância Scott-knott ($p < 0,05$).

Fonte: Da autora (2024).

ARTIGO 2 - INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL MELANOGÊNICO DOS EXTRATOS DE *Sonchus oleraceus* EM LARVAS DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico Scientific Reports
(Versão preliminar)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade melanogênica e antioxidante dos extratos das folhas secas de *S. oleraceus* obtidos por sistema de cultivo orgânico em diferentes estádios fenológicos da planta (vegetativo e reprodutivo) e a partir de diferentes tipos de solventes de extração (etanólico e aquoso) em larvas de zebrafish. Os extratos foram obtidos por meio de sistema de refluxo simples, evaporados a 40 °C e liofilizados. Os ensaios da atividade melanogênica foram realizados em larvas até 7 dpf. As doses utilizadas foram: 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; e 0,020 mg/mL. Nossos achados não demonstraram diferença significativa entre as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) para os extratos aquosos na primeira época de colheita (C1AQ), e hidroetanólico na primeira e segunda épocas de colheita (C1ET e C2ET) ($p > 0,05$), porém, esses extratos demonstraram aumento no número de pigmentos dose-dependentes ($p < 0,05$). Foi demonstrada uma redução significativa da glutathione-S-transferase (GST) no extrato C2ET para doses inferiores a 0,020 mg/mL, porém, para o extrato aquoso na segunda época de colheita (C2AQ) esse mesmo efeito foi encontrado em doses superiores ($p < 0,05$). Todos os extratos foram capazes de estimular a melanogênese por meio do aumento do número de fragmentos de pigmentação, área pigmentada e intensidade relativa, conforme a dose-resposta em todos os extratos. Portanto, os resultados deste estudo indicam que os extratos de *S. oleraceus* são capazes de estimular a melanogênese conforme o solvente de extração e estágio fenológico da planta, e os extratos promissores foram os aquosos (C1AQ e C2AQ).

Palavras-chave: melanina, vitiligo, enzimas, atividade antioxidante.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the melanogenic and antioxidant capacity of extracts from dried leaves of *S. oleraceus* obtained by organic cultivation system at different phenological stages of the plant (vegetative and reproductive) and from different types of extraction solvents (ethanolic and aqueous) in zebrafish larvae. The extracts were obtained by means of a simple

reflux system, evaporated at 40 °C and lyophilized. The melanogenic activity tests were performed in larvae up to 7 dpf. The doses used were: 0.312; 0.156; 0.078; 0.039; and 0.020 mg/mL. Our findings did not demonstrate significant differences between the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) for the aqueous extracts in the first harvest season (C1AQ), and hydroethanolic extracts in the first and second harvest seasons (C1ET and C2ET) ($p > 0.05$); however, these extracts demonstrated a dose-dependent increase in the number of pigments ($p < 0.05$). A significant reduction in glutathione-S-transferase (GST) was demonstrated in the C2ET extract for doses lower than 0.020 mg/mL; however, for the aqueous extract in the second harvest season (C2AQ), this same effect was found at higher doses ($p < 0.05$). All extracts were able to stimulate melanogenesis by increasing the number of pigment fragments, pigmented area and relative intensity, according to the dose-response in all extracts. Therefore, the results of this study indicate that *S. oleraceus* extracts are capable of stimulating melanogenesis depending on the extraction solvent and phenological stage of the plant, and the promising extracts were the aqueous ones (C1AQ and C2AQ).

Keywords: melanin, vitiligo, enzymes, antioxidant activity

Introdução

O vitiligo é um distúrbio assintomático, que resulta na formação de manchas despigmentadas na pele e mucosas¹. Trata-se de uma doença que leva à perda de melanócitos que pode ser de origem genética, neuronal, autoimune e/ou relacionada ao estresse oxidativo². Essa patologia possui maior incidência entre os jovens e progride por toda a vida, o que pode resultar no acometimento de outras doenças, além da diminuição da qualidade de vida³.

O tratamento consiste na interrupção da progressão da doença ou repigmentação da pele. Sua patogênese envolve destruição citotóxica mediada por células T, ativação do IFN- γ , dano oxidativo pela redução de E-caderina, além de diminuição significativa de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase⁴. Além disso, foi demonstrada uma associação com aumento exacerbado de superóxido dismutase com a inibição da síntese de melanina⁵.

Alguns fármacos repigmentantes são utilizados, como tacrolimo (pomada) e propionato de clobetasol⁶. Foi demonstrado recentemente um alto custo social em nível global acerca do tratamento dessa patologia⁷. Atualmente, prever o curso da doença tem sido um desafio para os profissionais devido à dificuldade de se estabelecer biomarcadores, sendo assim, os tratamentos apenas fornecem uma resolução temporária e/ou limitante.

Logo, a pesquisa em busca de novos fármacos de origem natural revela alvos promissores para auxiliar na estabilização ou repigmentação da pele, e que seja acessível, eficaz e de baixo custo. Neste ponto de vista, a *Sonchus oleraceus* é uma planta alimentícia não convencional que possui em sua composição diversas substâncias que atuam como antioxidante e atividade anti-inflamatória^{8,9}, tais como ácidos fenólicos, flavonoides e macronutrientes como ômega-3^{8,10}. Dentre vários compostos bioativos, os mais comumente encontrados na planta são: ácido chicórico, ácido clorogênico e ácido cafeico^{11,12}; e recentemente ainda não relatados: ácido azelaico, ácido mesacônico, entre outros¹³, e alguns flavonoides como quercetina e rutina¹³.

Inúmeros benefícios à saúde pelo consumo regular de *S. oleraceus* na alimentação são atribuídos, logo, cada vez mais tem sido alvo de pesquisadores no auxílio da prevenção/tratamento de diversas patologias¹⁴. Um estudo brasileiro utilizando a infusão de folhas de *S. oleraceus* durante um período médio de 9 meses demonstrou uma repigmentação da pele, além de uma melhora social e mental dos portadores de vitiligo¹⁵. Porém, estudos acerca dos possíveis mecanismos de ação ainda são totalmente divergentes. Diante desse cenário, o modelo zebrafish cresce exponencialmente em pesquisas, principalmente no que tange aos processos metabólicos de pigmentação humana^{16,17}.

Recentemente, Lima *et al.*¹⁸ pertencentes ao nosso grupo de pesquisa encontraram resultados promissores que sugerem o efeito da *S. oleraceus* no aumento de melanina em zebrafish (*Danio rerio*). E diante dos resultados prévios, torna-se relevante confirmar os possíveis efeitos da *S. oleraceus* no aumento da pigmentação da pele, através do possível envolvimento do sistema das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) envolvidos nessa patogênese¹⁹.

Assim, objetivou-se avaliar a capacidade melanogênica e a resposta enzimática em larvas de zebrafish de folhas de *S. oleraceus* cultivada em sistema orgânico coletadas nos estádios fenológicos vegetativo e reprodutivo em diferentes tipos de solventes de extração (etanólico e aquoso).

Material e métodos

Apreciação ética

Os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com o Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado sob protocolo nº 014/2019 no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras, UFPA, localizada em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Obtenção das amostras vegetais

No pós-colheita, as folhas de *S. oleraceus* oriundas do cultivo agroecológico foram colhidas no período da manhã (6-8h). As folhas foram desidratadas em estufa de circulação de ar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ até peso constante. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas empregando-se peneira de 0,3 mm. O pó das folhas foi armazenado em frasco de vidro protegido da luz e conservado em ultrafreezer a -80 °C até a preparação dos extratos.

Preparo dos extratos

O método extrativo foi adaptado da metodologia descrita por Aissani *et al.*²⁰. Desse modo, extratos aquosos e hidroetanólicos a 70% (5% m/v) foram preparados por refluxo de 20 minutos a partir da fervura. Em seguida, os extratos foram filtrados a vácuo em funil de Büchner, concentrados em rotavapor a 40 °C sob pressão reduzida, e mantidos em dessecador a vácuo até secura. Posteriormente, foram liofilizados seguindo a metodologia de Smach *et al.*²¹, mantidos em frascos sob proteção da luz e armazenados em *freezer* a -20 °C , até das análises em zebrafish. Ao final foram produzidos 4 extratos, sendo eles: C1AQ - Extrato aquoso da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa; C2AQ - Extrato aquoso da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva; C1ET - Extrato etanólico (70%) da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa; e C2ET - Extrato etanólico (70%) da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva.

Manejo das matrizes de reprodutores zebrafish (*Danio rerio*)

Os procedimentos experimentais foram conduzidos na Ala de Peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Adultos de zebrafish (*Danio rerio*), linhagem WT (selvagem), com aproximadamente 7 meses, foram adquiridos no Biotério Central da UFLA. Os animais foram mantidos em *rack* de recirculação de água (Hidrus, modelo ZEB-40), a 27 °C ($\pm 1\text{ °C}$), pH 7,4 ($\pm 0,1$) e 0,8 ($\pm 0,3$) mOsm (controle automatizado), ciclo claro/escuro 14:10, alimentados quatro vezes ao dia, com ração comercial Alcon basic®, SC, BRA (2x) e náuplios de artêmia salina (2x), escalados da seguinte forma: às 09h00 ração comercial, 12h00 náuplios de artêmia, 14h00 ração comercial e 17h00 náuplios de artêmia. Em todos os momentos eles foram alimentados até saciedade aparente²². Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados diariamente e corrigidos quando necessário, conforme preconizado para a espécie, e foram mantidos até no máximo 12 peixes por aquário de 3 litros²³.

Protocolo de reprodução e obtenção dos embriões

Fêmeas e machos foram mantidos juntos em aquários com capacidade máxima de 3 litros. Para estimular a desova, machos e fêmeas foram separados na noite anterior por grades específicas. Para a reprodução aplicou-se a proporção de 1 macho para cada fêmea²⁴, e uma hora antes do término do ciclo escuro foram mantidos em criadeira (ZebClean, Alesco, SP, BR) de fundo gradeado, a fim de evitar canibalismo dos embriões²⁵.

Os embriões foram coletados cuidadosamente com auxílio de pipeta de Pasteur e transferidos para placas de Petri em até 60 minutos pós-fertilização. Em seguida lavados três vezes em meio *egg water* contendo azul de metileno 0,2%, a fim de diminuir qualquer risco de contaminação proveniente do processo de reprodução²⁶. O meio *egg water* para embriões utilizado foi o proposto por Di Chiacchio *et al.*²⁷ e consistiu em preparar uma solução estoque composta por 0,1875 g de carbonato de cálcio, 1,875 g de bicarbonato de sódio, 3 g de sal marinho e 1 L de água destilada. Posteriormente, o meio foi diluído em água destilada sendo 20% do volume da solução estoque. Por fim, os embriões foram distribuídos aleatoriamente em placas de Petri (n = 80) contendo o meio para embriões sem azul de metileno a fim de evitar o mínimo de interferência e mantidas em estufa a 28 °C por 6 horas até atingir epibolia (6 hpf).

Preparo do meio para embriões contendo os extratos

Os extratos foram pesados em balança de precisão, diluídos em *egg water* e mantidos em banho ultrassônico por 10 minutos sobre o abrigo da luz. Em seguida foram centrifugados a 4.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, utilizando-se apenas o sobrenadante²⁸ adaptado. Posteriormente foram mantidos em estufa a 28 °C. As concentrações foram baseadas em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (ensaios de toxicidade) e que apresentaram menores efeitos tóxicos em modelo zebrafish (dados não publicados – artigo 1), sendo elas: 0,312 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,078 mg/mL, 0,039 mg/mL e 0,020 mg/mL; o controle positivo foi exposto apenas em meio para embriões e o controle negativo foi exposto apenas em PTU.

Ensaio da atividade melanogênica em embriões e larvas de zebrafish

Para avaliação da atividade melanogênica dos extratos (Figura 1), inicialmente foi preparada uma solução estoque A contendo 0,3% de 1-fenil-2-tioureia (PTU; Sigma -Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) em *egg water*. Posteriormente, foi preparado 1 litro de *egg water* contendo 5% da solução A para bloqueio do processo de melanogênese. Os embriões foram expostos ao meio contendo solução A em 6 hpf (epibolia) e mantidos em estufa a 28 °C em

ciclo claro/escuro 12 h/12 h até 24 hpf. Em seguida, a solução foi renovada e mantida até 48 hpf (totalizando 2 dias em exposição ao PTU).

Após esse período, os embriões foram lavados em *egg water* por 5 vezes e em seguida transferidos para placas contendo os extratos em diferentes concentrações (0,312, 0,156, 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL). Esse meio foi renovado diariamente até os embriões atingirem 168 hpf (5 dias de exposição ao extrato). Foram utilizados 80 embriões por dose de cada extrato em triplicata. Desses, os embriões e larvas que apresentaram deformidades foram eutanasiados, 40 larvas foram utilizadas para as análises enzimáticas e 20 larvas foram direcionadas para solução de formalina 10% para análises de imagem por inteligência artificial, conforme Figura 2. Ao final do experimento todas as larvas foram eutanasiadas em triclaína 0,25 g por litro²⁹.

Análises das atividades enzimáticas

Preparação do homogenato

Para avaliação das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e Glutathiona-S-transferase (GST), foi preparado o homogenato. Aos 168 hpf (7 dpf) as larvas (n = 40) foram coletadas por grupo de cada extrato, transferidas para Eppendorf de 2 mL e em seguida eutanasiadas em gelo. Foram adicionados 400 µL de solução salina tamponada com fosfato pH = 7,0 (PBS) gelada e homogeneizada com homogeneizador SLLB 027 de tecidos portátil, com rotor de 3mm de diâmetro (Scienlabor®, SP, Brasil), em velocidade de 12.000 rpm em gelo. Posteriormente, os homogenatos foram centrifugados por 20 minutos a 4 °C em 4400 XG³⁰ adaptado e, por fim, retirou-se o sobrenadante e as amostras foram armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento das análises.

Análise de proteínas totais

A avaliação de proteínas totais das amostras foi determinada através de ensaio colorimétrico a 595 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan® FC 357 Microplate Photometer), conforme o método proposto por Bradford³¹.

Catalase

A atividade da catalase foi determinada conforme proposto por Aebi³². Foram utilizados 30 µL do sobrenadante do homogenato em 300 µL do reagente (H₂O₂-30%; 10 mL de KPBS) em microplacas em triplicata. A reação de oxirredução foi registrada a 240 nm em temperatura de 20 °C a cada 15 segundos durante 2 minutos em leitor de microplacas (Thermo Scientific

Multiskan® FC 357 Microplate Photometer). Os resultados foram obtidos em μmol de peróxido de hidrogênio degradado (ΔE)/min/mg de proteína para avaliar o nível de atividade da CAT.

Superóxido dismutase

Para determinação da atividade da superóxido dismutase, baseou-se na metodologia proposta por Dieterich³³. O princípio do método consiste na capacidade da enzima em reduzir a autooxidação do pirogalol. Inicialmente acrescentaram-se 40 μL do homogenato das amostras, 132 μL de tampão fosfato (pH 7,0), 8 μL de MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo] (preparo em 1,25 mM.L⁻¹), 20 μL de solução contendo pirogalol (preparo em 0,1 mM.L⁻¹), e posteriormente a placa foi mantida em incubação a 37 °C por 5 minutos. E, por fim, foram acrescentado 150 μL dimetilsulfóxido - DMSO (100 mM.L⁻¹) para paralisar a reação. Realizou-se a leitura em 570 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan® FC 357 Microplate Photometer), e os resultados foram expressos em unidades por mg de proteína nmol/mgproteína⁻¹. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Glutathione Peroxidase

Para determinar a atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx) foi utilizado o método descrito por Sachett *et al.*³⁴. Basicamente, a reação é medida de forma indireta, ocorrendo a catalisação da GPx através da formação da glutathione oxidada que, por sua vez, é reduzida a GSH através da oxidação do NADPH em NADP. Foi preparado o meio reacional sendo: 10 mL de tampão GPx, 2,5 mL de GSH (10 mM), 2,5 mL de NADPH (1,6 mM), 2,5 mL de NaN₃ (10 mM) e 1 μL de glutathione reduzida. Foram acrescentados na microplaca 40 μL do homogenato e 200 μL do meio reacional. A cinética enzimática foi analisada em 340 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan® FC 357 Microplate Photometer), realizando uma leitura a cada 20 segundos durante 3 minutos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Glutathione-S-transferase

A atividade enzimática da glutathione-S-transferase foi realizada conforme descrito por Habig *et al.*³⁵. A atividade da enzima foi estimada através do preparo do meio reacional sendo: 380 μL de solução CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno; 0,1 mM em etanol), 2,3 mL de solução de glutathione reduzida (30,7 mg/mL em PBS pH = 7,0) e 12,32 mL de tampão de fosfato (PBS, pH = 7,0). Acrescentou-se 25 μL do homogenato a 125 μL do meio reacional. A leitura foi realizada em 340 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan® FC 357

Microplate Photometer), sendo uma leitura a cada 10 segundos durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Todas as análises do homogenato foram realizadas em triplicata.

Obtenção das imagens

As imagens foram obtidas através de microscópio óptico (Olen Kasvi®) com câmera de vídeo acoplada Moticam X5 Plus®. Inicialmente, foi realizada a calibragem do equipamento e, posteriormente, as larvas foram posicionadas com ênfase na região dorsal em lâmina de microscópio em lente objetiva de 4x, com iluminação intensa para obtenção das imagens. No total foram obtidas 1320 imagens, sendo 20 larvas por tratamento em triplicata ($n = 60$), conforme Fig. 2.

Análises das imagens por inteligência artificial

As imagens foram analisadas conforme esquema apresentado na Fig. 3. Inicialmente, dividiu-se a imagem nos canais *red*, *green* e *blue* (RGB). O canal azul foi selecionado para o cálculo da área do dorso, já que era o que apresentava as bordas mais bem definidas do zebrafish. Para esse cálculo, a imagem foi binarizada, fazendo com que todo o corpo do peixe ficasse branco, permitindo assim isolar essa área de todo o resto da imagem. Um filtro mediano foi aplicado para eliminar a região da cauda, restando apenas uma área aproximada do dorso. Os *pixels* foram então calculados e, em seguida, o resultado foi transformado para área, na unidade μm^2 .

A imagem do canal vermelho foi selecionada para contagem das pintas, já que era a com maior diferença visual de cor entre o corpo do zebrafish e as pintas. Nessa imagem foi utilizada a técnica de melhor contraste local (CLAHE) para ressaltar as diferenças de intensidade. Após esta etapa, a imagem foi passada para escala cinza e foi aplicado um filtro/mediana, seguido por uma etapa de dilatação, sendo que entre essas fases a imagem foi invertida, atribuindo 255 aos *pixels* que antes eram 0 e o inverso para os *pixels* com a cor preta. Os filtros foram aplicados para eliminar pequenos pontos que não eram de interesse na análise, mas ao mesmo tempo não descaracterizar as pintas.

Foi realizada uma operação de subtração entre a imagem com as pintas e a imagem com o dorso aproximado para excluir todas aquelas pintas que não estavam na região dorsal. Alguns resultados desta etapa também continham os olhos das larvas, assim como outros objetos indesejados, o que exigiu uma nova etapa, nesses casos específicos, para eliminar tudo aquilo

que não era considerado relevante para a análise. A imagem então foi invertida e o número de pintas foi contabilizado, conforme disposto na Fig. 3.

A imagem do canal verde foi então utilizada para calcular a intensidade dos *pixels* das pintas na escala cinza. Para isto, foi realizada uma operação lógica “AND” juntamente com a imagem resultante da última etapa para deixar apenas as pintas da região dorsal, com suas respectivas intensidades na escala cinza. A imagem resultante da etapa anterior foi binarizada para a medição da área das pintas, que foi calculada em μm^2 . Um fluxograma do método foi descrito na Fig. 4.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 9. Inicialmente, foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste de variância *two-way* ANOVA com post-hoc *Student Newman-Keulls*, sendo o nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados

Análises enzimáticas

Nossos achados demonstraram que o aumento ou diminuição da atividade enzimática foram relacionados principalmente ao solvente de extração e época de colheita, assim como em relação às doses entre os extratos. Não foram encontradas diferenças nas atividades enzimáticas da SOD, CAT, GPx e GST para os extratos C1ET e C1AQ ($p > 0,05$), conforme Fig. 5 A-D e Fig. 6 A-D, respectivamente. Nosso estudo demonstrou uma diminuição significativa da enzima GST para o extrato C2ET (Fig. 7D) nas menores doses, sendo elas: 0,020 mg, 0,039 mg e 0,078 mg ($p \leq 0,05$), porém, não foram encontradas diferenças estatísticas para as enzimas SOD, CAT e GPx ($p > 0,05$) nesse mesmo extrato (Fig. 7A-C).

Já em relação ao extrato C2AQ, foram observadas diminuições significativas da atividade da SOD entre as doses 0,312 mg – 0,039 mg quando comparada com o controle PTU ($p \leq 0,001$). Para a dose de 0,020 foi observada uma diminuição ($p \leq 0,01$) quando comparada ao controle PTU (Fig. 8A), porém, não diferiu em relação ao controle *Egg water*. Além disso, foi observada a diminuição da atividade da CAT ($p \leq 0,05$) quando comparada ao controle PTU e *Egg water* (Fig. 8B). Observou-se o aumento da atividade da GPx quando comparada ao controle PTU ($p \leq 0,05$), entretanto, a atividade não atingiu níveis considerados saudáveis quando comparada ao controle *Egg watter* ($p \leq 0,01$) (Fig. 8C). Houve uma redução significativa da atividade da GST entre as doses de 0,156 mg – 0,039 mg quando comparadas

ao PTU e semelhantes quando comparadas ao controle *Egg water* ($p \leq 0,05$), porém, um maior efeito na diminuição pode ser observado na dose 0,312 mg ($p \leq 0,01$) (Fig. 8D).

Avaliação da atividade melanogênica por meio da análise de imagens

Nossas descobertas mostraram que o tipo de solvente, a época de colheita e a dose influenciaram na repigmentação das larvas de zebrafish (Fig. 9C). Para o extrato C1ET foi encontrado um aumento no número de pigmentos melanina para dose de 0,156 mg semelhante ao encontrado no controle *Egg water*, diferindo-se em relação ao PTU ($p \leq 0,01$) (Fig. 9A). Foi encontrado um aumento em relação à área pigmentada em doses superiores a 0,156 mg quando comparada ao controle PTU ($p \leq 0,001$) (Fig. 9B). Não foram encontradas diferenças em relação à intensidade para os grupos tratados em relação ao controle PTU, entretanto, o controle *Egg water* foi diferente de todos os demais tratamentos ($p \leq 0,05$).

Em relação ao extrato C1AQ, foi verificado um aumento altamente significativo no número de pigmentos melanina para as doses 0,039, 0,078 e 0,312 mg ($p \leq 0,0001$); e para as doses 0,020 mg e 0,156 mg houve um aumento no número de pigmentos quando comparado ao PTU, e comportou-se de maneira semelhante ao controle *Egg water* ($p \leq 0,01$) (Fig. 10A). Em relação à área pigmentada a dose de 0,312 mg apresentou um aumento em relação ao controle PTU, e comportamento semelhante ao controle *Egg water* ($p \leq 0,001$) (Fig. 10B). Por fim, a intensidade relativa em *pixels* apresentou aumento para dose de 0,039 mg quando comparada ao controle PTU e controle *Egg water* ($p \leq 0,01$) (Fig. 10C).

Para o extrato C2ET, foi encontrado um aumento no número de pigmentos melanina para a dose 0,020 mg, apresentando-se semelhante ao controle *Egg water* ($p \leq 0,01$) (Fig. 11A), assim como um aumento da intensidade relativa em *pixels* ($p \leq 0,001$) (Fig. 11C). Não foi encontrada diferença nos grupos tratados em relação ao PTU, porém, a área pigmentada do controle *Egg water* foi relativamente maior ($p \leq 0,001$) (Fig. 11B).

Por fim, o extrato C2AQ demonstrou em todas as doses um aumento significativo em relação ao número de pigmentos quando comparado ao controle PTU ($p \leq 0,001$) (Fig. 12A). Em relação à área pigmentada, a dose de 0,020 mg mostrou-se inferior às demais doses ($p \leq 0,001$), sendo o controle *Egg water* com a maior área pigmentada ($p \leq 0,0001$) (Fig. 12B). E a intensidade relativa em *pixels* foi maior na dose de 0,156 mg quando comparada ao controle PTU ($p \leq 0,0001$); e a dose de 0,020 mg comportou-se de forma semelhante ao controle *Egg water* ($p \leq 0,01$) (Fig. 12C).

Discussão

Nossos resultados demonstraram que os efeitos na repigmentação da pele avaliados por meio do aumento do número de pigmentos de melanina e da área de pigmentada de todos os extratos foram dose-dependentes (Fig. 2C). Claramente, os extratos aquosos se destacaram nesse processo em detrimento dos extratos etanólicos. O estágio fenológico da planta mais promissor no que tange a todos os parâmetros avaliados foi da planta em fase reprodutiva (C2AQ).

As diferenças estatísticas encontradas entre as doses de um mesmo tratamento se devem à grande variabilidade genética entre as larvas, o que torna nossos resultados ainda mais promissores. É sabido que três enzimas (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) do sistema antioxidante estão sendo amplamente estudadas no que tangem aos processos de repigmentação da pele associada ao vitiligo¹⁹. Semelhantemente, encontramos uma correlação positiva para o extrato C2AQ através da diminuição da SOD.

Os estudos têm demonstrado que o aumento da superóxido dismutase está intimamente relacionado à inibição da síntese de melanina⁵. A diminuição da atividade dessa enzima torna-se relevante, uma vez que pesquisadores demonstraram o papel da modulação na expressão de genes da SOD. Entre várias, uma bem fundamentada é a correlação entre o NF-Kappa B e expressão desses genes, basicamente, NF-κB e outros fatores de transcrição importantes, como p53, interagem exercendo um efeito positivo ou negativo na expressão do gene *sod2*³⁶. Logo, essa relação pode explicar alterações da atividade dessa enzima conforme a progressão da doença.

Basicamente, o estresse oxidativo ocorre quando espécies reativas de oxigênio são aumentadas e superam a defesa antioxidante celular³⁷. Logo, a SOD é o mais poderoso eliminador de $O_2^{\cdot-}$, que catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 ³⁸. Um estudo relatou níveis aumentados de SOD em pacientes com vitiligo ativo em comparação com indivíduos com a doença estável e saudável, todos apresentaram níveis normais de GPx³⁹. Isso também foi relatado por outros autores⁴⁰.

A redução da SOD encontrada pelo extrato C2AQ pode ter uma relação indireta com o aumento no número de pintas e área repigmentada, assim como a permanência em estabilidade da GPx. Alguns estudos revelaram divergências entre o nível de GPx: um estudo revelou um aumento significativo de GPx em portadores de vitiligo⁴¹ e, contrariamente, pesquisadores relataram diminuições significativas⁴². Uma metanálise demonstrou que pacientes com vitiligo apresentavam níveis equivalentes ao controle saudável de GPx⁴³.

Em pacientes com vitiligo, níveis mais baixos da catalase são demonstrados devido ao aumento do estresse oxidativo na pele⁴⁰. Nossos achados não demonstraram aumento na

atividade da catalase. Apesar desse potencial, atualmente alguns produtos contendo pseudocatalase estão disponíveis no mercado para tratar o vitiligo, porém, ainda não se mostraram eficazes devido à limitada atividade quando comparada à enzima naturalmente encontrada em pele humana¹⁹.

É fato que foi demonstrado o aumento no número de pintas nos extratos C1AQ, C1ET e C2ET, no entanto, não foi demonstrada uma correlação com as atividades enzimáticas. Isso pode ser explicado devido à possibilidade de estímulo de outros mecanismos de ação e deve-se ao fato de que as manifestações clínicas do vitiligo incluem alterações nos níveis de tirosinase (TYR), monoamina oxidase (MAO), acetilcolinesterase (AChE) e malondialdeído (MDA) no soro e nos tecidos da pele⁴⁴. Considerando o importante papel dos fatores imunológicos no vitiligo, há evidências crescentes de uma associação entre estresse oxidativo e autoimunidade⁴⁵. Sendo assim, a quimiotaxia mediada por EROs tem um papel no desenvolvimento do vitiligo, permitindo que células imunes inatas e adaptativas, especialmente linfócitos T específicos de melanócitos, sejam ativas, principalmente quando induzidas pelo interferon-gama- $\text{INF-}\gamma$ ⁴⁶.

Basicamente, o aumento da GST pode representar uma resposta à formação excessiva de radicais livres no vitiligo e pode apoiar o papel do estresse oxidativo na patogênese do vitiligo⁴⁷. Entretanto, em nossos achados foram demonstradas reduções significativas nos extratos C2ET e C2AQ. É importante destacar que a GST desempenha diversas funções associadas ao processo de desintoxicação, transdução de sinal, metabolismo de tirosina e regulação da apoptose⁴⁸. Logo, os estudos acerca do envolvimento da GST na patogênese do vitiligo devem ser estimulados.

Demonstramos uma nova atividade biológica do ácido chicórico como agente repigmentante através do aumento do número de pigmentos melanina e intensidade relativa em zebrafish. Vale ressaltar que essa substância é bem elucidada na literatura em relação aos efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e imunoestimulantes⁴⁹, e que o modelo zebrafish tem sido amplamente explorado para análises de agentes despigmentantes provenientes de plantas medicinais^{50,51,52}, porém, estudos que avaliam a repigmentação em larvas de zebrafish através de processamento de imagens ainda são totalmente escassos.

Conclusão

Colaborativamente, os resultados deste estudo indicam que os extratos auxiliam no processo de repigmentação dose-dependente e que as atividades enzimáticas podem ser influenciadas pelo estágio fenológico da planta, bem como pelo solvente de extração. Doses superiores a 0,156 mg apresentaram maior tendência à repigmentação com aumento do número

de pigmentos, área pigmentada e intensidade em *pixels* para ambos os extratos aquosos. Doses inferiores a 0,039 mg dos extratos etanólicos melhoram os parâmetros de repigmentação. O estágio fenológico da planta mais promissor no que tange a todos os parâmetros avaliados foi da planta em fase reprodutiva C2AQ. Nossos achados anteriores sugerem o extrato C1AQ como mais seguro para o uso terapêutico, e esse último também estimulou a melanogênese.

Agradecimentos

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro e bolsas de estudo e de produtividade.

Referências

1. Daniel, B. S. & Wittal, R. Vitiligo treatment update. *Australas. J. Dermatol.* **56**, 85-92. <https://doi.org/10.1111/ajd.12256> (2015).
2. Speeckaert, R. & Van Geel, N. Vitiligo: An update on pathophysiology and treatment options. *Am. J. Clin. Dermatol.* **18**, 733-744. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0298-5> (2017).
3. Rodrigues, M., Ezzedine, K., Hamzavi, I., Pandya, A. G. & Harris, J. E. New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. *J. Am. Acad. Dermatol.* **77**, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.10.048> (2017).
4. Bishnoi A. & Parsad D. Clinical and molecular aspects of vitiligo treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **19**. <https://doi.org/10.3390/ijms19051509> (2018).
5. Kim, H. Y., Sah, S. K., Choi, S. S. & Kim, T. Y. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. *Life Sci.* **210**, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.056> (2018).
6. Iannella, G. *et al.* Vitiligo: Pathogenesis, clinical variants and treatment approaches. *Autoimmun. Rev.* **15**, 335-343. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.12.006> (2016).
7. Naldi, L., Pagani, A. & Alduini, C. Vitiligo: Epidemiology and economic impact. *Dermatol. Pract. Concept.* **13**, e2023315S-e2023315S. <https://doi.org/10.5826/DPC.1304S2A315S> (2023).
8. Chen, C. -Y. *et al.* Lipid extract from a vegetable (*Sonchus oleraceus*) attenuates adipogenesis and high fat diet-induced obesity associated with AMPK activation. *Front. Nutr.* **8**. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.624283> (2021).
9. Chen, L. *et al.* Anti-inflammatory effect of self-emulsifying delivery system containing *Sonchus oleraceus* Linn extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem.*

- Toxicol.* **135**. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110953> (2020).
10. Saxena, A. & Kumar, J. Phytochemical screening, metal-binding studies and applications of floral extract of *sonchus oleraceus* as a corrosion inhibitor. *J. Bio- Tribo- Corrosion* **6**, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s40735-020-00349-8> (2020).
 11. Chen, L., Teng, H. & Cao, H. Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **127**, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.038> (2019).
 12. Sergio, L. *et al.* Bioactive phenolics and antioxidant capacity of some wild edible greens as affected by different cooking treatments. *Foods* **9**. <https://doi.org/10.3390/foods9091320> (2020).
 13. Nouidha, S. *et al.* Metabolomics profiling of Tunisian *Sonchus oleraceus* L. extracts and their antioxidant activities. *Chem. Biodivers.* **20**. <https://doi.org/10.1002/CBDV.202300290> (2023).
 14. Vecchia, C. A. D. *et al.* *Sonchus oleraceus* L. Promotes gastroprotection in rodents via antioxidant, anti-inflammatory, and antisecretory activities. Evidence-based complement. *Altern. Med.* **2022**. <https://doi.org/10.1155/2022/7413231> (2022).
 15. Eibel, G. S. B., Zilly, A., Silva, R. M. M. da & Ferreira, H. Use of the infusion of *Sonchus oleraceus* leaves for the treatment of vitiligo. *Res. Soc. Dev.* **10**, e1410413824–e1410413824. <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I4.13824> (2021).
 16. Bin, B. H. *et al.* Membrane-associated transporter protein (MATP) regulates melanosomal pH and influences tyrosinase activity. *PLoS One* **10**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129273> (2015).
 17. Lee, Y. R. *et al.* Skin depigmenting action of silkworm (*Bombyx mori* L.) droppings in zebrafish. *Arch. Dermatol. Res.* **310**, 245–253. <https://doi.org/10.1007/s00403-018-1804-1> (2018).
 18. Lima, K. K. C. Análise genética, composição fenólica e das capacidades antioxidantes in vitro, e embriotóxicas e melanogênica em zebrafish de extratos de *Sonchus oleraceus*. 2020. 120 p. Tese (Doutorado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.
 19. Nascimento, N. S. *et al.* Enzymes for dermatological use. *Exp. Dermatol.* **33**. <https://doi.org/10.1111/EXD.15008> (2024).
 20. Aissani, F. *et al.* Algerian *Sonchus oleraceus* L.: a comparison of different extraction solvent on phytochemical composition, antioxidant properties and anti-cholinesterase

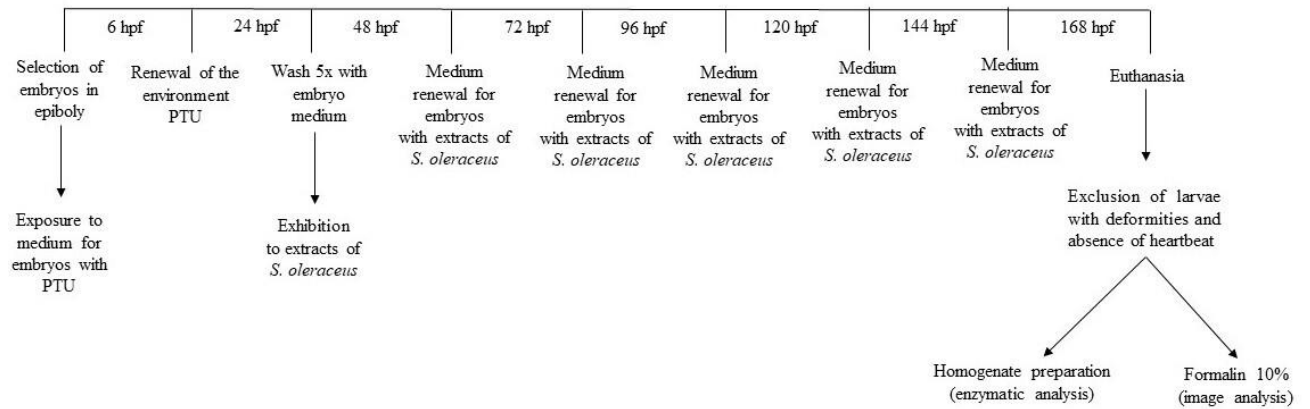
- activity. *Adv. Tradit. Med.* **22**, 383-394. <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00553-y> (2021).
21. Smach, M. A., Hafsa, J., Charfeddine, B., Dridi, H. & Limem, K. Effects of sage extract on memory performance in mice and acetylcholinesterase activity. *Ann. Pharm. Fr.* **73**, 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2015.03.005> (2015).
 22. Paiva, I. M. *et al.* Behavioral plasticity and gene regulation in the brain during an intermittent ethanol exposure in adult zebrafish population. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **192**. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2020.172909> (2020).
 23. Lawrence, C. & Mason, T. Zebrafish housing systems: A Review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR J.* **53**, 179–191. <https://doi.org/10.1093/ILAR.53.2.179> (2012).
 24. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* **83**, 13–34. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2007.00030.X> (2008).
 25. Adatto, I., Lawrence, C., Thompson, M. & Zon, L. I. A new system for the rapid collection of large numbers of developmentally staged zebrafish embryos. *PLoS One* **6**. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021715> (2011).
 26. Peneyra, S. M., Lerpriyapong, K., Riedel, E. R., Lipman, N. S., Lieggi, C. Impact of pronase, sodium thiosulfate, and methylene blue combinations on development and survival of sodium hypochlorite surface-disinfected zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Zebrafish* **17**. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2020.1917> (2020).
 27. Di Chiacchio, I. M. *et al.* Bee pollen as a dietary supplement for fish: Effect on the reproductive performance of zebrafish and the immunological response of their offspring. *Fish Shellfish Immunol.* **119**, 300-307. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.012> (2021).
 28. Castro, T. F. D. *et al.* The toxicological effects of *Eryngium foetidum* extracts on zebrafish embryos and larvae depend on the type of extract, dose, and exposure time. *Toxicol. Res.* **11**. <https://doi.org/10.1093/TOXRES/TFAC067> (2022).
 29. Duarte da Silva, K. C. *et al.* Embriotoxic and antioxidant effects of *Cymbopogon citratus* leaf volatile oil on zebrafish. *Rev. Bras. Farmacogn.* **33**, 778–789. <https://doi.org/10.1007/S43450-023-00410-W> (2023).
 30. Xiong, G. *et al.* Clethodim exposure induces developmental immunotoxicity and neurobehavioral dysfunction in zebrafish embryos. *Fish Shellfish Immunol.* **86**, 549–558. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.12.002> (2019).

31. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999> (1976).
32. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3) (1984).
33. Dieterich, S., Bieligk, U., Beulich, K., Hasenfuss, G. & Prestle, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation* **101**, 33–39. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.1.33> (2000).
34. Sachett, A., Gallas-Lopes, M., Conterato, G. M. M., Herrmann, A. P. & Piato, A. Glutathione peroxidase (GPx) activity assessment for zebrafish brain tissue. *Protocols.io* <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bsujneun> (2021).
35. Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139 (1974).
36. Miao, L., & St. Clair, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 344–356. [10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018) (2009).
37. Demir, Y., Balcı, N. & Gürbüz, M. Differential effects of selective serotonin reuptake inhibitors on paraoxonase-1 enzyme activity: An in vitro study. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **226**. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2019.108608> (2019).
38. Angelova, P. R. & Abramov, A. Y. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free Radic. Biol. Med.* **100**, 81–85. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.06.005> (2016).
39. Jain, A., Mal, J., Mehndiratta, V., Chander, R. & Patra, S. K. Study of oxidative stress in vitiligo. *Indian J. Clin. Biochem.* **26**, 78–81. <https://doi.org/10.1007/S12291-010-0045-7> (2011).
40. Sravani, P. V. *et al.* Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **75**, 268–271. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.48427> (2009).
41. Passi, S., Grandinetti, M., Maggio, F., Stancato, A. & De Luca, C. Epidermal oxidative stress in vitiligo. *Pigment Cell Res.* **11**, 81–85. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0749.1998.TB00714.X> (1998).

42. Zedan, H., Abdel-Motaleb, A. A., Kassem, N. M. A., Hafeez, H. A. A. & Hussein, M. R. A. Low glutathione peroxidase activity levels in patients with vitiligo. *J Cutan Med Surg.* **19**, 144–148. <https://doi.org/10.2310/7750.2014.14076> (2015).
43. Xiao, B. H. *et al.* Glutathione peroxidase level in patients with vitiligo: A meta-analysis. *Biomed Res. Int.* **2016**. <https://doi.org/10.1155/2016/3029810> (2016).
44. Zhang, J. *et al.* Identification of TYR, TYRP1, DCT and LARP7 as related biomarkers and immune infiltration characteristics of vitiligo via comprehensive strategies. *Bioengineered* **12**, 2214–2227. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1933743> (2021).
45. He, S., Xu, J. & Wu, J. The promising role of chemokines in vitiligo: From oxidative stress to the autoimmune response. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **6**. <https://doi.org/10.1155/2022/8796735> (2022).
46. Rashighi, M. & Harris, J. E. Interfering with the IFN- γ /CXCL10 pathway to develop new targeted treatments for vitiligo. *Ann. Transl. Med.* **3**. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2305-5839.2015.11.36> (2015).
47. Uzuncakmak, T. K. *et al.* Tissue expression of glutathione S transferase isoenzymes in vitiligo. *Biotech. Histochem.* **97**, 317–321. <https://doi.org/10.1080/10520295.2021.1977998> (2022).
48. Hernández Estévez, I. & Rodríguez Hernández, M. Plant glutathione s-transferases: An overview. *Plant Gene* **23**. <https://doi.org/10.1016/J.PLGENE.2020.100233> (2020).
49. Yang, M. *et al.* Chicoric acid: Natural occurrence, chemical synthesis, biosynthesis, and their bioactive effects. *Front. Chem.* **10**. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.888673/FULL> (2022).
50. An, X., Lv, J. & Wang, F. Pterostilbene inhibits melanogenesis, melanocyte dendricity and melanosome transport through cAMP/PKA/CREB pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **932**. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2022.175231> (2022).
51. Ferreira, A. M. *et al.* Anti-melanogenic potential of natural and synthetic substances: Application in zebrafish model. *Molecules* **28**. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28031053> (2023).
52. Luo, Y. *et al.* Discovery and identification of potential anti-melanogenic active constituents of *Bletilla striata* by zebrafish model and molecular docking. *BMC Complement. Med. Ther.* **22**, 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12906-021-03492-Y/TABLES/5> (2022).

ANEXOS – FIGURAS

Figura 1 - Protocolo de melanogênese ao longo do tempo em embriões e larvas de zebrafish em exposição ao PTU e tratadas com extratos provenientes de *S. oleraceus* ao longo do tempo.



Fonte: Da autora (2024).

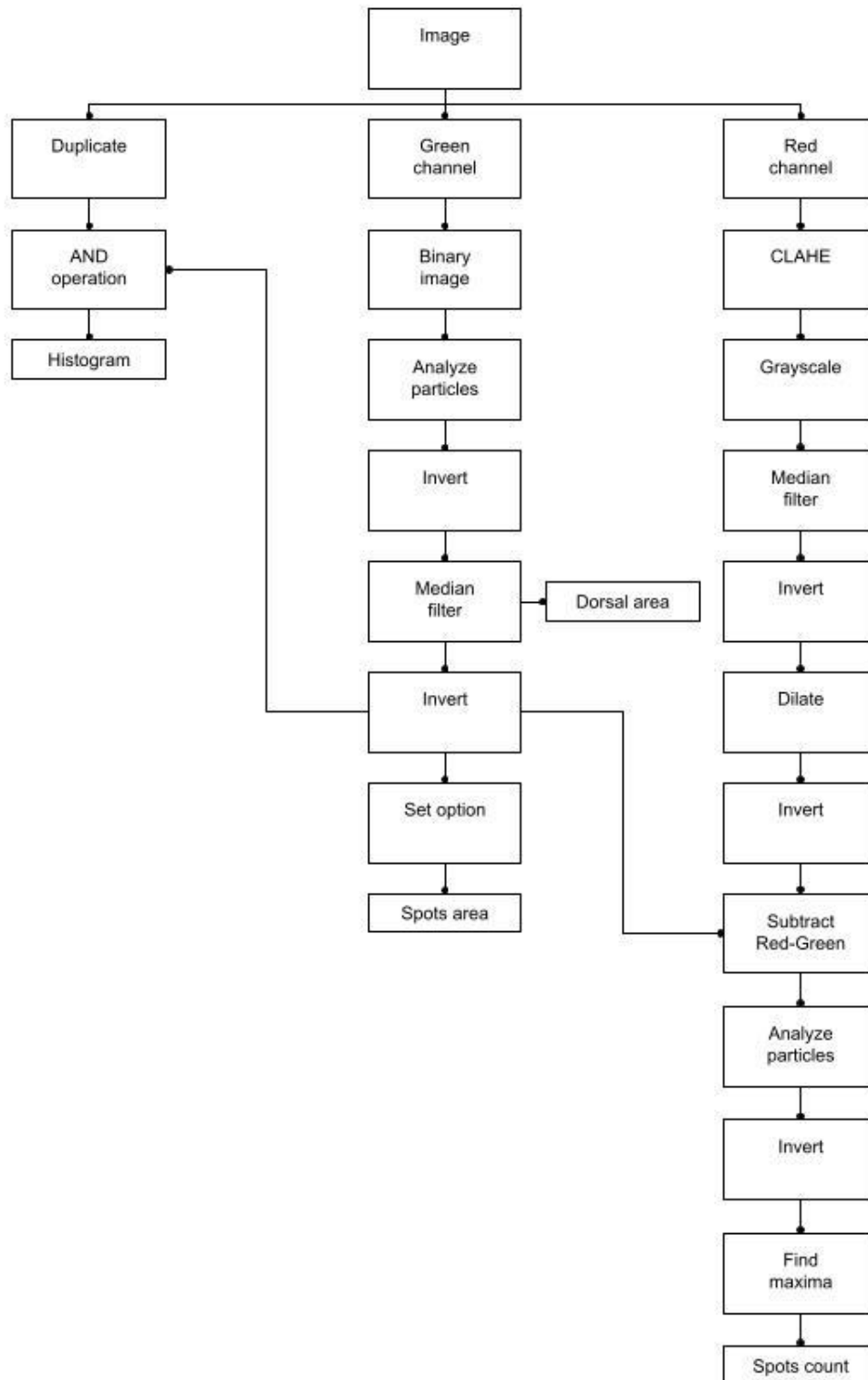
Figura 2 - Imagens demonstrativas obtidas de larvas de zebrafish após exposição ao PTU e tratadas com extratos das folhas de *S. oleraceus*.



Legenda: A- larva controle (meio para embriões); B- larva após exposição ao PTU (meio para embriões); C- Larva exposta ao extrato C2AQ de *S. oleraceus*.

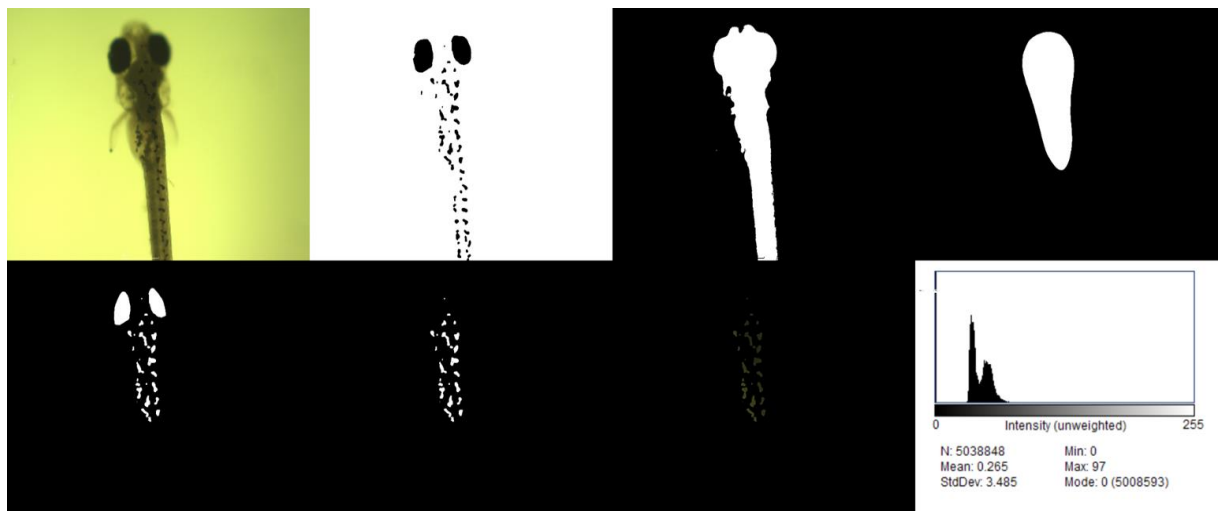
Fonte: Da autora (2024).

Figura 3 - Fluxograma de análises de imagem através da inteligência artificial.



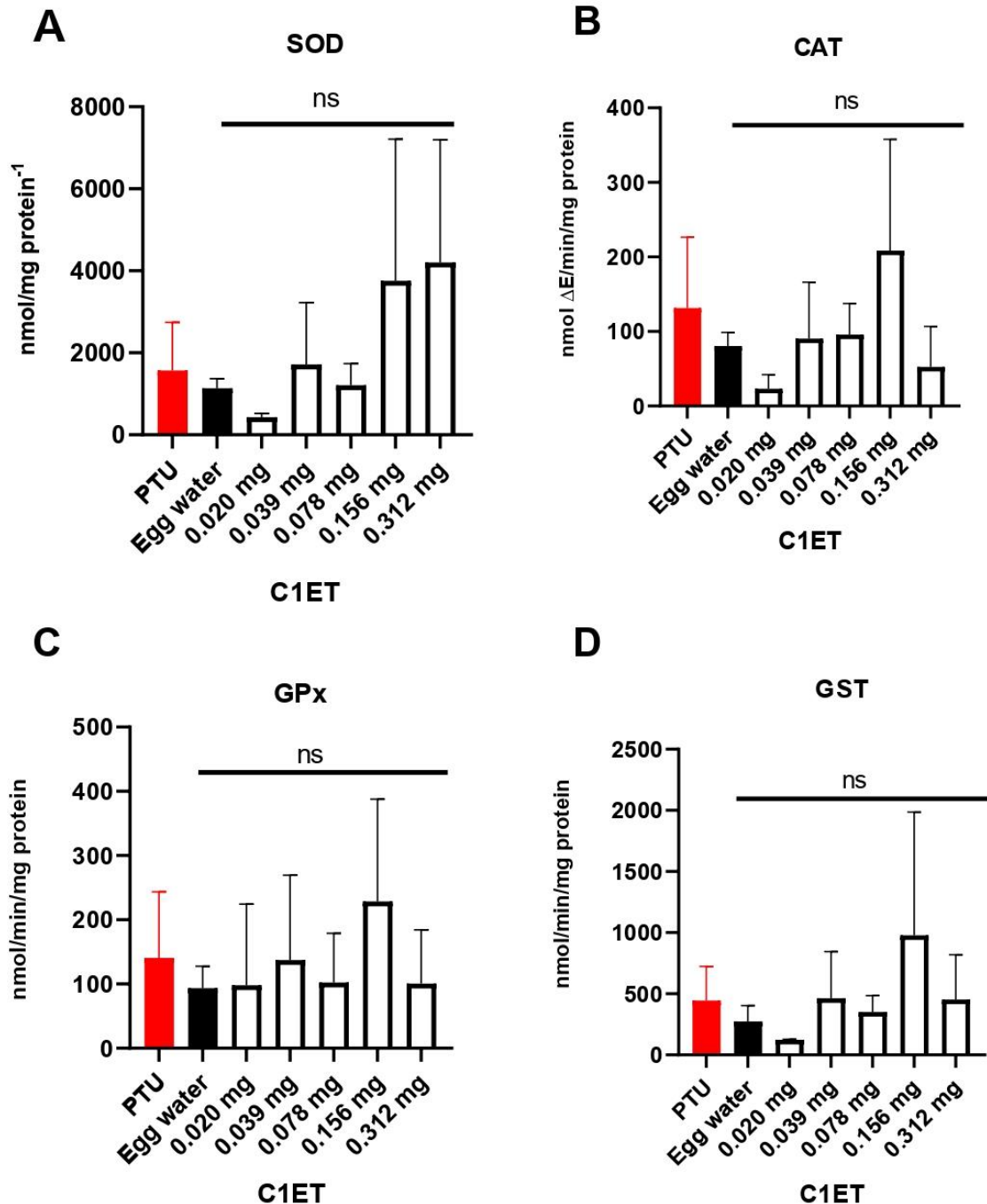
Fonte: Unnawave (2024).

Figura 4 - Etapas de processamento de imagens para avaliação da capacidade melanogênica dos extratos de *S. oleraceus* em larvas de zebrafish expostas ao PTU.



Fonte: Unnawave (2024).

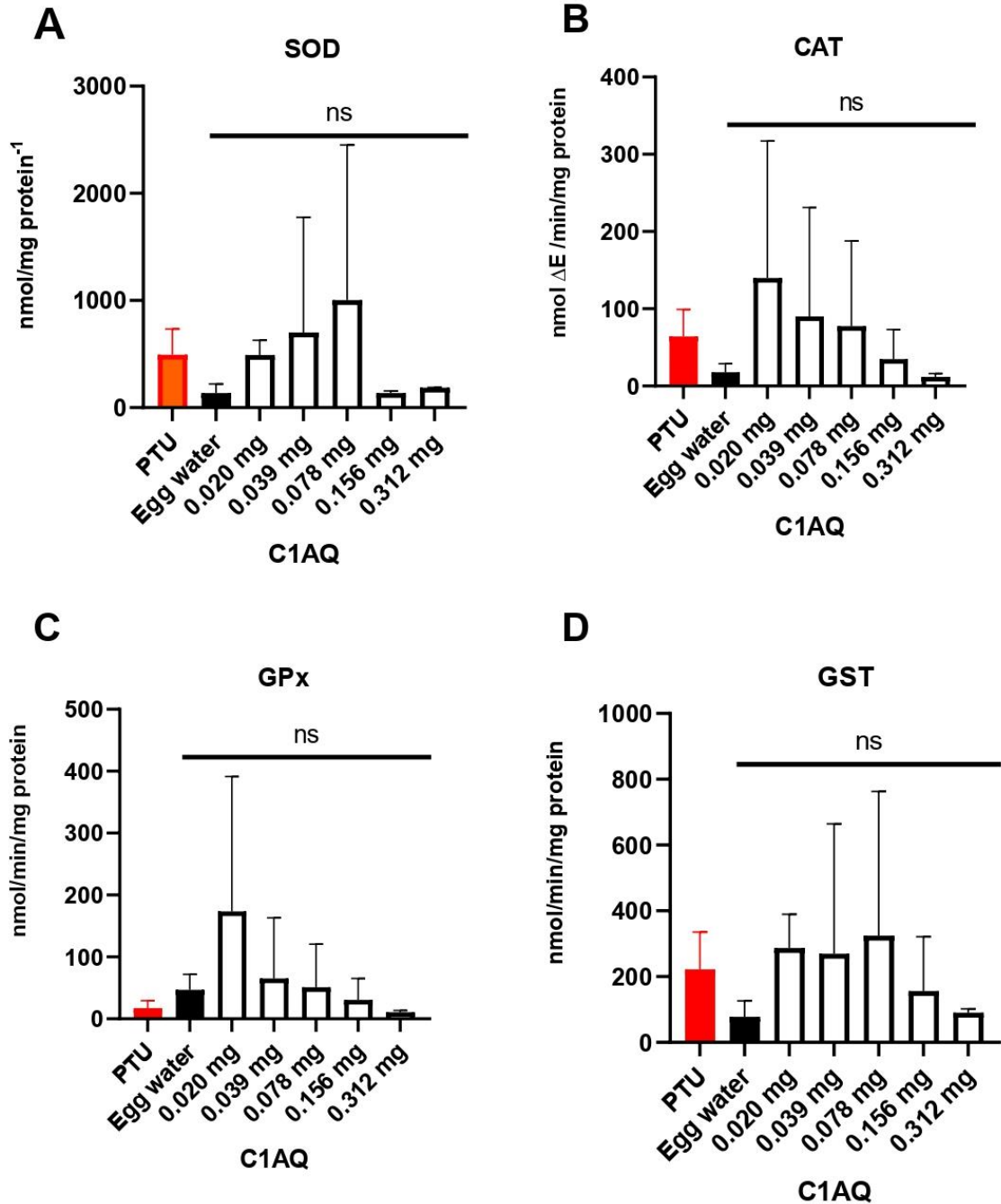
Figura 5 - Atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com Extrato etanólico (70%) da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa (C1ET).



Legenda: A- SOD (Superóxido dismutase); B- CAT (Catalase); C- GPx (Glutaciona peroxidase); D- GST (glutaciona-s-transferase). As barras indicam a média \pm DP das triplicatas ($n = 3$). ns indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$) pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2024).

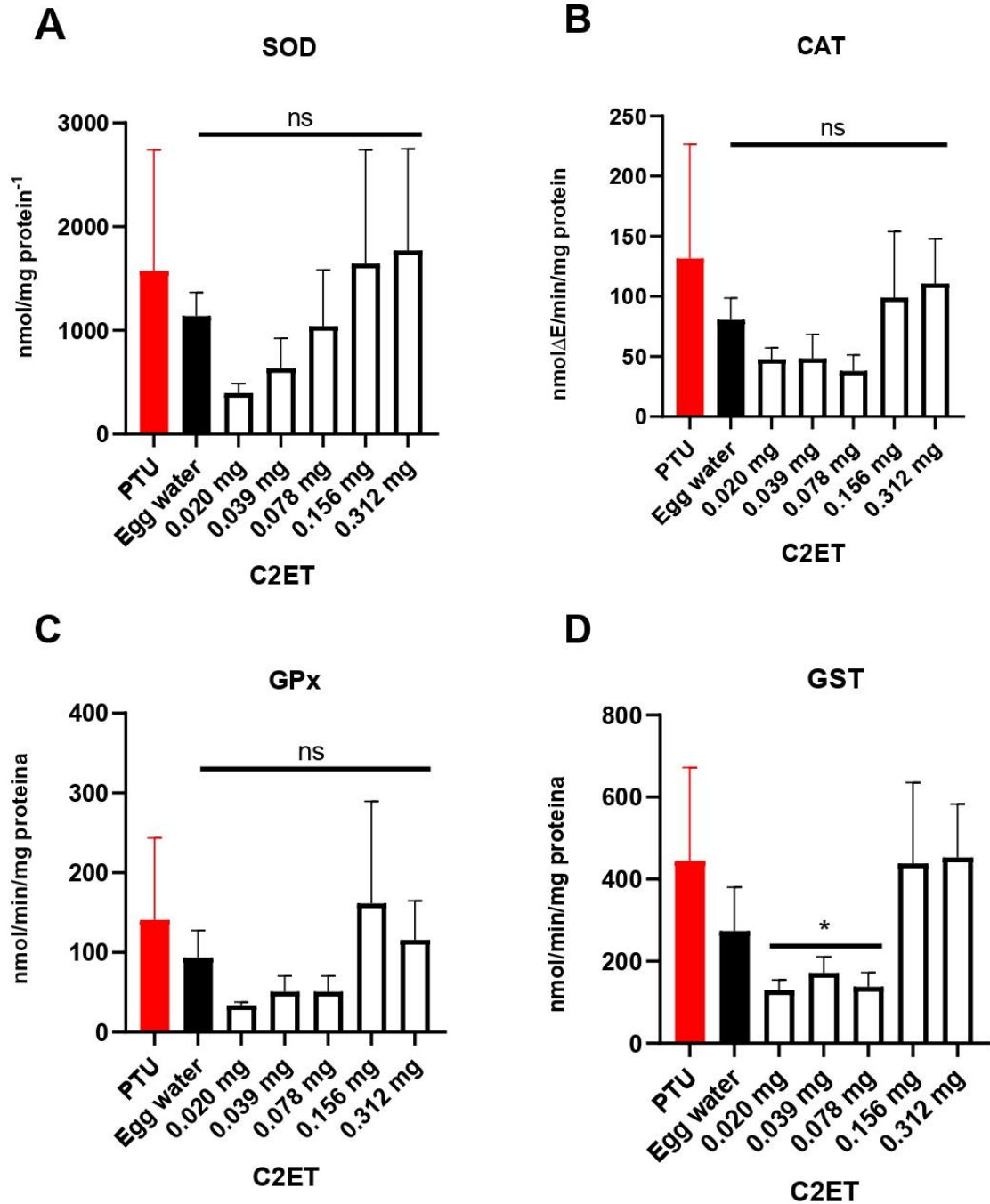
Figura 6 - Atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com Extrato aquoso da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa (C1AQ).



Legenda: A- SOD (Superóxido dismutase); B- CAT (Catalase); C- GPx (Glutaciona peroxidase); D- GST (glutaciona-s-transferase). As barras indicam a média \pm DP das triplicatas (n = 3). ns indica a ausência de diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$) pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2024).

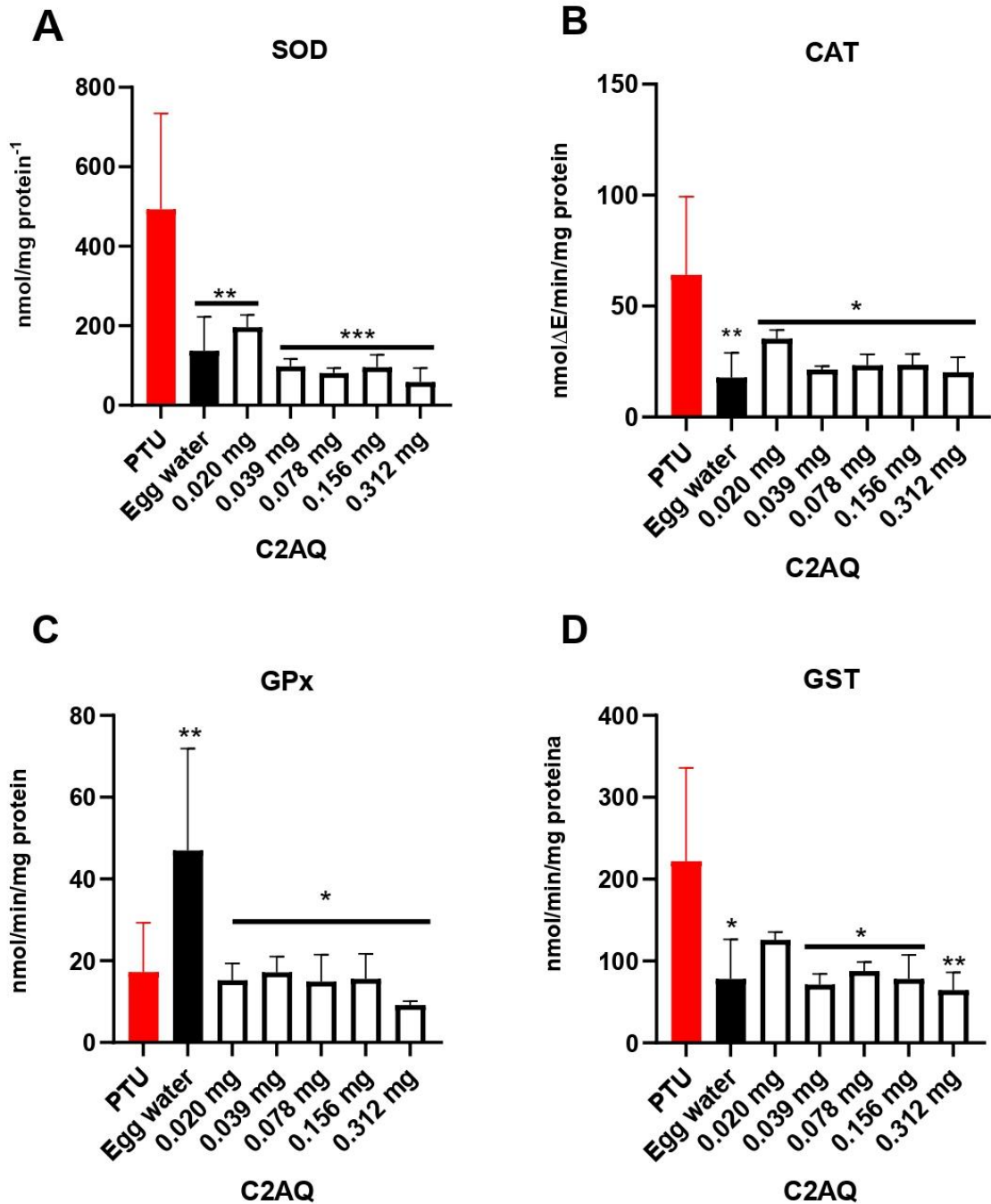
Figura 7 - Atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com Extrato etanólico (70%) da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva (C2ET).



Legenda: A- SOD (Superóxido dismutase); B- CAT (Catalase); C- GPx (Glutaciona peroxidase); D- GST (glutaciona-s-transferase). As barras indicam a média \pm DP das triplicatas ($n = 3$). ns indica a ausência de diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). * $p \leq 0,05$ indica diferença significativa pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2024).

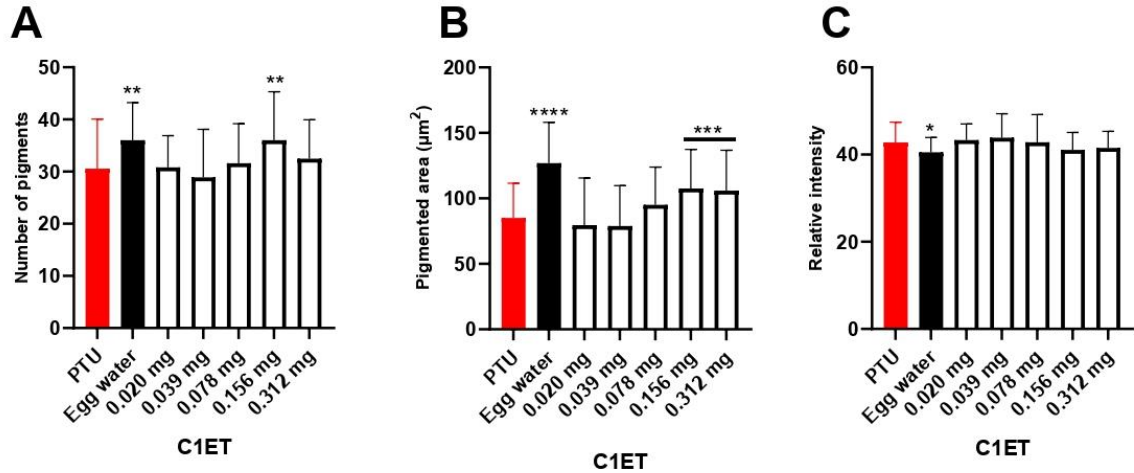
Figura 8 - Atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GST em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato aquoso da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva (C2AQ).



Legenda: A- SOD (Superóxido dismutase); B- CAT (Catalase); C- GPx (Glutaciona peroxidase); D- GST (glutaciona-s-transferase). As barras indicam a média \pm DP das triplicatas (n = 3). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ indicam diferenças significativas pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2024).

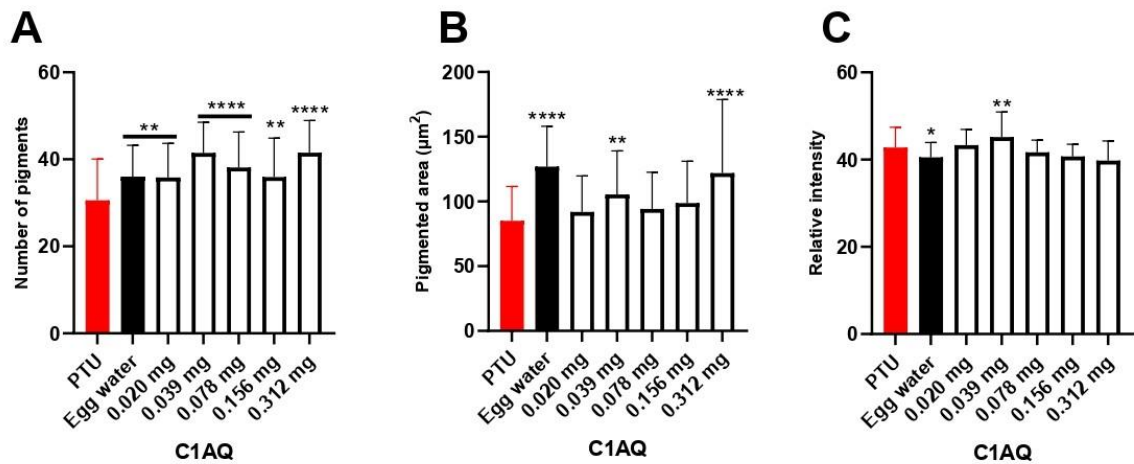
Figura 9 - Análise das imagens através de inteligência artificial em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato etanólico (70%) da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa (C1ET).



Legenda: A- número de pigmentos melanina; B- área pigmentada; C- intensidade relativa em pixels. As barras indicam a média \pm DP em triplicatas (n = 60, sendo n = 20 por grupo tratado). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ e **** $p \leq 0.0001$ indicam diferenças significativas pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2024).

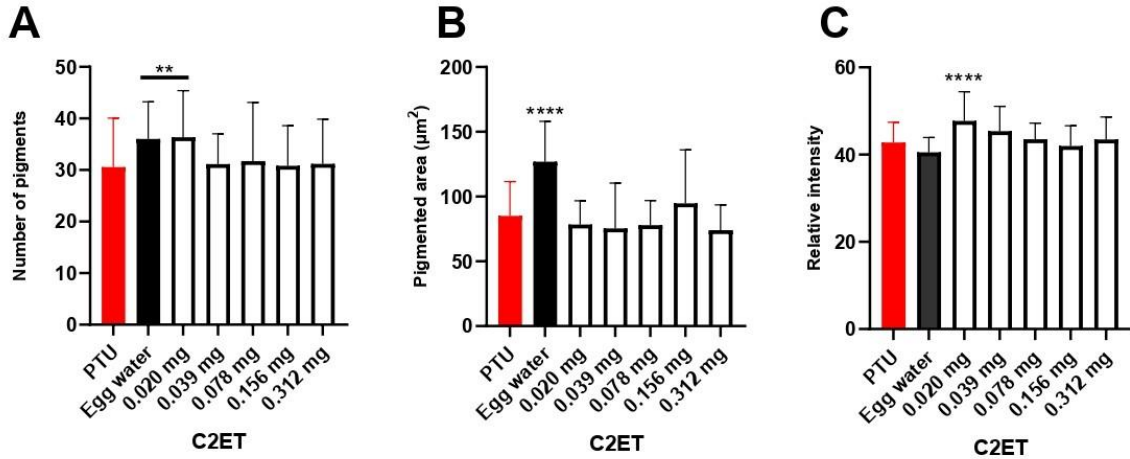
Figura 10 - Análise das imagens através de inteligência artificial em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato aquoso da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase vegetativa (C1AQ).



Legenda: A- número de pigmentos melanina; B- área pigmentada; C- intensidade relativa em pixels. As barras indicam a média \pm DP em triplicatas (n = 60, sendo n = 20 por grupo tratado). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ e **** $p \leq 0.0001$ indicam diferenças significativas pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2024).

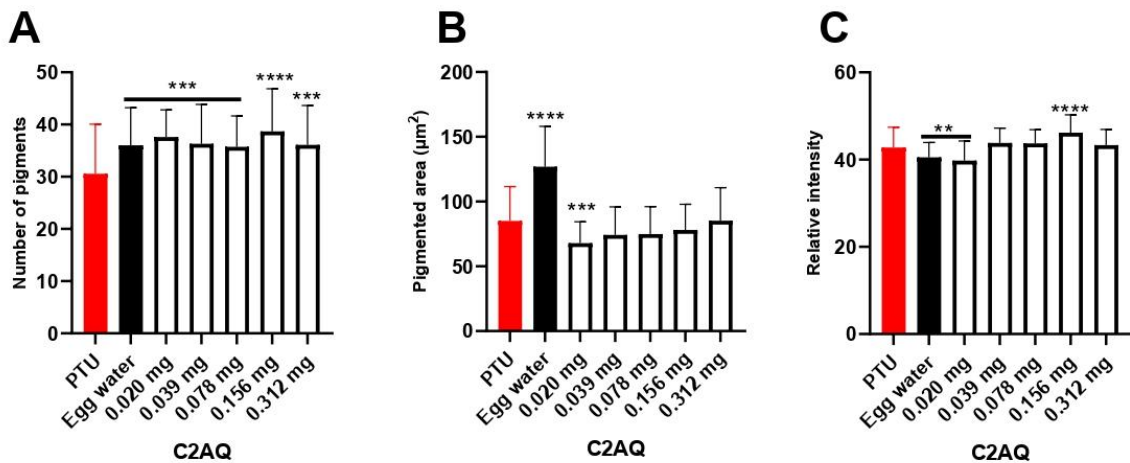
Figura 11 - Análise das imagens através de inteligência artificial em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato etanólico (70%) da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva (C2ET).



Legenda: A- número de pigmentos melanina; B- área pigmentada; C- intensidade relativa em pixels. As barras indicam a média ± DP em triplicatas (n = 60, sendo n = 20 por grupo tratado). ** $p \leq 0.01$ e **** $p \leq 0.0001$ indicam diferenças significativas pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2024).

Figura 12 - Análise das imagens através de inteligência artificial em larvas de zebrafish a 168 hpf tratadas com extrato aquoso da folha seca de *Sonchus oleraceus* em fase reprodutiva (C2AQ).



Legenda: A- número de pigmentos melanina; B- área pigmentada; C- intensidade relativa em pixels. As barras indicam a média ± DP em triplicatas (n = 60, sendo n = 20 por grupo tratado). ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ e **** $p \leq 0.0001$ indicam diferenças significativas pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2024).

ANEXO

ANEXO A - FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Cx P 3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

ATESTADO DE APROVAÇÃO PROVISÓRIO

(o certificado definitivo será concedido após o cumprimento de todos os critérios exigidos pela Orientação Técnica nº 5, de 27 de abril de 2015, do CONCEA/MCTI)

Atestamos que a proposta intitulada "Análise das propriedades terapêuticas, toxicológicas e metabólicas de extratos de hortaliças não convencionais utilizando zebrafish como modelo experimental", protocolo nº 014/19, sob a responsabilidade de Luciane Vilela Resende, Luis David Solis Murgas, Marcos Ferrante, Sarah Lacerda Fabem, Tássia Flávia Dias Castro, Amanda Maria Siqueira Moreira, Lais Teodoro Liebeck, Krisnanda Kelly Castro Lima e Karina Schulz Borges, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11 794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 23/05/2019, podendo ser iniciada a realização da sua parte experimental.

Vigência da autorização: de 01/07/2019 a 30/06/2024

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Peixe e larvas de peixe/ Zebrafish

Número de animais aprovados: peixes: 160; larvas de peixe: 800

Peso/Idade: peixes 2,5 g / 3 a 6 meses; larvas de peixe: 0,00083g / 5 a 27 dias após fertilização

Sexo: macho e fêmea

Origem dos animais: aguardando documentação

Lavras, 24 de maio de 2019.



Prof. Juliano Vogas Peixoto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br