



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)**  
**REALIZADO NO LABORATÓRIO DE ECOFISIOLOGIA E**  
**COMPORTAMENTO ANIMAL (LECA-UFRPE), RECIFE-PE**

**HISADORA ADVINCULA DA SILVA CHAVES**

**RECIFE-PE, 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)**  
**REALIZADO NO LABORATÓRIO DE ECOFISIOLOGIA E**  
**COMPORTAMENTO ANIMAL (LECA-UFRPE), RECIFE-PE**

Trabalho realizado como exigência parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária, sob orientação do Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça e supervisão do Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena.

**RECIFE-PE, 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)**  
**REALIZADO NO LABORATÓRIO DE ECOFISIOLOGIA E**  
**COMPORTAMENTO ANIMAL (LECA-UFRPE), RECIFE-PE**

**HISADORA ADVINCULA DA SILVA CHAVES**

Aprovada em 25 / 01 / 2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Souza Mendonça

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

---

Supervisor: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

---

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Ao meu marido, Givaldo Bom Filho, pelo  
companheirismo e motivação durante os quase  
seis anos de graduação.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por tudo que conquistei, inclusive ao término da graduação em um curso desejado desde a infância e em uma universidade pública renomada, além dos muitos momentos difíceis em que clamei Seu nome.

Ao meu marido, Givaldo Bom Filho, a quem tanto amo, por ser meu porto seguro e meu norte. Por ter me motivado a persistir, especialmente nos momentos mais difíceis, e pelo companheirismo, desde o primeiro período da faculdade, nos estudos, no estágio e na vida. Sem você não teria chegado tão longe e nem com todos os créditos.

Ao meu filho, Miguel Bom, por ter sido minha inspiração para continuar persistindo diante de uma dificuldade inesperada e superar o desafio de me dividir em duas, aluna e mãe. Peço desculpas pelos momentos que precisei estar ausente desde que recebi a licença maternidade, espero que assim possa te proporcionar um futuro melhor.

Aos meus amados pais, Otávio Chaves e Maria Hermínia, por todo carinho e suporte, se cheguei até aqui hoje foi graças aos dois que sempre deram prioridade à educação. Agradeço por todo auxílio com Miguel, em especial à minha mãe, que se tornou uma segunda mãe proporcionando amor a ele, para que eu pudesse continuar estudando.

À minha irmã, Hingrid Chaves, por ter sido a primeira a me apoiar quando escolhi este curso e a me desejar sucesso nos estudos.

Às minhas queridas tias, Auxiliadora, Anunciada e Helena Silva, pela contribuição na minha educação, torcida, carinho, auxílio e ajuda para cuidar de Miguel nos momentos que precisei estudar.

Aos meus sogros, Givaldo Bom e Célia Costa, pelo auxílio e torcida.

À minha supervisora do ambulatório no Hospital Veterinário-UFRPE, Bárbara Nogueira, não só pelos ensinamentos, mas por ter me aconselhado a seguir com a iniciação científica no LDA-UFRPE.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Mendonça, não só por ter me aceitado para fazer parte da equipe, mas por ter me feito crescer profissionalmente nesses cinco anos, agradeço pelas oportunidades, conselhos e orientação.

À toda equipe do LDA-UFRPE e da área de Histologia pelo apoio, principalmente à Brena Rocha e Edna Barros pelos ensinamentos no início do estágio, ao Prof. Dr. Francisco Leite pelos ensinamentos e conselhos. Em especial, à Raquel Albuquerque por toda contribuição para realização do projeto.

Ao meu supervisor, Prof. Dr. Pabyton Cadena, pela oportunidade de estágio e orientação para o desenvolvimento do projeto. À toda equipe do LECA-UFRPE pela gentileza e solidariedade, especialmente ao meu mentor, Jadson Freitas, pelos ensinamentos e orientação, e Renata Meireles, pelo apoio.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Tânia Sarmiento e ao Biofíto, pela contribuição e parceria para o desenvolvimento deste projeto.

À minha turma de origem, 2018.1, por fazerem parte na minha história, pelo carinho e contribuição no momento em que mais precisei, especialmente à Stéphanie Araújo pela amizade e por ter sido um exemplo, e Bruno Souza pela amizade e parceria.

À turma 2018.2, por me receberem bem durante o semestre 2018.1, principalmente à Thaiza Braga e Isabela Lustosa pelo apoio e amizade.

*“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.” (Benjamin Disraeli)*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

µg – Microgramas

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIUCA – Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal Média

cm – Centímetros

Coag – Coagulação

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Dc – Deformação de coluna

Dcau – Deformação de cauda

DMFA – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

DMSO – Dimetilsulfóxido

Dr. (ª) – Doutor (a)

Ep – Edema de pericárdio

Esv – Edema de saco vitelínico

FC – Frequência cardíaca

Fig – Figura

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

hpf – Hora pós-fertilização

IPA – Instituto Agrônomo de Pernambuco

ESO – Estágio Supervisionado Obrigatório

L – Litros

LECA – Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal

LED – Light Emitting Diode / Diodo Emissor de Luz

M – Mortalidade

MA – Massachusetts

mg – Miligramas

mL – Mililitros

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PB - Paraíba

POA – Processo Oxidativo Avançado



Prof. (ª) – Professor (a)

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

USA – United States of America / Estados Unidos da América

UV – Ultravioleta

w – Watts

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Zebrafish* adulto, coloração padrão azul e branca. Fonte: BrightOwl, 2018.

Figura 2. Embrião de *zebrafish* apresentando efeitos teratogênicos de deformação de coluna, edema de pericárdio e coagulação. Fonte: Chaves, 2019.

Figura 3. Equipamentos utilizados durante o período do estágio no LECA-UFRPE. (A) Aquário de *zebrafish* adulto, onde os machos e as fêmeas estão separados por uma tela. (B) Aquário de reprodução, machos e fêmeas na proporção de 2:1, respectivamente, separados dos ovos por uma tela. (C) Ovos coletados numa placa de Petri, após a desova de um grupo de reprodução. (D) Incubadora (patente BR10201801504) com os recipientes estéreis de poliestireno de 80 mL, contendo 10 ovos embrionados e a substância a ser estudada mais água tratada, mantidos a temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 14/10 horas claro/escuro. (E) Placa de Petri com pequenas poças da solução com os animais experimentais a serem avaliados no microscópio óptico. (F) Contagem dos batimentos cardíacos com o auxílio do microscópio óptico e contador manual. (G) Reator de Processo Oxidativo Avançado. Fonte: Chaves, 2019.

Figura 4. Tabela dos efeitos teratogênicos e frequência cardíaca dos embriões de *Danio rerio* exposto a diferentes concentrações do extrato etanólico das folhas de *Serjania glabrata* Kunth em teste de toxicidade aguda. Fonte: Chaves, 2019.

Figura 5. Microscopia óptica de embriões, respectivamente dos grupos controle, DMSO 5%, *Serjania glabrata* Kunth 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/L}$ , nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização. Fonte: Chaves, 2019.

## RESUMO

Devido a importância do médico veterinário em biotérios de *zebrafish* (*Danio rerio*), o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado durante o período de 20 de setembro a 07 de dezembro de 2018, no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. O relatório foi dividido em Capítulo I, no qual descreve a entidade do estágio e as atividades desenvolvidas, retratando o treinamento desenvolvido no estágio, e Capítulo II, que representa o experimento executado. *Zebrafish* tem se tornado internacionalmente reconhecido como modelo experimental para avaliação de testes de toxicidade agudos e crônicos causados por produtos químicos em pesquisas científicas nas últimas décadas. *Serjania glabrata* Kunth é uma planta presente no bioma Caatinga amplamente distribuída na região semiárida do Nordeste brasileiro e tem sido reportada como tóxica para caprinos por produtores. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do extrato etanólico das folhas de *Serjania glabrata* Kunth em embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*). As folhas de *S. glabrata* Kunth foram coletadas no município de Salgado de São Félix-PB e, a partir destas, obtido o extrato etanólico diluído em dimetilsulfóxido 1% com concentração de 5 mg/mL. Os parâmetros avaliados foram frequência cardíaca, mortalidade e efeitos teratogênicos, sendo estes deformação de coluna e cauda, edema de pericárdio e saco vitelínico, e coagulação, nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização em microscópio óptico. As concentrações de 10, 100 e 1000 µg/L do extrato etanólico das folhas de *S. glabrata* Kunth não causaram efeitos teratogênicos, bem como mortalidade, mas provocaram alterações na frequência cardíaca.

Palavras-chaves: Planta tóxica, toxicidade aguda, embriões, peixes, biotério.

## ABSTRACT

Due to the importance of the veterinarian in *zebrafish* (*Danio rerio*) vivarium, the Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) was carried out during the period from September 20 to December 07, 2018, in the Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) of the Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) in Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil. The report was divided into Chapter I, describing the stage entity and the activities developed, depicting the training developed at the stage, and Chapter II, which represents the experiment performed. *Zebrafish* has become internationally recognized as an experimental model for evaluating acute and chronic toxicity tests caused by chemical products in scientific research in recent decades. *Serjania glabrata* Kunth is a plant present in the Caatinga biome widely distributed in the Semiarid region of Northeastern Brazil and has been reported as toxic to goats by producers. Thus, this study aimed to evaluate the toxic effects of the ethanolic extract of the leaves of *Serjania glabrata* Kunth on *zebrafish* embryos (*Danio rerio*). The leaves of *S. glabrata* Kunth were collected in the county of Salgado de São Félix-PB and, from these, the ethanolic extract diluted in 1% dimethylsulfoxide with a concentration of 5 mg/mL was obtained. The parameters evaluated were heart rate, mortality and teratogenic effects, such as column and tail deformation, pericardial and vitelline sac edema, and coagulation, at 24, 48, 72 and 96 hours post fertilization intervals under an optical microscope. The concentrations of 10, 100 and 1000 µg/L did not cause teratogenic effects, as well as mortality, but caused alterations in heart rate.

Key-words: Toxic plant, acute toxicity, embryos, fish, vivarium.

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I – ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. DESCRIÇÃO DA ENTIDADE DO ESTÁGIO.....	15
3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	16
4. CONCLUSÃO.....	18

### CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DAS FOLHAS DE *Serjania glabrata* Kunth EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÃO.....	24
6. REFERÊNCIAS.....	24

## CAPÍTULO I – ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

### 1. INTRODUÇÃO

Biotérios são instalações destinadas à produção e manutenção de animais para pesquisa e ensino nas diferentes áreas da ciência (CARDOSO, 2001) e é importante que o manejo esteja de acordo com os princípios éticos na experimentação animal para cada espécie (PIMENTA; SILVA, 2001; MEDEIROS et al., 2008). Para isso, é necessária uma área física de tamanho adequado, com pessoas especializadas, com fornecimento de água e alimentos adequados para determinada espécie, temperatura e iluminação (SCHNAIDER; SOUZA, 2003).

Existem classificações diferentes para biotérios, porém há três tipos quanto à finalidade a que se destinam: de criação, manutenção e experimentação. O de criação é aquele onde matrizes reprodutoras dão origem a toda produção, tendo como objetivo controlar determinadas características. O de manutenção pode ter como finalidade adaptar o animal ao cativeiro ou fornecimento de sangue e órgãos. O de experimentação mantém os fatores padrão e ocorre a variação apenas do fator que pretende ser estudado (CARDOSO, 2002).

O *zebrafish* (*Danio rerio*) vem sendo utilizado como modelo experimental nas últimas décadas (KNIE; LOPES, 2004), tornando-se internacionalmente reconhecido como modelo para avaliação de testes de toxicidade agudos e crônicos causados por produtos químicos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) em 2013, pelo fato de seu genoma ser similar ao de mamíferos (BARABARAN et al., 2005), inclusive 70% de similaridade genética com humanos (HOWE et al., 2013).

Este peixe possui características que o tornaram ideal como modelo animal, pela resistência a variações ambientais, fácil manutenção e reprodução, gerando em média 300 ovos a cada reprodução, sendo estes relativamente grandes e translúcidos, permitindo boa visualização de seu desenvolvimento com a utilização do microscópio óptico (DAMMSKI et al., 2011). Por este motivo, é um modelo experimental menos invasivo, mais eficiente e econômico que as outras espécies.

*Danio rerio* é um peixe tropical de água doce pertencente à família Cyprinidae, onívoro, atinge em média 5 cm de comprimento e vive em média três anos (KNIE; LOPES, 2004). Conhecido popularmente como “Paulistinha”, “Peixe-zebra” ou “*Zebrafish*” (SILVEIRA et al., 2012), pois sua característica mais marcante é o padrão de listras azul e branca ao longo do corpo (Fig.1). O dimorfismo sexual mais evidente é que os machos são mais delgados e apresentam tonalidade mais escuras que as fêmeas (DAMMSKI et al., 2011).

O embrião de *zebrafish* permanece em média 2 dias envolto pelo córion, então após eclosão, é considerado larva, de 3 a 29 dias, pois é capaz de nadar livremente. No período de 30 a 89 dias, é chamado de juvenil, onde apresenta características morfológicas semelhantes aos adultos, porém estes são assim definidos quando estão aptos a reprodução, a partir de 90 dias (DAMMSKI et al., 2011).

Figura 1. *Zebrafish* adulto, coloração padrão azul e branca. Fonte: BrightOwl, 2018.



Devido a importância do médico veterinário em biotérios de *zebrafish*, o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado durante o período de 20 de setembro a 07 de dezembro de 2018, no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil.

## **2. DESCRIÇÃO DA ENTIDADE DO ESTÁGIO**

O LECA é um biotério de experimentação com peixes registrado na plataforma CIUCA (Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais) -CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e autorizado seu funcionamento pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRPE). É habilitado para testes toxicológicos com peixes possuindo mais de cem aquários aerados contendo filtros para a acomodação dos animais, bem como infraestrutura como termostatos, controle de temperatura, incubadoras para a manutenção dos mesmos.

O LECA conta com diferentes espécies de peixes, especialmente *zebrafish* (*Danio rerio*) e Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), Tambaqui (*Colossoma manopomum*) e gastrópodes, onde estes animais são utilizados em pesquisa acadêmica por docentes e discentes de graduação

e pós-graduação. O biotério tem como coordenador o Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena e como responsável técnica a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim.

A estrutura física é composta por cinco compartimentos: sala de estudos, sala do professor, banheiro, sala de procedimentos parte 1 e parte 2. A sala de procedimentos parte 1 conta com uma mesa que oferece suporte com computadores e microscópios, almoxarifado e equipamentos diversos, como geladeira, freezer, balança, destilador de água e agitador magnético sem aquecimento. Enquanto que, a sala de procedimentos parte 2 contém uma mesa central de apoio, aquários, vidrarias, lavatório e reator de Processo Oxidativo Avançado.

### **3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

Foi realizado um treinamento prévio à realização do experimento, cujo objetivo consistiu em adquirir aptidão técnica para a realização das etapas necessárias e compreender os protocolos utilizados pelo laboratório.

A realização de um procedimento visando a avaliação da toxicidade aguda em embriões de *zebrafish* tem duração média de seis dias que envolve desde a reprodução dos adultos para obtenção dos embriões à eutanásia.

No primeiro dia, realiza-se o tratamento da água oriunda da companhia local de saneamento, a qual necessita ser adequada às necessidades fisiológicas dos animais, com a adição de hidróxido de sódio para a correção do pH, até próximo a neutralidade  $\text{pH } 7,0 \pm 0,5$ , e posterior adição de tiosulfato de sódio com a finalidade de reagir com o cloro, para remoção da água pelo processo de evaporação.

Machos e fêmeas são mantidos em um mesmo aquário separados por uma tela (Fig.3A), pois o contato prévio à reprodução contribui com melhor êxito na reprodução devido a liberação de feromônios pelos machos (DAMMSKI et al., 2011).

Os aquários de reprodução (Fig.3B) são preenchidos com a água previamente tratada e são colocados machos e fêmea, na proporção de 2:1, respectivamente. Geralmente este procedimento é realizado ao final da tarde, pois tem como objetivo obter os ovos embrionados nas primeiras horas do dia seguinte.

A tela no fundo do aquário de reprodução (Fig.3B) tem como objetivo evitar que os peixes adultos realizem a ingestão de seus ovos após a desova, permitindo a separação entre os progenitores e os ovos de maneira que estes se mantenham intactos depositados no fundo do recipiente até o momento da coleta.

No segundo dia, faz-se a separação dos machos e fêmeas colocando-os de volta em seus devidos aquários e então, é realizada a coleta dos ovos utilizando uma peneira de malha fina



para filtrar a água dos aquários de reprodução, em seguida eles são lavados com água destilada, cujo o objetivo é evitar crescimento de fungos.

Cada grupo de reprodução deve possuir placa de Petri individualmente para colocar os ovos embrionados (Fig.3C), deve-se evitar misturar os ovos de diferentes progenitores devido a possível diferença de horas pós-fertilização entre eles.

A seleção de ovos viáveis e inviáveis é realizada a olho nu, observando-se característica branca e opaca de ovos inviáveis em detrimento do translúcido de ovos viáveis, entretanto é necessária a confirmação através da observação no microscópio óptico.

Os grupos dos testes são feitos em triplicatas e em cada recipiente estéril de poliestireno de 80 mL (Fig.3D) são colocados dez ovos, então adiciona a quantidade determinada da substância a ser estudada e completa com água previamente tratada.

Os recipientes contendo os embriões seguem para uma incubadora (patente BR10201801504) (Fig.3D) própria para testes toxicológicos em embriões de peixes, onde se desenvolvem com fotoperíodo de 14/10 horas (claro/escuro) e temperatura  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

No terceiro dia é feita a avaliação de 24 hpf (hora pós-fertilização) dos ovos, utiliza-se uma placa de Petri (Fig.3E), onde faz-se pequenas poças com uma pipeta de Pasteur para cada animal, colocando-a na platina do microscópio. A avaliação morfológica do embrião é realizada sob microscopia óptica em objetiva de 4x e 10x, sendo possível observar a circulação sanguínea, saco vitelínico, estruturas anatômicas e os ciclos cardíacos.

A partir da visualização das estruturas anatômicas pode-se obter dados referentes aos parâmetros avaliados como frequência cardíaca, a qual é contabilizada com o auxílio de um contador manual (Fig.3F), mortalidade, efeitos teratogênicos, como edema de pericárdio, edema de saco vitelínico, deformação de coluna, deformação de cauda e coagulação.

Figura 2. Embrião de *zebrafish* apresentando efeitos teratogênicos de deformação de coluna, edema de pericárdio e coagulação. Fonte: Chaves, 2019.



As avaliações também são feitas no quarto (48 hpf), quinto (72 hpf) e sexto dia (96 hpf). Ao final de cada dia, exceto no sexto, são trocadas as águas e substâncias dos recipientes, e então os peixes voltam para incubadora.

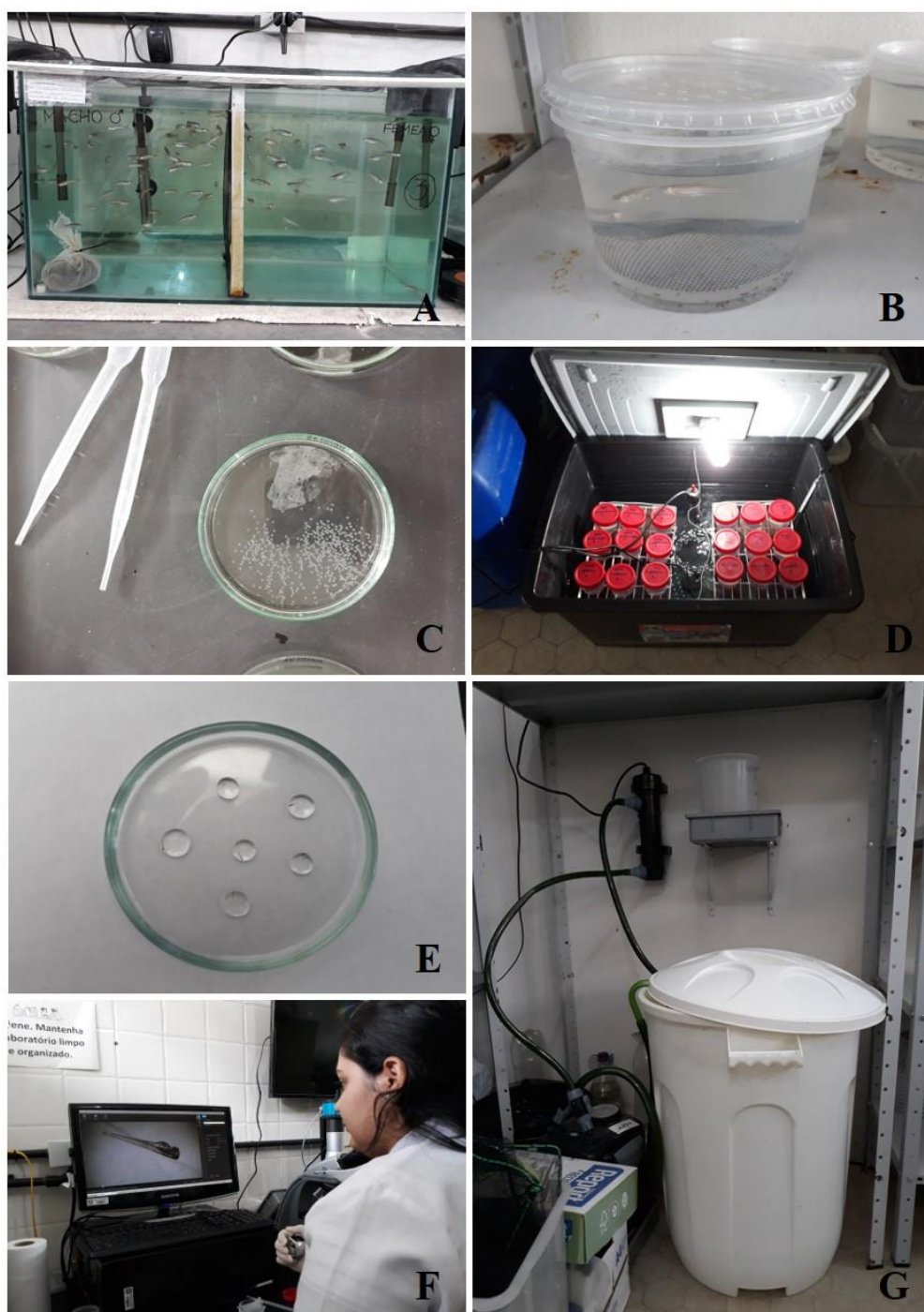
Ressalta-se que todas as substâncias tóxicas, durante as trocas de água dos recipientes, são descartadas no reator de Processo Oxidativo Avançado (Fig.3G), que tem como objetivo tratar a água antes do descarte, degradando os compostos com peróxido de hidrogênio a fim de minimizar o impacto ambiental.

No último dia (96 hpf), após a avaliação dos embriões, os animais são eutanasiados com solução anestésica de eugenol, segundo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013). Posteriormente, são descartados em reservatório apropriado para lixo biológico da Área de Anatomia-DMFA-UFRPE ou mantidos em glutaraldeído, quando tem o propósito de ser utilizado para histologia.

#### **4. CONCLUSÃO**

O estágio no biotério Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA-UFRPE), além de contribuir para o aprendizado com o que há de mais novo em experimentos para avaliação de toxicidade aguda em *zebrafish* (*Danio rerio*), representa uma importante área de atuação para o médico veterinário.

Figura 3. Equipamentos utilizados durante o período do estágio no LECA-UFRPE. (A) Aquário de *zebrafish* adulto, onde os machos e as fêmeas estão separados por uma tela. (B) Aquário de reprodução, machos e fêmeas na proporção de 2:1, respectivamente, separados dos ovos por uma tela. (C) Ovos coletados numa placa de Petri, após a desova de um grupo de reprodução. (D) Incubadora (patente BR10201801504) com os recipientes estéreis de poliestireno de 80 mL, contendo 10 ovos embrionados e a substância a ser estudada mais água tratada, mantidos a temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 14/10 horas claro/escuro. (E) Placa de Petri com pequenas poças da solução com os animais experimentais a serem avaliados no microscópio óptico. (F) Contagem dos batimentos cardíacos com o auxílio do microscópio óptico e contador manual. (G) Reator de Processo Oxidativo Avançado. Fonte: Chaves, 2019.



## **CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DAS FOLHAS DE *Serjania glabrata* Kunth EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

### **1. INTRODUÇÃO**

Plantas tóxicas são uma importante causa de prejuízo a caprinocultura do Nordeste (ASSIS et al., 2010) por ser uma atividade pecuária de grande importância no semiárido brasileiro, sendo o Nordeste o maior detentor do rebanho nacional (SILVA et al., 2012). As plantas tóxicas de interesse pecuário são aquelas que quando, sob condições naturais, causam danos à saúde dos animais, gerando prejuízos econômicos de ordem direta, quando ocorrem óbitos e queda na produção, e indireta, quando ocorre custos com manejo, profissionais e medicamentos (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). A ingestão destes tipos de planta ocorrem principalmente devido à escassez de alimentos, e quando associados a um período de estiagem agrava a ocorrência de intoxicações, mesmo quando são pouco palatáveis (TOKARNIA et al., 2012).

*Serjania glabrata* Kunth é uma planta trepadeira pertencente à família Sapindaceae, está presente no bioma Caatinga, portanto amplamente distribuída na região semiárida do Nordeste brasileiro (DAVID et al., 2007). Conhecida popularmente como “Silvestre” (CRANE, 1983), “Cipó-timbó” (PEREIRA et al., 2014) e “Mata-fome” (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2008). Pertence a um gênero de plantas, conhecido popularmente como “Timbó”, utilizadas por nativos brasileiros para pescaria por serem consideradas ictiotóxicas (TEIXEIRA et al, 1984; ARRUDA, 2008), além de raticida (AGRA et al., 2007). Criadores de caprinos do Agreste Paraibano tem associado a planta a intoxicações relacionadas ao quadro clínico que consiste principalmente em letargia, sonolência e morte.

Testes de toxicidade aguda com *zebrafish* (*Danio rerio*) são experimentos de curta duração realizados para a constatação de efeitos ictiotóxicos letais em um período de 24 a 96 horas de exposição, sendo amplamente utilizados na avaliação dos efeitos tóxicos sobre o organismo (LOMBARDI, 2004), podendo desta forma ser utilizado como modelo para a elucidação da ação de plantas tóxicas de interesse pecuário.

A importância deste estudo se dá pela relevância dos prejuízos provocados por intoxicações por plantas em animais de produção e da escassez de trabalhos científicos que avaliem a toxicidade destas plantas suspeitas e os distúrbios causados nos animais. Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do extrato etanólico das folhas de *Serjania glabrata* Kunth em embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as folhas de *Serjania glabrata* Kunth, coletadas no município de Salgado de São Félix-PB e identificadas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). As folhas foram previamente separadas e secas ao ar livre e a sombra até o tempo necessário para secagem completa e homogênea. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas até a obtenção de um pó. O extrato das folhas foi obtido a partir de 10 mg de extrato etanólico concentrado diluído em 2 mL de dimetilsulfóxido 1% (DMSO), originando uma solução de 5 mg/mL, segundo metodologia descrita por Miranda et al. (2015).

O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRPE), licença 63/2017 e o experimento foi realizado no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA-UFRPE). Os testes de toxicidade aguda das folhas de *Serjania glabrata* Kunth em embriões de *Danio rerio* seguiram as recomendações da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) 236 (2013).

Os embriões de *Danio rerio* foram obtidos segundo o protocolo de Westerfield (2000), sendo utilizados machos e fêmeas na proporção de 2:1 em aquários de reprodução (patente BR202016890170422). Os ovos recolhidos foram observados em microscópios ópticos com lâmpada de LED 1 hpf e aqueles que apresentaram desenvolvimento embrionário foram expostos à diferentes concentrações do extrato etanólico das folhas de *Serjania glabrata* Kunth, 10, 100 e 1000 µg/L diluídos em água destilada, além do grupo controle de água e DMSO, em triplicatas.

Os embriões foram acondicionados em reservatórios estéreis de poliestireno de 80 mL (n=10), com pH  $7,0 \pm 0,5$  e temperatura ambiente  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , mantidos em incubadora com fotoperíodo de 14/10 horas de claro e escuro, respectivamente (BITTENCOURT, 2018; patente BR10201801504).

Os resíduos gerados passaram por tratamento no Processo Oxidativo Avançado em reator utilizando foto-oxidação ultravioleta (UV) (16w) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) antes do descarte (HANSEN; ANDERSEN, 2012).

Os parâmetros avaliados foram frequência cardíaca (FC) (YANG, 2016), mortalidade (M) e efeitos teratogênicos, sendo estes deformação de coluna (Dc) e cauda (Dcau), edema de pericárdio (Ep) e saco vitelínico (Esv) e coagulação (Coag) (JONAS et al., 2015), nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 hpf em microscópio óptico com lâmpada de LED.

Os efeitos foram estatisticamente avaliados por meio da análise de variância simples (One Way ANOVA), quando o resultado foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de

Tukey com valor de significância  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Origin Pro Academic 2015 (Origin Lab. Northampton, MA, USA).

### 3. RESULTADOS

Não foram observados mortalidade (Fig.4) e efeitos teratogênicos (Fig.4 e 5) para as concentrações de 10, 100 e 1000  $\mu\text{g/L}$  do extrato etanólico das folhas de *S. glabrata* Kunth em razão das 24, 48, 72 e 96 hpf (hora pós-fertilização).

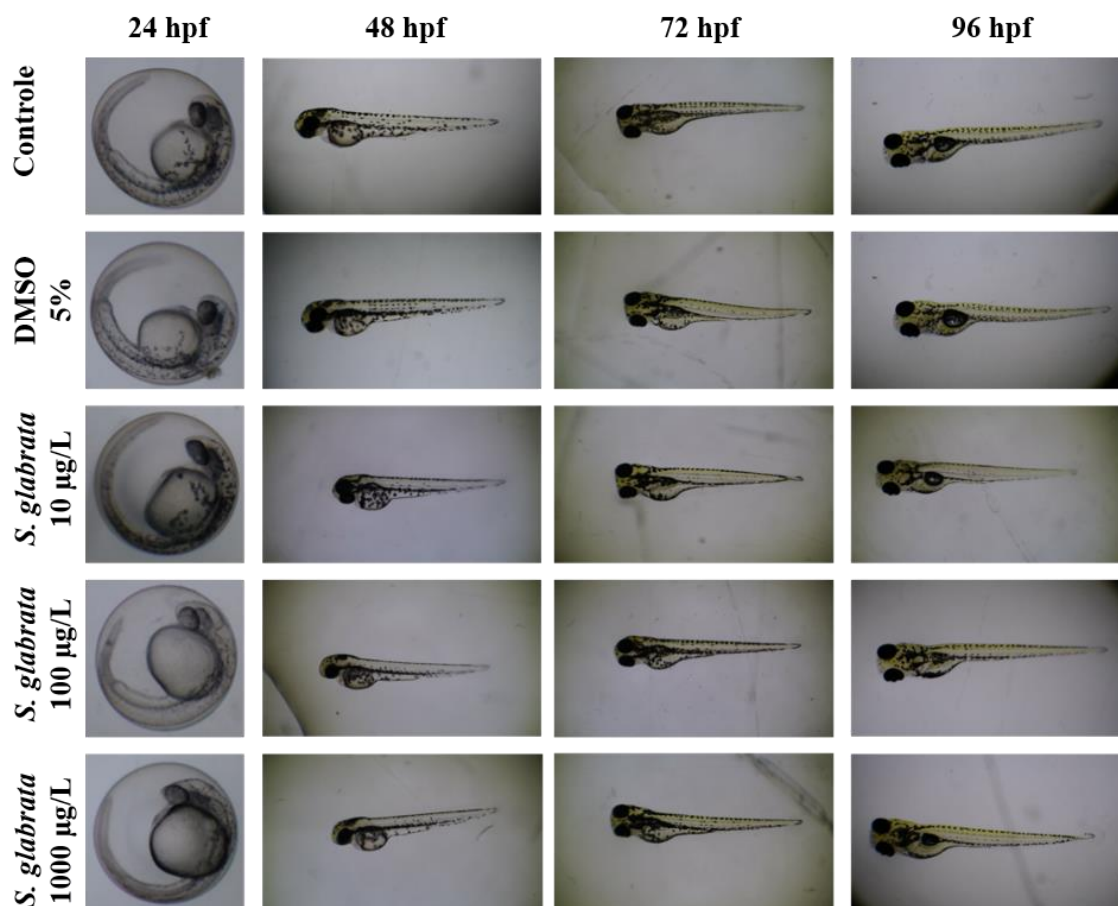
Foram observados aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) na frequência cardíaca após 24, 48 e 96 hpf nos animais expostos a concentração de 10  $\mu\text{g/L}$ . Houve decréscimos significativos ( $p < 0,05$ ) na frequência cardíaca após 24, 48 e 72 hpf nos embriões expostos a concentração de 100  $\mu\text{g/L}$ , porém ocorre um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após 96 hpf. Ocorreu decréscimos significativos na frequência cardíaca após 24, 48 e 72 hpf nos animais expostos a concentração de 1000  $\mu\text{g/L}$  (Fig.4).

Figura 4. Tabela dos efeitos teratogênicos e frequência cardíaca dos embriões de *Danio rerio* exposto a diferentes concentrações do extrato etanólico das folhas de *Serjania glabrata* Kunth em teste de toxicidade aguda. Fonte: Chaves, 2019.

Tempo	Composto Concentração Efeitos	Controle 0	DMSO 5%	<i>S. glabrata</i> 10 $\mu\text{g/L}$	<i>S. glabrata</i> 100 $\mu\text{g/L}$	<i>S. glabrata</i> 1000 $\mu\text{g/L}$
24 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0
	Dc (%)	0	0	0	0	0
	Dcau (%)	0	0	0	0	0
	Coag (%)	0	0	0	0	0
	FC (bpm)	120,4 $\pm$ 6,5	115,2 $\pm$ 7,88	132,27 $\pm$ 9,27*	67,07 $\pm$ 11,73*	91,2 $\pm$ 9,36*
48 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0
	Dc (%)	0	0	0	0	0
	Dcau (%)	0	0	0	0	0
	Coag (%)	0	0	0	0	0
	FC (bpm)	154,67 $\pm$ 9,81	149,33 $\pm$ 6,15	179,47 $\pm$ 14,5*	122,67 $\pm$ 9,81*	142,53 $\pm$ 8,17*
72 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0
	Dc (%)	0	0	0	0	0
	Dcau (%)	0	0	0	0	0
	Coag (%)	0	0	0	0	0
	FC (bpm)	203,73 $\pm$ 5,34	199,33 $\pm$ 8,66	202 $\pm$ 14,99	178,93 $\pm$ 10,23*	189,87 $\pm$ 14,39*
96 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0
	Dc (%)	0	0	0	0	0
	Dcau (%)	0	0	0	0	0
	Coag (%)	0	0	0	0	0
	FC (bpm)	204,4 $\pm$ 7,15	210,13 $\pm$ 5,32	325,2 $\pm$ 9,06*	215,31 $\pm$ 14,1*	211,33 $\pm$ 13,49

\* Diferença estatística significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Figura 5. Microscopia óptica de embriões, respectivamente dos grupos controle, DMSO 5%, *Serjania glabrata* Kunth 10, 100 e 1000 µg/L, nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas pós-fertilização. Fonte: Chaves, 2019.



#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo não foram constatados mortalidade e efeitos teratogênicos de animais experimentais nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/L do extrato etanólico das folhas de *S. glabrata* Kunth nas razões de 24, 48, 72 e 96 hpf (horas pós-fertilização), de maneira que as alterações constatadas restringiram-se a alterações das frequências cardíacas em comparação ao grupo controle.

Embora estudos relacionados a toxicidade de *S. glabrata* Kunth utilizando animais experimentais sejam escassos, um estudo de avaliação da ação moluscicida a partir de um extrato etanólico desta planta demonstrou que a mesma apresenta atividade tóxica (GRZESIUK, 2008), demonstrando maior efeito ativo nas sementes em comparação a folhas e caule. Este dado é semelhante ao constatado em grande parte dos estudos de plantas tóxicas de interesse pecuário no Brasil, havendo variação quanto aos efeitos tóxicos relacionados as diferentes partes da planta (TOKARNIA et al. 2012).

Sabe-se que existem variações quanto a susceptibilidade de espécies utilizadas na experimentação animal, porém a partir do extrato etanólico das sementes foi determinada a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) para o caramujo *Biomphalaria glabrata* de 28,3 µg/mL e para o crustáceo *Artemia salina* de 47,53 µg/mL (GRZERIUK, 2008), apresentando portanto toxicidade para estas espécies.

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as concentrações de 10, 100 e 1000 µg/L do extrato etanólico das folhas de *Serjania glabrata* Kunth não causaram efeitos teratogênicos e mortalidade em embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*), porém provocaram alterações na frequência cardíaca, portanto sugere-se que concentrações maiores que as utilizadas neste estudo para *zebrafish* possam ser suficientes para determinar a CL<sub>50</sub> para esta espécie.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.L.D.; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.383-395, 2007.
- ARRUDA, A.P.C.C.B. **Avaliação da atividade antiulcerogênica e tóxica dos extratos metanólico e clorofórmico das folhas de *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae)**. 2008. 62p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Paulista, Botucatu-SP.
- ASSIS, T.S.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F.; GALIZA, G.J.N.; DANTAS, A.F.M.; OLIVEIRA, D.M. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.13-20, 2010.
- BARABARAN, S.C.; TAYLOR, M.R.; CASTRO, P.A.; BAIER, H. Pentylentetrazole induced changes in *zebrafish* behavior, neural activity e c-fos expression. **Neuroscience**, v.131, n.2, p.759-768, 2005.
- BITTENCOURT, T.Q.M.; SANTOS, A.R.; SILVA, M.C.G.; SILVA, J.F.; SILVA, N.P.C.; SILVA, W.E., CADENA, P.G.; AMORIM, M.J.A.A.L. Toxic effects of vanadium compounds on biological parameters of embryos and adults of *zebrafish* (*Danio rerio*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.6, p.1877-1886, 2018.
- CARDOSO, T.A.O. Consideração sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Boletim Central Panamaense Fiebre Aftosa**, v.64, n.67, p.3-17, 2001.



- CARDOSO, C.V.P. **Classificação de biotérios quanto à finalidade**, p.29-31. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Eds) *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002. 388p.
- CRANE, E. **O livro do mel**. São Paulo: Nobel, 1983. 226p.
- CONCEA. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Brasília-DF, 2013. 54p.
- DAMMSKI, A.P.; MÜLLER, B.R.; GAYA, C.; REGONATO, D. **Zebrafish – Manual de criação em biotério**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1ª ed., 2011. 106p.
- DAVID, J.P.; MEIRA, M.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, H.N.; BRANCO, A.; AGRA, M.F.; BARBOSA, M.R.V., QUEIROZ, L.P.; GIULIETTI, A.M. Radical scavenging, antioxidante and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v.78, n.3, p.215-218, 2007.
- FREITAS, B.M.; SILVA, E.M.S. Potencial apícola da vegetação do semiárido brasileiro. **Apium plantae**, v.3, n.1, p.19-32, 2006.
- GRZESIUK, V.L. Estudo químico e avaliação do potencial moluscicida da espécie vegetal *Serjania glabrata* Kunth (Sapindaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- HANSEN, K.M.S.; ANDERSEN, H.R. Energy effectiveness of direct UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of estrogenic chemicals in biologically treated sewage. **International Journal of Photoenergy**, v.2012, p.1-9, 2012.
- HOWE, K.; CLARK, M.D.; TORROJA, C.F.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; ... MCLAREN, S. The *zebrafish* reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v.496, n.7446, p.498-503, 2013.
- JONAS, A.; SCHOLZ, S.; FETTER, E., SYCHROVA, E.; NOVAKOVA, K.; ORTMANN, J.; BENISEK, M.; ADAMOVKY, O.; GIESY, J.P.; HILSCHEROVA, K. Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular *in vitro* and *zebrafish* embryo assays. **Chemosphere**, v.120, p.321-327, 2015.
- KNIE, J.L.W.; LOPES, E.W.B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA, 2004. 289p.
- LOMBARDI, J.V. **Fundamentos de toxicologia aquática**, p.263-272. In: RANZANI, P.M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds) *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, 2004. 426p.
- MEDEIROS, S.H.L.; TELMO, P.L.; AGUIAR, P.S.; ALMEIDA, G.; SILVA, P.E.A.; SCAINI, C.J. A importância dos biotérios na pesquisa experimental. **Vittale**, v.20, n.1, p.25-29, 2008.

- MIRANDA, J.A.L.; ROCHA, J.A.; ARAÚJO, K.M.; QUELEMES, P.V.; MAYO, S.J.; ANDRADE, I.M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1142-1149, 2015.
- OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: effects on biotic systems test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development. 2013.
- OLIVEIRA JÚNIOR, D.A.; SILVA, R.A.; ARAÚJO, L.E.; SANTOS JÚNIOR, R.J.; ARNALD, A.L. Caracterização fenológica das plantas apícolas herbáceas e arbustivas da microrregião do Catolé do Rocha-PB-Brasil. **Revista Verde**, v.3, n.4, p.86-99, 2008.
- PEREIRA, M.M.D.; BRAGA, P.E.T.; GUIOMAR, N. Análise dos diferentes estágios de desenvolvimento da Caatinga em Sobral, Ceará, Brasil. **Revista da Casa da Geografia de Sobral**, v.16, n.2, p.46-65, 2014.
- PIMENTA, L.G.; SILVA, A.L. Ética e experimentação animal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.16, n.4, p.255-260, 2001.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicação por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.1, p.38-42, 2001.
- SCHNAIDER, T.B.; SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.53, n.2, p.278-285, 2003.
- SILVA, H.W.; GUIMARÃES, C.R.B.; OLIVEIRA, T.S. Aspectos da exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.2, n.2, p.121-125, 2012.
- SILVEIRA, T.R.; SCHNEIDER, A.C.; HAMMES, T.O. *Zebrafish*: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciências Culturais**, v.64, n.2, p.4-5, 2012.
- TEIXEIRA, J.R.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; VALLE, J.R. Timbos: ichthyotoxic plants used by Brazilian Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.10, n.3, p.311-318, 1984.
- TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F.; BARBOSA, J.D.; PEIXOTO, P.V.; DÖBEREINER, J. **Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção**. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 2012. 586p.
- WESTERFIELD, M. **The zebrafish book: a guide for laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)**. Oregon: University of Oregon Press, 4<sup>th</sup> ed., 2000.
- YANG, Y.; QI, S.; WANG, D.; WANG, K.; ZHU, L.; CHAI, T.; WANG, C. Toxic effects of thifluzamide on *zebrafish* (*Danio rerio*). **Journal of Hazardous Materials**, v.307, p.127-136, 2016.