



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA
NOS TRÓPICOS *CAMPUS* ARAGUAÍNA - EMVZ**

LAIZA PEREIRA LACERDA VIEIRA

**TOXICIDADE GERAL E REPRODUTIVA DOS EXTRATOS DOS
FRUTOS DE *Terminalia corrugata* SIN. *Buchenavia tomentosa* EM
*Danio rerio***

ARAGUAÍNA - TO
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA NOS
TRÓPICOS *CAMPUS ARAGUAÍNA - EMVZ*

TOXICIDADE GERAL E REPRODUTIVA DOS EXTRATOS DOS FRUTOS DE
Terminalia corrugata SIN. *Buchenavia tomentosa* EM *Danio rerio*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos, como requisito para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Viviane Mayumi Maruo
Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Laiane Texeira Souza Moura
Co-orientador: Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- V658t Vieira, Laiza Pereira Lacerda Vieira.
 TOXICIDADE GERAL E REPRODUTIVA DOS EXTRATOS DOS
 FRUTOS DE Terminalia corrugata SIN. Buchenavia tomentosa EM
 Danio rerio. / Laiza Pereira Lacerda Vieira Vieira. – Araguaína, TO,
 2023.
 101 f.

 Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
 Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em
 Ciência Animal Tropical, 2023.
 Orientadora : Viviane Mayumi Maruo
 Coorientadora : Laiane Teixeira Souza Moura

 1. Revisão de literatura. 2. Identificação de compostos dos frutos
 da Terminalia corrugata. 3. Toxicidade dos frutos dos extratos dos
 frutos da Terminalia corrugata. 4. Toxicidade Reprodutiva dos extratos
 dos frutos da Terminalia corrugata. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LAIZA PEREIRA LACERDA VIEIRA

TOXICIDADE GERAL E REPRODUTIVA DOS EXTRATOS DOS FRUTOS DE
Terminalia corrugata SIN. *Buchenavia tomentosa* EM *Danio rerio*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos, como requisito para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Viviane Mayumi Maruo

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Laiane Texeira Souza Moura

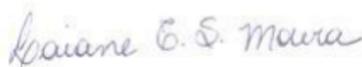
Co-orientador: Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva

Data de Aprovação: 24/03 /2023.

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 VIVIANE MAYUMI MARUO
Data: 29/05/2023 08:55:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a. Dr.^a. Viviane Mayumi Maruo Orientadora, UFNT



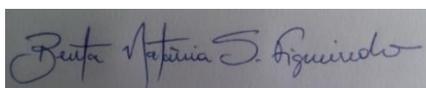
Prof.^a. Dr.^a. Laiane Texeira Sousa Moura Co-Orientadora, UFNT

Documento assinado digitalmente
 JOSEILSON ALVES DE PAIVA
Data: 29/05/2023 11:02:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Joseilson Alves de Paiva Co-Orientador, UFNT

Documento assinado digitalmente
 SANDRO ESTEVAN MORON
Data: 29/05/2023 08:24:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sandro Estevan Moron, UFNT



Dr.^a. Benta Natânia Silva Figueiredo, Secretaria municipal de saúde de Palmas - TO

Dedico à minha família, em especial aos meus pais: Luis e Maria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelo privilégio da vida, por me proporcionar saúde, sabedoria e ter ao meu lado pessoas fundamentais para minha caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado e à Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) por todo apoio durante todos os anos em que faço parte desta instituição, ao Programa de Pós-graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos (anteriormente chamado de Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical) por todo apoio durante o curso, aos meus orientadores, a professora Dr^a. Viviane Mayumi Maruo, Laiane Texeira de Sousa Moura e Joseilson Alves de Paiva, pela oportunidade, confiança e todo apoio.

À minha família, especialmente meus pais: Maria do Carmo Lacerda e Luis Gonzaga Lacerda, que sempre me deram muito amor e por todos os ensinamentos que nortearam o meu caminho, ao meu esposo Christopher Rodrigues Vieira, que tem sido um ótimo companheiro, me ajudado a trilhar mais esta caminhada com muita dedicação, paciência e amor. Ao meu sobrinho Higor Custódio de Sousa Lacerda, companheirinho que me ajudou nas coletas dos frutos e estava sempre disposto a ajudar, aos meus irmãos: Samuel Andrade Lacerda e Isidoro Pereira Lacerda Neto por sempre me ajudarem no que eu precisava. À minha tia Noemi e minha prima Dionísia, que também participaram no início deste processo me dando muito incentivo para seguir mais esta etapa, aos meus pequenos sobrinhos que me trouxeram alegria: Sophia, Isabella, José e Isadora. À todos vocês meus sinceros agradecimentos, vocês são minha motivação para sempre continuar.

Aos amigos e amigas, que conquistei ao longo da vida e que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando direta e indiretamente nesta pesquisa: Mayara Ribeiro, sem a sua colaboração eu não teria me inscrito na seleção de doutorado, Rogel, Sandro, Lowrrana, Alinne, Venucia, Dayvid. À Gilzelle, Liana e Elis que são além de amigas, técnicas dos laboratórios da UFNT, obrigada pela confiança e os ensinamentos que me proporcionaram.

Ao professor José Neuman Miranda e ao Sr. Tunico, por ter arranjado frutos da *Terminalia*. Aos técnicos da UFNT pelo apoio: Adriano, Lucas, Josimar, Marcelo, Karol, Ana Rosa. Aos técnicos do UNITPAC por ter cedido o laboratório para que

pudesse utilizar, pelo apoio e confiança: Janaina e Goraci. Aos professores: Dr. Eduardo, Wallace a professora Dr^a. Regina Lelis, por ter cedido um equipamentos essenciais para o desenvolvimento do projeto, obrigada pela confiança.

A todos vocês, gratidão!

“Faça seu melhor com o que você tem, para que quando tiver condições melhores você possa fazer melhor ainda.”

Mauro Sérgio Cortella

RESUMO GERAL

Terminalia corrugata sin. *Buchenavia tomentosa* conhecida popularmente como mirindiba, é uma planta nativa do cerrado e florestas tropicais. Criadores de ruminantes da região relatam que a ingestão de frutos da *T. corrugata* estaria associada à ocorrência de abortos, nascimento de animais fracos e morte de animais. Considerando a presença de substâncias que podem implicar em desordens reprodutivas e os relatos de intoxicação espontânea causados pelo fruto de *T. corrugata* em animais de produção, há necessidade de estudos que verifiquem os possíveis efeitos tóxicos de *T. corrugata* sobre os parâmetros reprodutivos. Objetivou-se avaliar as classes de compostos presentes no extrato dos frutos da *T. corrugata* por meio de triagem fitoquímica e a separação química por cromatografia gasosa e detecção dos prováveis compostos através de espectrometria de massas, estimar a CL_{50-96H}, a toxicidade dos frutos nas brânquias, fígado e rim do *Danio rerio*, por meio de análise histológica e avaliar os efeitos reprodutivos que o extrato dos frutos pode causar nas gônadas e na desova das fêmeas de *D. rerio*. Na triagem fitoquímica dos extratos de *T. corrugata* constatou-se a presença de açúcares redutores, taninos, flavonoides e saponinas. Análise cromatográfica do extrato acetático detectou a presença de dois compostos: furfural e 5-hydroxymethylfurfural. No que diz respeito ao teste de toxicidade, a CL_{50-96H} do extrato bruto (EB) dos frutos de *T. corrugata* estimada para o *D. rerio* foi de 772 mg.L⁻¹. Quanto a histopatologia, a exposição ao EB causou lesões no tecido branquial (aneurisma, hemorragias, hipertrofia, hiperplasia), hepático (hipertrofia e atrofia dos hepatócitos, ausência de núcleo, desorganização na arquitetura hepática) e renal (hipertrofia e atrofia tubular, degenerações, oclusões tubulares, desorganização da arquitetura renal e necrose) do *D. rerio*. Adicionalmente, o EB também causou desordens reprodutivas, reduzindo a desova do *D. rerio* e causando alterações na maturação gonadal das fêmeas expostas. Concluiu-se que os frutos de *T. corrugata* possuem princípios tóxicos que causam alterações teciduais e reprodutivas em peixes.

Palavras-chaves: Mirindiba. Planta tóxica. Fitoestrógeno. Teleósteo. *Danio rerio*.

GENERAL ABSTRACT

Terminalia corrugata sin. *Buchenavia tomentosa*, popularly known as mirindiba, is a plant native to the cerrado and tropical forests. Breeders of ruminants in the region report that the ingestion of *T. corrugata* fruits would be associated with the occurrence of abortions, birth of weak animals and death of animals. Considering the presence of substances that may lead to reproductive disorders and the reports of spontaneous intoxication caused by the fruit of *T. corrugata* in production animals, there is a need for studies to verify the possible toxic effects of *T. corrugata* on reproductive parameters. The objective was to evaluate the classes of compounds present in the extract of the fruits of *T. corrugata* through phytochemical screening and chemical separation by gas chromatography and detection of probable compounds through mass spectrometry, estimating the CL_{50-96H}, the toxicity of the fruits in the gills, liver and kidney of *Danio rerio*, through histological analysis and to evaluate the reproductive effects that the fruit extract can cause in the gonads and spawning of females of *D. rerio*. In the phytochemical screening of *T. corrugata* extracts, the presence of reducing sugars, tannins, flavonoids and saponins was verified. Chromatographic analysis of the acetatic extract detected the presence of two compounds: furfural and 5-hydroxymethylfurfural. With regard to the toxicity test, the estimated CL_{50-96H} of the crude extract (EB) of *T. corrugata* fruits for *D. rerio* was 772 mg.L⁻¹. As for histopathology, exposure to EB caused lesions in the branchial tissue (aneurysm, hemorrhages, hypertrophy, hyperplasia), liver tissue (hepatocyte hypertrophy and atrophy, absence of nucleus, disorganization in liver architecture) and kidney tissue (tubular hypertrophy and atrophy, degeneration, tubular occlusions, disorganization of the renal architecture and necrosis) of *D. rerio*. Additionally, EB also caused reproductive disorders, reducing *D. rerio* spawning and causing alterations in the gonodal maturation of exposed females. It is concluded that the fruits of *T. corrugata* have toxic principles that cause tissue and reproductive changes in fish.

Keywords: Mirindiba. Toxic plant. Phytoestrogen. Teleost. *Danio rerio*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Prospecção química dos extratos dos frutos de <i>T. corrugata</i>	53
Tabela 2 - Compostos presentes no extrato acetático dos frutos de <i>T. corrugata</i> caracterizado por análise CG-MS.	55

CAPÍTULO III

Tabela 1- Distribuição da ocorrência de lesões individuais em frequência de ocorrência (adaptado: PAULINO, et al. 2020).....	66
Tabela 2– Classificação das alterações histopatológicas do órgão e fator de importância (Fi) em relação ao órgão e organismo, de acordo com Bernet et al (1999). 1 = mínima importância patológica; 2 = moderada importância patológica e 3 = extrema importância patológica.....	66
Tabela 3– Parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental para determinação da CL _{50-96H} (média ± desvio padrão).....	68
Tabela 4 – Média de peso (gramas) do <i>D. rerio</i> submetidos a 96 horas de exposição ao EB de <i>T. corrugata</i> (média ± desvio padrão).....	70
Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental de 21 dias (média ± erro padrão).	70
Tabela 6 – Média de peso (gramas) do <i>D. rerio</i> submetidos a 96 horas de exposição ao EB de <i>T. corrugata</i> (média ± desvio padrão).....	70
Tabela 7 – Índice de Alterações Individuais (I _{alt}) do tecido branquial de <i>D. rerio</i> após exposição por 21 dias ao extrato bruto de <i>T. corrugata</i> (média ± desvio padrão).....	71
Tabela 8 – Índice de Alterações Individuais (I _{ALT}) do tecido hepático de <i>D. rerio</i> após exposição por 21 dias ao extrato bruto de <i>T. corrugata</i> (média ± desvio padrão).....	74
Tabela 9 – Índice de Alterações Individuais (I _{ALT}) do tecido renal de <i>D. rerio</i> após exposição por 21 dias ao extrato bruto de <i>T. corrugata</i> (média ± desvio padrão).....	77

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Classificação das alterações gonodais baseado na frequência de ocorrência. Adaptado OECD nº 123 (2010).	90
Tabela 2 - Alterações nas gônadas de <i>D. rerio</i> . Adaptado: OECD (2010).	91

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental de 21 dias (média ± desvio padrão).	91
Tabela 4 – Média de peso (gramas) do <i>D. rerio</i> submetidos a exposição crônica ao EB de <i>T. corrugata</i> (média ± desvio padrão).	91
Tabela 5 – Desova diária, ovos fecundados, ovos eclodidos e fertilização (em percentagem) de <i>D. rerio</i> exposto ao EB de <i>T. corrugata</i> por 21 dias.	93
Tabela 6 – histologia ovário de <i>D. rerio</i> exposto ao EB de <i>Terminalia corrugata</i>	96

LISTA DE ABREVIACOES

μg - micrograma
AC - Alteração circulatória hiperemia
Ar - alteração da arquitetura renal
CC - células-cloreto
CG – Cromatografia Gasosa
CL – Concentração Letal
CM - células mucosas
CP - células pilares
DE – Ducto Espermático
EB – Extrato Bruto
EG – Espermatogônia
EM - Espermtide
ET - Espermatócitos
EZ – Espermatozoides
Fi – Fator de impacto
G - Glomérulo
Hpl - Hiperplasia
 I_{alt} – Índice de alteração individual
 I_{ORG} – Índice de lesão no rgo
KG - quilograma
L - LITRO
LABCROM - Laboratório Central Analítica
LOG - Logaritmo
LP - Lamela primária
LS - Lamela secundária
mg - miligramas
ml - mililitro
MS – Espectrometria de massas
N - necrose
 NaHCO_3 - Bicarbonato de sódio
 O_2 - oxigênio
°C – graus Clsius

OECD - Organização para Diretriz de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

Ph – potencial hidrogeniônico

PPM – partículas por milhão

S – SUL

SIN - Sinônimo

TD - Túbulo Distal

TP - Túbulo Proximal

UFNT – Universidade Federal do Norte do Tocantins

UFT - Universidade Federal do Tocantins

W - OESTE

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	21
OBJETIVOS.....	24
OBJETIVOS GERAIS.....	24
<i>Objetivos Específicos.....</i>	24
CAPÍTULO I	
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
1.1 FAMÍLIA COMBRETACEAE.....	26
1.1.1 Gênero <i>Terminalia</i>	27
1.1.2 <i>Terminalia corrugata</i> sin. <i>Buchenavia tomentosa</i>	27
1.1.3 Toxicidade da <i>Terminalia corrugata</i> para animais de produção	29
1.2 Principais constituintes químicos dos vegetais.....	30
1.2.1 Compostos fenólicos.....	31
1.2.2 Flavonoides.....	31
1.2.3 Propriedades fitoestrógenas dos flavonoides.....	32
1.3 A utilização de peixes em substituição 3Rs replacement em testes de reprodução.....	33
1.5 Histologia de peixes.....	36
1.5.1 As brânquias.....	36
1.5.2 O fígado.....	37
1.5.3 O rim.....	37
1.5.4 Órgãos do sistema reprodutor.....	38
2 REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO II	
ANÁLISE FITOQUÍMICA E CROMATOGRAFICA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CG/MS DOS EXTRATOS DOS FRUTOS DE <i>Terminalia corrugata</i>	

RESUMO	48
ABSTRACT.....	49
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.1 Material vegetal utilizado.....	51
2.2 Triagem fitoquímica.....	51
2.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas – CG/MS.....	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
3.1 Triagem fitoquímica.....	53
3.2 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas – CG/MS.....	54
4 CONCLUSÕES.....	56
5 REFERÊNCIAS.....	56

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS, FÍGADO E RIM DO *Danio rerio* EXPOSTO AO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE *Terminalia corrugata*

RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	61
1 INTRODUÇÃO.....	62
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
2.1 Coleta dos frutos.....	63
2.2 Determinação da CL50-96H.....	64
2.3 Avaliação histopatológica 21 dias de exposição.....	64
2.4 Análise estatística.....	67

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
3.1 CL_{50-96h}.....	67
3.2 Toxicidade geral e histopatologia.....	70
3.2.1 Brânquia.....	71
3.2.2 Fígado.....	73
3.3.3 Rim.....	76
4 CONCLUSÕES.....	79
5 REFERÊNCIAS.....	79

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE *Terminalia corrugata* em ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL

RESUMO.....	84
ABSTRACT.....	85
1 INTRODUÇÃO.....	86
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
2.1 coleta dos frutos.....	87
2.2 Toxicidade Reprodutiva do extrato bruto de <i>Terminalia corrugata</i>.....	87
2.2.1 Condições gerais de manutenção dos peixes.....	88
2.2.2 Exposição ao EB 21 dias.....	88
2.3 Histologia das gônadas.....	89
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	90
3.1 Toxicidade reprodutiva.....	92
3.1.1 Produção de ovos.....	92

3.1.2 Histologia das gônadas.....	93
4 CONCLUSÕES.....	98
5 REFERÊNCIAS.....	98
CONCLUSÕES GERAL.....	101

INTRODUÇÃO GERAL

Terminalia corrugata sin. *Buchenavia tomentosa* é uma espécie vegetal pertencente ao reino Plantae, filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Myrtales, família Combretaceae e gênero *Terminalia* (LORENZI, 2009; MARQUETE; VALENTE, 2005; MARUIN et al., 2017). As filogenias do gênero, baseadas em sequências gênicas de marcadores moleculares nucleares e plastidiais (ITS, rbcL, psaA e ycf3), incluem *Anogeissus* (DC.) Wall., *Buchenavia* Eichl. e *Pteleopsis* Engl. em *Terminalia* (BERGER, 2016; MAURIN et al. 2017).

Apresenta produção de frutos entre os meses de junho a setembro, seu fruto é comestível e ácido. Os frutos são dispersos com eficiência por diversos animais, como as formigas, veados e principalmente por antas, as sementes passam pelo trato digestivo, favorecendo a retirada da polpa e não afetam o potencial de germinação (FARIAS et al., 2015).

Algumas partes do vegetal são utilizadas na medicina popular, as folhas, por exemplo, são usadas para preparo de chá e a casca no tratamento de tosse, como antihiperlipidêmicas e anorexígenas (LORENZI, 2009), experimentalmente a *T. corrugata* demonstrou atividade antifúngica (TEODORO et al., 2018). Adicionalmente, produtores de bovinos, caprinos e ovinos relataram que a ingestão dos frutos de *T. corrugata* estaria de alguma forma associada a toxicidade reprodutiva, como ocorrência de abortos. Pesquisas têm demonstrado que os frutos causam toxicidade em animais e que possivelmente a presença de metabólitos secundários nos frutos está relacionada à toxicidade (COSTA, et al., 2011; MELLO et al., 2010; LOPES, 2013).

Os peixes vêm sendo utilizados em pesquisas como alternativa a outras espécies de animais em diversas áreas, como toxicologia, farmacologia, toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento. São animais de fácil obtenção e manejo, além de necessitarem de espaços reduzidos, se comparados aos ratos de laboratório, promovendo a redução dos gastos com as pesquisas (ALI et al. 2014; BANAEI et al. 2013; CAVALCANTE et al. 2017; FERNANDEZ et al. 2011).

A espécie *Danio rerio*, popularmente conhecida como peixe-zebra ou paulistinha, pertence à família Cyprinidae e é um pequeno peixe teleósteo de água doce, medindo de 3 a 4 cm, possui dimorfismo sexual, sendo os machos mais finos e ligeiramente dourados na região ventral, enquanto que as fêmeas são prateadas e

arredondadas, principalmente na região ventral, o que é mais evidente no período próximo da desova (SUWA; YAMASHITA, 2007). É utilizado internacionalmente como modelo animal em experimentação (GUO et al., 2017; PELLEGRINI et al., 2015; WESTERFIELD, 2000). Tendo em vista os relatos de toxicidade e as pesquisas já realizadas com a *T. corrugata*, são importantes pesquisas que avaliem quimicamente os prováveis compostos presentes nos frutos e que poderiam estar relacionados ao efeito tóxico relatado, além disso, testes reprodutivos que possam verificar a toxicidade dos frutos em animais.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade geral e reprodutiva dos extratos dos frutos de *T. corrugata* em *D. rerio* e as características fitoquímicas.

Objetivos específicos

- Triagem fitoquímica das classe de compostos presentes nos frutos;
- Realizar a detecção de compostos na fração acetática por meio de cromatografia gasosa/espectrometria de massas – CG/EM.
- Avaliar a toxicidade da administração subcrônica do extrato bruto de *T. corrugata* em *D. rerio*, por meio de avaliações do peso, análise histopatológica das brânquias, fígado e rim.
- Avaliar a toxicidade reprodutiva do extrato bruto dos frutos de *T. corrugata* em *D. rerio* machos e fêmeas.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Família Combretaceae

Combretaceae é uma família botânica que engloba diversas espécies de árvores, cipós, e arbustos, distribuídas em áreas tropicais e subtropicais, como na África, Ásia e nas Américas. Inclui cerca de 525 espécies de árvores arbustos, lianas e manguezais distribuídos principalmente em áreas tropicais e subtropical, compreendendo atualmente 17 gêneros: *Bucida*, *Calopyxis*, *Combretum*, *Conocarpus*, *Dansiea*, *Getonia*, *Guiera*, *Laguncularia*, *Lumnitzera*, *Macropteranthes*, *Melostemon*, *Quisqualis*, *Ramatuela*, *Strephonema*, *Terminalia*, *Terminaliopsis*, *Thiloa* (STACE, 2010; MAURIN et al., 2017). As filogenias do gênero, baseadas em sequências gênicas de marcadores moleculares nucleares e plastidiais (ITS, rbcL, psaA e ycf3), incluem *Anogeissus* (DC.) Wall., *Buchenavia* Eichl. e *Pteleopsis* Engl. em *Terminalia* (BERGER et al., 2016; MAURIN et al. 2017). No Brasil eram relatados a presença de cinco gêneros nativos, porém com a mudança taxonômica que inclui *Buchenavia* em *Terminalia*, verificam-se a presença de 4 gêneros nativos: *Terminalia*, *Crombretum*, *Conocarpus* e *Thiloa* (LORENZI et al., 2009; MAURIN et al. 2017).

Em relação às características morfológicas das espécies pertencentes à família combretaceae, de modo geral, apresentam folhas alternas e espiraladas, ou opostas, inteiras, pecíolo ou base da lâmina foliar com duas cavidades no formato de garrafa. Suas inflorescências são terminais ou axilares, em espigas, panículas de espigas, racemos ou panículas terminais ou axilares; brácteas muitas vezes presentes. Flores actinomorfas ou zigomorfas, andrógenas, tetrâmeras ou pentâmeras. Os frutos são drupas 1-seminadas, ligeiramente achatados, costados e/ou alados; possui sementes grandes, exotesta fibrosas, com endosperma ausente (STACE, 2010; FARIAS et al., 2015).

Em países do continente Africano e Asiático, algumas espécies de Combretaceae são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças, tais como, infecções fúngicas; hipertensão; malária, lepra, tuberculose, sífilis, cárie dentária; tratamentos dermatológicos, lesões na pele; cânceres (ELOFF; KATERERE; McGAW, 2008); parasitoses, problemas do trato gastrointestinal (AREMU; FINNIE; VAN STADEN, 2012).

1.1.1 Gênero *Terminalia*

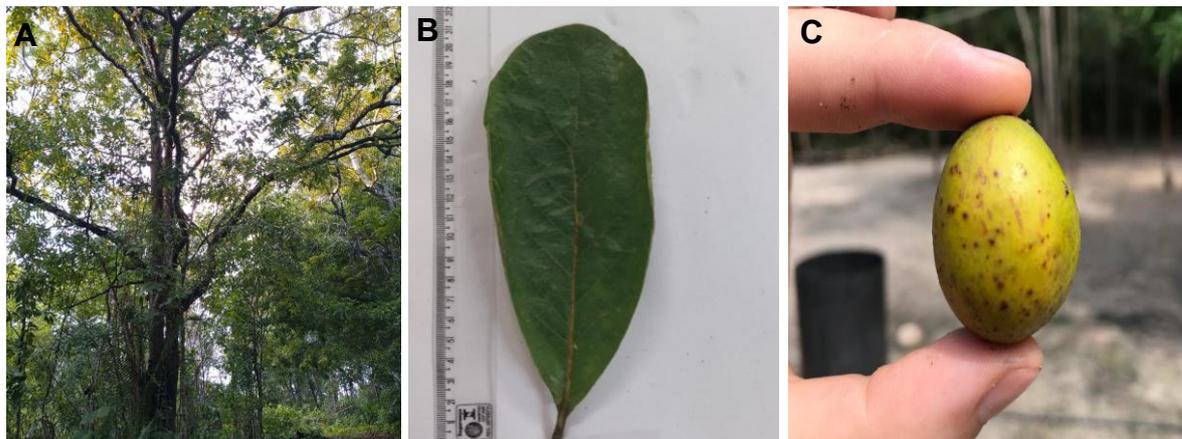
O gênero *Terminalia* é o segundo maior gênero da família Combretaceae, recentemente 3 gêneros foram incluídos no gênero *Terminalia* (*Anogeissus* (DC.) Wall., *Buchenavia* Eichl. e *Pteleopsis* Engl.), aumentando ainda mais o número de espécies no gênero (BERGER, 2012; MAURIN et al. 2017). Possui cerca de 240 espécies, distribuídas nas regiões tropicais da América, África, Oceania e Ásia (STACE, 2010; MAURIN et al., 2017). É caracterizado por vegetais de porte arbóreo, folhas simples e alternas, usualmente aglomeradas no ápice dos ramos e flores monoclinas ou unissexuadas e apétalas. Os frutos são secos, complanados ou arredondados, e as sementes apresentam cotilédones convolutos (MARQUETE; VALENTE, 2005; STACE 2010; SOARES NETO et al. 2014).

Devido à grande diversidade de espécies presentes neste gênero, observa-se diferentes aplicações, podendo ser utilizadas por suas propriedades medicinais e farmacológicas, como *T. catappa* rica em antioxidantes naturais (FOGAÇA et al. 2013), *T. acuminata* empregada no tratamento da febre amarela e hepatite (COCK, 2015), *T. fagifolia* utilizada para o tratamento de distúrbios intestinais (NUNES et al., 2014), *T. thetraphylla* (sinônimo *Buchenavia thetraphylla*) com atividade antifúngica para o tratamento de infecções provocadas por *Candida albicans* e propriedades antioxidantes (FILHO et al., 2017; SILVA et al., 2020).

1.1.2 *Terminalia corrugata* sin. *Buchenavia tomentosa*

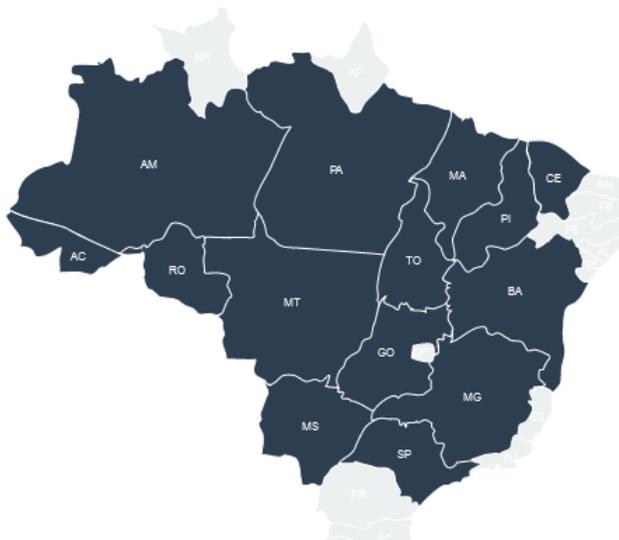
Terminalia corrugata é uma espécie vegetal pertencente ao reino Plantae, filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Myrtales, família Combretaceae e gênero *Terminalia* (figura 1). Exemplos desta espécie podem atingir uma altura que varia de 5 à 30 metros, possui copa ampla e densa, tronco curto, folhas simples, fruto arredondado e drupóides (LORENZI, 2009; MARQUETE; VALENTE, 2005; MARUIN et al., 2017).

Figura 1 – *Terminalia corrugata* (A) Árvore; (B) Folha; (C) Fruto. Fonte: autora.



Conhecida popularmente como imbú-do-sertão, tanimbuca mirindiba, piá-banheira, tarumã, biriba, tarumarana, cambry, miringiba, imbuzeiro, pau pilão, merindiba, mirindiba, migol, tanimbuca, pebanheira, cuiarana ou tanebuco, é uma árvore típica do cerrado, floresta semidecídua, mata ciliar também encontrada em florestas neotropicais, florestas atlânticas e caatinga, está amplamente distribuída no território brasileiro (figura 2) (SiBBR, 2021).

Figura 2 – Distribuição geográfica de *Terminalia corrugata* nos estados brasileiros (destaque em azul). Fonte: SiBBR, acessado em: 07-10-2021.



Possuem aproximadamente 26 metros altura, 21-35 cm de diâmetro, no ápice da árvore se inserem as folhas que são do tipo ferrugíneas ou rubiginosas pubescentes, elípticas ou obovadas, faces abaxial tomentosas, nervação do tipo broquidódromo, nervuras secundárias proeminentes, formando um ângulo obtuso

com a nervura primária e também pecíolo de 4 a 6 mm de comprimento, inflorescências do tipo espigas densifloras, terminais e/ou axilares, flores 2,0–2,5 mm, esverdeadas, frutos 2,0–3,5 × 1,2–1,7 cm, arredondado (NETO; CORDEIRO; LOIOLA; 2014).

Apresenta intensa produção de frutos entre os meses de junho a setembro, seu fruto é comestível e ácido. Os frutos são dispersos com eficiência por diversos animais, como capivaras, cutias, veados e principalmente por antas, que o consomem inteiro e as sementes passam pelo trato digestivo, favorecendo a retirada da polpa e não afetam o potencial de germinação (FARIAS et al., 2015).

Algumas partes do vegetal são utilizadas na medicina popular, as folhas, por exemplo, são usadas para preparo de chá e a casca no tratamento de tosse, como antihiperlipidêmicas e anorexígenas (LORENZI, 2009) há relatos da utilização das flores e frutos por comunidades ribeirinhas no tratamento do colesterol alto, diabetes, hipertensão (RIBEIRO et al., 2017). Azevedo et al. (2014) comentam que a madeira é utilizada na construção civil, na produção de lenha e carvão, apresenta também grande potencial apícola, além de ser indicada para recuperação de áreas degradadas.

Gironi et al. (2017) demonstraram em suas pesquisas, que os extratos das folhas de *Terminalia corrugata* possuem atividades antimicrobianas contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Além disso, apresentam também atividade antifúngica contra *Candida albicans*, reduzindo seus fatores de virulência, como capacidade de formar biofilmes e adesão em células epiteliais orais (TEODORO et al., 2015; TEODORO et al., 2018).

1.1.3 Toxicidade da *Terminalia corrugata* para animais de produção

Criadores de gado, ovinos e caprinos relatam que a ingestão de frutos da *Terminalia corrugata* estariam, de alguma forma, associada à ocorrência de abortos, diarreia, focinho seco, fraqueza, perda de peso, nascimento de animais fracos e até a morte de animais (COSTA, et al., 2011; MELLO et al., 2010).

Nunes et al. (2010) demonstraram experimentalmente que a inclusão de 10% dos frutos de *toxicidade da Buchenavia tomentosa* (sin. *T. corrugata*) na ração de ratas fêmeas durante toda a prenhez ocasionou redução do peso materno e retardo no desenvolvimento físico de filhotes machos, e que esta toxicidade apresentada está

relacionada possivelmente à presença de compostos fitoestrógenos presentes na planta.

Lopes (2013) avaliando a Toxicidade subcrônica e reprodutiva dos extratos butanólico e aquoso de *Buchenavia tomentosa* (sin. *T. corrugata*) em ratos Wistar, observou que os extratos promoveram toxicidade reprodutiva, com consequente reabsorção embrionária. Nos machos, o tratamento prolongado com os extratos induziu a um quadro de toxicidade sistêmica, causando diminuição do ganho peso.

Estas pesquisas sugerem que estes resultados foram desencadeados pelos metabólitos secundários presentes nos extratos dos frutos de *Buchenavia tomentosa* (sin. *T. corrugata*). A produção destes compostos podem estar relacionados alterações ambientais como a sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura disponibilidade hídrica, altitude, nutrientes, tipo de solo, desenvolvimento da planta, herbivoria, etc (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013).

1.2 Principais constituintes químicos dos vegetais

Os metabólitos secundários são compostos fitoquímicos presentes nos vegetais, apresentam funções ecológicas importantes como a proteção contra herbivoria e patógenos, além de agir como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2013). Geralmente são produzidos como mecanismo de defesa contra ataques ao tecido da planta ou estresse ambiental, como a temperatura, condições de luz e pH desfavoráveis. Estes compostos são classificados como metabólitos secundários, pois não estão diretamente correlacionados com as funções de crescimento e desenvolvimento do tecido vegetal e são encontrados nos tecidos e órgãos em estágios específicos de desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; REZENDE et al., 2016).

A síntese destes metabólitos pelas plantas consiste em processos influenciados por diferentes variáveis, tais como: temperatura, umidade, luminosidade, disponibilidade de água, sazonalidade, características do solo e radiação (ULM; JENKINS, 2015). Representando assim uma interconexão química entre as plantas e o ambiente circundante. Desta forma, tanto fatores bióticos, quanto fatores abióticos podem interferir na quantidade e a qualidade de produtos secundários resultantes do metabolismo da planta em um determinado momento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; REZENDE et al., 2016).

1.2.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas nos vegetais, particularmente nas folhas e frutos englobando diferentes substâncias: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas; caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxilas e/ou metoxila na molécula (SOARES, 2002; REZENDE et al., 2016). Além disso, envolvem desde moléculas simples, até moléculas com alto grau de polimerização, podem estar presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (SOARES, 2002).

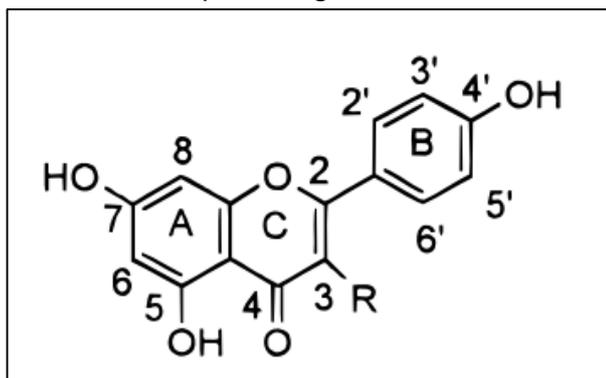
Podem ser classificados como pouco distribuídos na natureza, neste grupo estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol, polímeros; e os largamente distribuídos na natureza, divididos em dois grupos, os flavonoides e derivados; os ácidos fenólicos: ácidos benzoico, cinâmico e cumarinas (ANGELO; JORGE, 2007).

1.2.2 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias de origem natural cuja síntese ocorre somente nos vegetais, são encontrados em frutas, vegetais, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chá e vinho e possuem propriedades farmacológicas que os fazem atuar de forma benéfica para a saúde (KUMAR; PANDEY, 2013). Até à atualidade mais de 8.000 diferentes flavonoides foram descritos, sendo as suas principais classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanas, isoflavonoides e antocianinas (BHAGWAT, S., 2011; SANDHAR et al., 2011; KUMAR; PANDEY, 2013).

A estrutura básica dos flavonoides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, distribuídos em dois anéis aromáticos C6 - C3 - C6, podendo conter um grupo carbonila (figura 3). O esqueleto C15 dos flavonoides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C6 - C3) e três unidades de acetato (C6). Os flavonoides são derivados de benzo-gama-pirona de origem vegetal (YOKOZAWA et al., 1997), podendo haver facilmente inter conversão entre eles. A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural de flavonoides são as alterações que tais compostos podem sofrer: hidroxilação, metilação, acilação e glicosilação (PETERSON; DWYER, 1998).

Figura 3 – Estrutura química geral dos flavonoides.



Fonte: Merken; Beecher (2000).

Nas plantas, os flavonoides exercem funções como: proteção contra radiação UV, proteção contra microrganismos e inibição enzimática (NIJVELDT et al., 2001; KUMAR; PANDEY, 2013). Em geral, são conhecidos como os principais responsáveis pela ação antioxidante (RODRIGUES DA SILVA et al., 2015), constituindo um dos grupos de metabólitos secundários com potencial terapêutico curativo e preventivo (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Muitos destes componentes com atividades medicinais extraídos de plantas já demonstraram ter ação citotóxica, genotóxica e/ou mutagênica (VARANDA, 2006; SOLLA et al., 2016; SOARES et al., 2016).

1.2.3 Propriedades fitoestrógenas dos flavonoides

Fitoestrógenos são compostos fenólicos heterocíclicos, estão presentes em plantas e possuem propriedades e estruturas semelhantes aos estrógenos sintéticos, quando ingeridos por um determinado animal podem alterar o funcionamento normal do sistema endócrino (KNIGHT; EDEN, 1996). No intestino sofrem conversões enzimáticas pela microflora gerando fenóis heterocíclicos que se assemelham estruturalmente ao estrógeno, podendo interagir com os receptores α e β , desencadeando efeitos estrogênicos ou inibindo o estrógeno endógeno, flavonoides como a isoflavona, por exemplo, estão incluídos dentro do grupo de fitoestrógenos (BORRELLI; ERNT, 2010).

Estes disruptores endócrinos, de forma geral, possuem múltiplos sítios e mecanismos de ação, como por exemplo, a ligação do hormônio endógeno ao seu receptor, como as etapas de síntese, transporte e metabolismo do ligante natural. Por meio dessas interações agem como agonistas ou antagonistas, podendo alterar a atividade dos elementos de resposta dos genes, impedir que os hormônios naturais

se liguem aos seus receptores ou, em alguns casos, pode aumentar a quantidade percebida de hormônio endógeno (ROGERS; METZ; YONG, 2013).

Os sintomas da exposição de animais adultos aos DE podem ser revertidos com sua interrupção, sendo seus efeitos indetectáveis ou compensados por mecanismos hormonais. Porém, quando ocorre durante a gestação, podem trazer danos irreversíveis ao organismo, como abortamentos e teratogênese (FONTENELE et al., 2010).

Os flavonoides agem sobre a enzima estrogênio sintetase que catalisa a conversão de androgênios para estrogênios, do citocromo P-450. O flavonoide quercetina tem ação inibidora sobre a transformação da androstenediona para estrona e de testosterona para estradiol. Assim, os flavonoides podem competir com os esteroides, e a interação dos flavonoides com certas monoxigenases alteram a sua atividade e conseqüentemente o metabolismo dos hormônios esteroidais (LIMA et al., 2001).

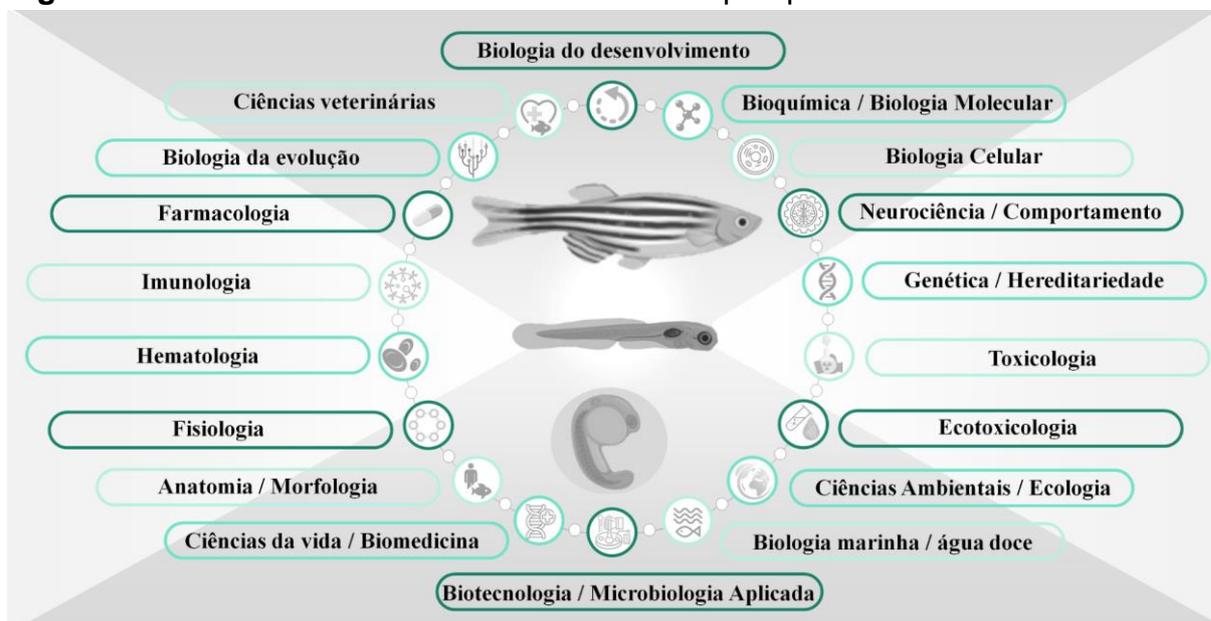
1.3 A utilização de peixes em substituição 3Rs replacement em testes de reprodução

Os peixes vêm sendo utilizados em pesquisas como alternativa a outras espécies de animais, como por exemplo, os roedores. São animais de fácil obtenção e manejo, além de necessitarem de espaços reduzidos, se comparados aos ratos de laboratório, promovendo a redução dos gastos com as pesquisas. Geralmente utilizados como modelos animais em pesquisas de diversas áreas, destacam-se em ensaios de toxicidade (ALI et al. 2014; BANAEI et al. 2013; CAVALCANTE et al. 2017; FERNANDEZ et al. 2011).

A espécie *Danio rerio*, popularmente conhecida como peixe-zebra ou paulistinha, pertence à família Cyprinidae e é um pequeno peixe teleósteo de água doce, medindo de 3 a 4 cm, possui dimorfismo sexual, sendo os machos mais finos e ligeiramente dourados na região ventral, enquanto que as fêmeas são prateadas e arredondadas, principalmente na região ventral, o que é mais evidente no período próximo da desova (SUWA; YAMASHITA, 2007). É utilizado internacionalmente como modelo animal de experimentação, tendo em vista o princípio dos 3Rs (replacement, reduction e refinement), pesquisas envolvendo biologia do desenvolvimento, genética, biomedicina, farmacologia e toxicologia, ciências veterinárias, entre outras (GUO et

al., 2017; PELLEGRINI et al., 2015; WESTERFIELD, 2000), utilizam o *D. rerio* em substituição a outros animais, como por exemplo ratos e camundongos (figura 4).

Figura 4 - O uso do zebrafish em várias áreas da pesquisa científica.

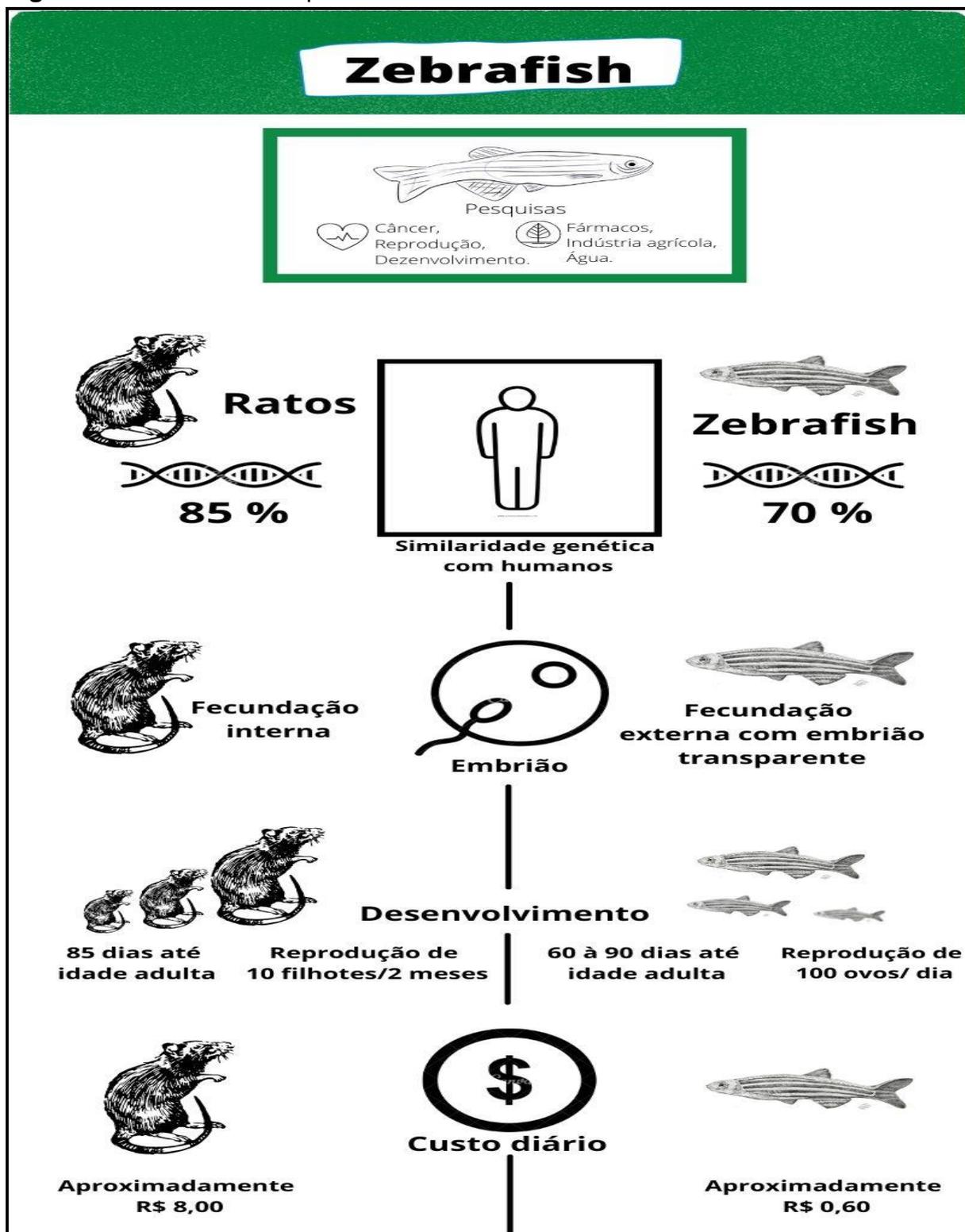


Fonte: Canedo et al. (2022).

Howe et al. (2013) publicaram a sequência genômica do peixe-zebra, revelando que esse peixe, os camundongos e os humanos apresentam 12.719 genes em comum, e aproximadamente 70% dos genes humanos é encontrada no *D. rerio*. Além disso, esta espécie possui alta taxa reprodutiva, desenvolvimento embrionário rápido e sensibilidade à exposição à toxicantes, podendo absorver rapidamente os compostos que são adicionados diretamente à água e acumulá-los em vários tecidos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A figura 5 resume de forma ilustrativa as vantagens da utilização do peixe-zebra em relação a ratos utilizados em diversas pesquisas, destacando a similaridade genética do peixe em relação ao homem, tipo de fecundação, e custo médio dos animais.

Figura 5 – Conhecendo o peixe zebra.



Fonte: Autor com adaptações (<http://www.ufrgs.br/secom/ciencia/zebrafish-o-peixe-que-esta-conquistando-os-laboratorios/> Arte: Renata Ferreira).

Em resumo, a pesquisa utilizando o peixe-zebra como modelo animal tem diversas vantagens: o baixo custo, a facilidade de manutenção, o tamanho dos animais que facilita o manejo em pequenos espaços. Com novas tecnologias sendo desenvolvidas, estudos com estes animais podem melhorar significativamente a compreensão do desenvolvimento de patologias e proporcionar estratégias para o tratamento.

1.4 Histopatologia de peixes

As análises histopatológicas são sensíveis para detectar efeitos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo, como brânquias, fígado e rim (MAHARAJAN et al., 2012; BENZE, 2013), uma vez que as análises microscópicas permitem considerar quantitativamente as lesões histopatológicas, possibilitando, relacionar os danos encontrados com alterações em outros tipos de biomarcadores em peixes (SCHWAIGER et al., 1997).

1.4.1 As brânquias

As brânquias são constituídas na maioria dos peixes teleósteos por quatro arcos branquiais em cada lado da faringe, se estendendo em duas fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias, as lamelas secundárias se elevam acima e abaixo destes filamentos, regularmente distribuídas (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Atuam como um órgão multifuncional que está diretamente envolvido nas trocas de gases respiratórios (O_2/CO_2), regulação iônica e osmótica, no equilíbrio ácido-base, na excreção de produtos nitrogenados e metabolismo de xenobióticos (FERNANDES; MORON, 2014).

O fato de este órgão funcionar como uma barreira entre o meio externo e interno faz com que a morfologia branquial passe por constantes modificações durante a adaptação do peixe às alterações ambientais. As brânquias atuam como órgão alvo dos peixes para os poluentes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma extensa área superficial (FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011).

Diversos tipos celulares compõe o epitélio branquial: células pavimentosas (CPV), células mucosas (CM), células pilares (CP) e células-cloreto (CC). As CPV formam a maior parte da superfície branquial constituindo cristas, que dispostas

circularmente ampliam a superfície celular aumentando a transferência gasosa (EVANS et al., 1999). As CM localizam-se na porção basal dos filamentos e nas regiões interlamelares, o muco que produzem possuem funções de lubrificação, proteção do tecido contra microrganismos patogênicos, resistência a doenças e substâncias tóxicas, estas secreções também atuam na regulação e difusão de íons (BERNET et al., 1999; DÍAZ et al., 2001; HANDY et al., 1989). As CP evitam o abaulamento da lamela pela pressão sanguínea, pois controlam o fluxo de outras células no interior da lamela secundária (RANDALL et al., 2000). As CC possuem funções relacionadas à regulação de íons, balanço ácido básico e redução de transferências gasosas, geralmente se localizam na região basal das lamelas, podendo também ser encontradas na região apical (PERRY, 1997). Fatores ambientais podem influenciar o número, tamanho, forma e estrutura destas células, conseqüentemente, comprometendo o funcionamento normal do órgão (JAGOE; HAINES, 1990).

1.4.2 O Fígado

O fígado é um órgão fundamental para o metabolismo, quando se considera a ação de produtos químicos que possam estar afetando o peixe, é o principal órgão na biotransformação e excreção dos xenobióticos (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Destacam-se como principais funções do fígado: conversão de alimentos, estoque de glicogênio, remoção e metabolização de substâncias químicas presentes no organismo, formação da bile, síntese de proteínas plasmáticas, síntese do colesterol utilizados nos hormônios e membranas celulares, produção de secreções exócrinas e metabolismo de hormônios (HEATH, 1995).

Os hepatócitos possuem diversas funções essenciais para a sobrevivência do animal, além de realizar um papel importante no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Atua como sítios de glicose e desintoxicam o organismo através da metabolização de agentes químicos (GARTNER; HIATT, 2007).

1.4.3 O Rim

Em peixes de água doce a principal função do rim é a excreção de uma grande quantidade de urina diluída. Assim, a urina dos peixes dulcícolas é abundante e com baixa concentração de eletrólitos (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Localizado

dorsalmente, junto da coluna vertebral, o rim dos teleósteos é dividido em duas porções: rim cefálico ou a porção anterior e a porção posterior. A porção anterior do rim é homóloga a adrenal de mamíferos e apresenta dois tipos especiais de células, as células interenais e as células cromafins. A porção posterior do rim dos teleósteos, em associação com as brânquias e intestino, realiza a excreção e a manutenção da homeostase dos fluídos corporais (EVANS, 1993).

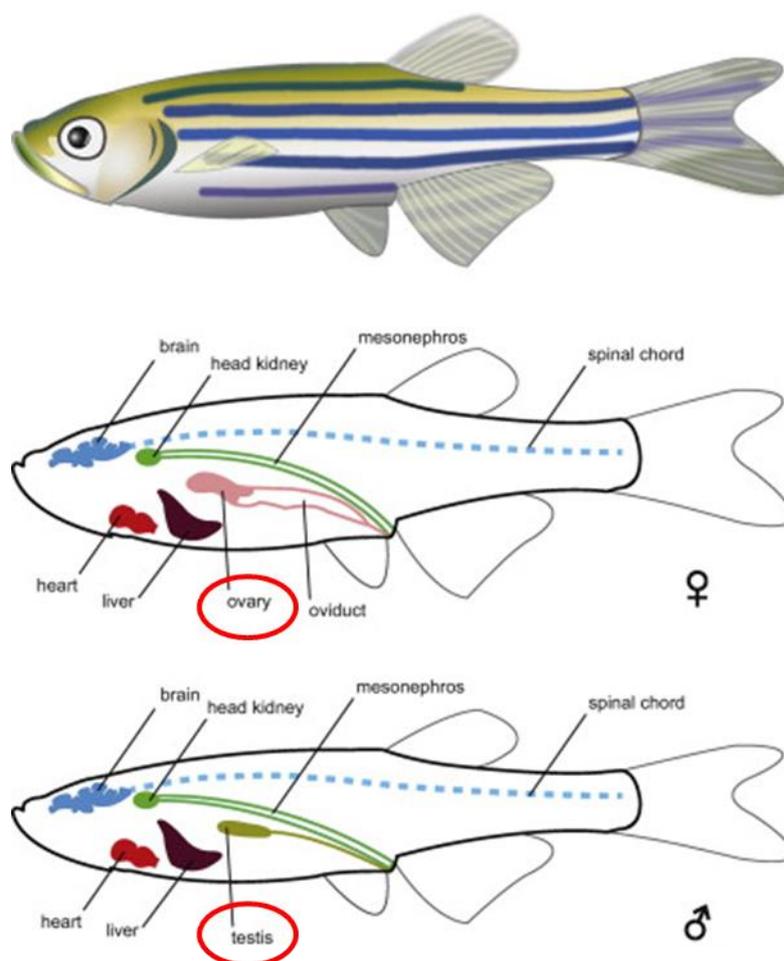
Os rins compõem a principal rota de excreção para os metabólitos de vários xenobióticos os quais o peixe tenha sido eventualmente exposto (HINTON et al., 1990), elimina produtos químicos durante o curso de formação da urina, alguns através da filtração glomerular, outros por reabsorção ou pelos processos de secreção tubular (JOBILING, 1995; EVANS, 1993). Lesões no tecido renal podem ser indicações de toxinas específicas e assim podem ser utilizados como indicadores causados por estes compostos (HINTON; LAURÉN, 1990).

1.4.4 Órgãos do sistema reprodutor

Durante o processo do ciclo reprodutivo, as gônadas acumulam espermatozoides ou ovócitos vitelogênicos até alcançar o pico no momento da reprodução (GODINHO, 2007). Os hormônios são fatores endógenos, que regulam a dinâmica reprodutiva e os fatores abióticos são exógenos, sazonalmente variáveis. Neste caso, os fatores endógenos são influenciados pelos exógenos, como por exemplo, a temperatura e o fotoperíodo, que atuam no hipotálamo levando à produção de liberadores de gonadotrofinas, estimulando a liberação de hormônios gonadotróficos e a produção de esteroides (NAGAHAMA; YAMASHITA, 2008).

Os ovários e testículos (figura 6) na maioria das espécies de peixes neotropicais são órgãos pares, alongados, fusiformes, e globosos, localizados na porção dorsal da cavidade celomática, um de cada lado da vesícula gasosa e dorsalmente ao tubo digestivo. As gônadas se prolongam no sentido crânio caudal, fundindo-se em um único oviduto e terminando na papila urogenital por onde os óvulos alcançam o meio externo, localizada caudalmente à abertura anal (RODRIGUES; QUEROL; BRACCINI, 2005).

Figura 6 – Visão geral da anatomia endócrina relacionada ao peixe-zebra adulto. Os principais tecidos esteroidogênicos (gônadas – em destaque, células interrenais embutidas no rim cefálico); medula espinhal, fígado e coração.



Fonte: Tokars et al. (2013).

Nas fêmeas, os folículos ovarianos incluem o ovócito, as células foliculares e a membrana vitelina. Durante a ovogênese, inicia-se a proliferação e diferenciação das ovogônias por meio do processo mitótico. Essas células germinativas primordiais podem apresentar-se em ninhos ou isoladamente (SCHULTZ; FAVARO; SPACH, 2002).

Em teleósteos machos na parte externa do testículo há um revestimento por uma fina cápsula fibrosa de tecido conjuntivo que se estende para o interior, delimitando os túbulos seminíferos. Durante o processo de espermatogênese, ocorre mitose nas células germinais primordiais (espermatogônias), originando os espermatócitos, nos quais se dividem meioticamente, originando as espermatídes que, ao sofrerem espermiogênese, dando origem às células reprodutoras masculinas os espermatozoides (RIBEIRO, 2005).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI S., AALDERS J., RICHARDSON M. K. Teratological effects of a panel of sixty water-soluble toxicants on zebrafish development. **Zebrafish**, v. 11 n.2, p. 129–141, 2014.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.232-240, 2007.

AREMU, A.O.; FINNIE, J.F. VAN STADEN, J. Potential of South African medicinal plants used as anthelmintics – Their efficacy, safety concerns and reappraisal of current screening methods. **South African Journal of Botany**, v. 82, p. 134-150, 2012.

AZEVEDO, M.I.R.; PAIVA, H.N. E GOMES, J.M. Efeitos de substratos, luz e temperatura na germinação de sementes da espécie *Buchenavia tomentosa* Eichler (mirindiba) em condições de laboratório. **Agri-Environmental Science**, vol. 1, n. 1, p. 11-22, 2014.

BANAEE, M., SUREDA, A., MIRVAGEFEI, A.R. AND AHMADI, K. Biochemical and histological changes in the liver tissue of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sub-lethal concentrations of diazinon. **Fish Physiology Biochemical**. 2013.

BENZE. T. P. **Efeitos da exposição ao inseticida difluzenzuron em curimatá, Prochilodus lineatus (Teleósteo, Prochilodontidae)**. São Carlos, 2013. 71f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2013.

BERGER B.A.; KRIEBEL R.; SPALINK D.; SYTSMA, K.J. Divergence times, historical biogeography, and shifts in speciation rates of Myrtales. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, V.95, P. 116–136 2016.

BERNET, D., H. et al. Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish disease**, 22: 25-34, 1999.

BHAGWAT, S., HAYYTOWITZ, D.B., HOLDEN, J.M. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. U.S. Department of Agriculture: **Agricultural Research Center**, Release 3, p. 10-12, 2011.

BORRELLI, F. ERNST, E. Alternative and complementary therapies for the menopause. **Maturitas**, v. 66, n. 4, p. 333-343, 2010.

CANEDO, A.; PATRÍCIA SAIKI, P.; SANTOS, P.L. et al. O peixe-zebra (*Danio rerio*) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa **Cienc. Anim. Bras.**, v.23. 2022.

CAVALCANTE et al. Evaluation of resveratrol toxicity in the embryolarval stage of *Danio rerio* fish. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 12, n. 1, 2017.

COCK I. E. The medicinal properties and phytochemistry of plants of the genus *Terminalia* (Combretaceae). **Inflammopharmacology**, v.23; p.203- 229, 2015.

COSTA, A. M. D.; MARIANO DE SOUZA, D. P.; CAVALCANTE, T. V.; ARAÚJO, V. L.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M. Plantas tóxicas de interesse pecuário em região de ecótono amazônia e cerrado. Parte II. Araguaína, Tocantins. **Acta Veterinária Brasileira**, v.5, n.3, p.317-324, 2011.

DÍAZ, A. O.; GARCÍA, A. M.; DEVINCENTI, C. V.; GOLDEMBERG, A. L. Mucous Cells in *Micropogonias furnieri* gills: Histochemistry and Ultrastructure. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. **Journal of Veterinary Medicine Series**, Berlim, v.30, n.3, p. 135-139, 2001.

ELOFF, J. N.; KATERERE, D. R.; McGAW, L. J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **Journal of ethnopharmacology**. v. 119, p. 686-699. 2008.

EVANS, D. H. **The Physiology of Fishes**. Boca Raton: CRC Press, p. 491. 1993.

FARIAS, J.; SANCHEZ, M.; ABREU, M.F.; PEDRONI, F. Seed dispersal and predation of *Buchenavia tomentosa* Eichler (Combretaceae) in a Cerrado sensu stricto, midwest Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.75, n.4, p.88-96, 2015.

FERNANDES; M. N.; MORON, S. E..Respiração e Adaptações Respiratórias. In: BALDISSEROTTO; B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Org.). **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. Jaboticabal: FUNEP, UNESP, p. 336. 2014.

FERNANDEZ, W. S.; DIAS, J. F.; RIBEIRO, C. A. O.; AZEVEDO, J. de S. Liver Damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella Brasiliensis* (Actynopterigii, Atherinopsidade) from two beaches in southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 59, n. 2, p. 163 - 169, 2011.

FILHO, J. R. N. et al. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521–1527, 2017.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A. T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal Biology**, v. 71, n. 1, p. 179 -188, 2011.

FOGAÇA DNL, PINTO JÚNIOR WRS, RÊGO JÚNIOR NO & NUNES GS (2013) Atividade antioxidante e teor de fenólicos de folhas da *Terminalia catappa* Linn em diferentes estágios de maturação. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** 34: 257-261.

FONTENELE E. G. P.; MARTINS M. R. A; QUIDUTE A. R. P.; MONTENEGRO JR R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**, v.54, n.1, p. 6-16, 2010.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GIRONDI, C. M., et al. Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. **Future Microbiology**, 12(8), 671-681, 2017.

GOBBO-NETO L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.351-360, 2007.

GUO, S.; ZHENG, J.; YUANA, S.; ZHUB, Q.; WUA C. Immunosuppressive effects and associated compensatory responses in zebrafish after full life-cycle exposure to environmentally relevant concentrations of cádmium. **Aquatic Toxicology**, p. 64-71, 2017.

HANDY, R. D; EDDY, F. B.; ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminum and zinc toxicity. **Journal of Fish Biology**, London, v. 35, p. 737-747, 1989.

HEATH, A. G. Water pollution and fish physiology. 2ed. **Lewis Publishers**, Boca Raton, 1995.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, n. 8, p. 51- 66, 1990.

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

JAGOE, H. C.; HAINES, T. A. Changes in gill morphology of Atlantic salmon due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environmental Pollution**, Great Britain, v.97, n. 1-2, p. 137-146, 1997.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. New York: Chapman & Hall, p. 455. 1995.

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstetrics & Gynecology**, V. 87, N. 5, p. 897 – 904, 1996.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 10-16, 2013.

LIMA, L. et al. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LOPES, D. I. S. **Toxicidade subcrônica e reprodutiva de extratos de *Buchenavia tomentosa* em ratos wistar**. 2013. 109 p. Tese de Doutorado em Ciência Animal Tropical. Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 3^o ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.2, 384p. 2009.

MAHARAJAN, A.; RAJALAKSHMI, S.; VIJAYAKUMARAN, M.; KUMARASAMY. P. Sublethal Effect of Copper Toxicity Against Histopathological Changes in the Spiny Lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). **Biological Trace Element Research**, v. 145, p. 201–210, 2012.

MARQUETE, W.T; VALENTE, M. C. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**, v. 56, n. 8, p. 1319-1332, 2005.

MAURIN, O.; GERE, J.; BANK, M. V. D. The inclusion of *Anogeissus*, *Buchenavia* and *Pteleopsis* in *Terminalia* (Combretaceae: Terminaliinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.184, p.312–325, 2017.

MELLO, G. W. S.; OLIVEIRA, D. M.; CARVALHO, C. J. S.; PIRES, L. V.; COSTAS, F. A. L.; RIET-CORREA, F.; SILVA, S. M. M. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Norte Piauiense, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.1-9, 2010.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Dev Growth Differ**, v.50, p.195-219, 2008.

NETO, R. L. S.; CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**, P. 685-700, 2014.

NIJVELDT, R.J., NOOD, E.V., HOORN D.V., BOELEN P.G., NORREN, K.V., LEEUWEN P.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p. 418 – 425, 2001.

NUNES PHM, MARTINS MCC, OLIVEIRA RCM, CHAVES MH, SOUSA EA, LEITE JRSA, VÉRAS LM & ALMEIDA FRC (2014) Gastric antiulcerogenic and hypokinetic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae). **BioMed Research International** 1: p. 1-14. 2014.

NUNES, H. M. M.; PAIVA, J. A.; RAMOS, A. T.; MAIORKA, P. C.; MARUO, M. V. Effects of *Buchenavia tomentosa* consumption on female rats and their offspring. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v.32, n.4, p. 423-429, 2010.

PELLEGRINI, E.; DIOTEL, N.; VAILLANT-CAPITAINE, C.; PÉREZ, M. R.; GUEGUEN, M.; NASRI A. , CANO, N. J.; KAH, O. Steroid modulation of neurogenesis: Focus on

radial glial cells in zebrafish. **Journal Steroid Biochem & Molecular Biology**. 10 p., 2015.

PERRY, S. F. The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v.59, p. 325-347, 1997.

PETERSON, J; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n.12, p.1995- 2018, 1998.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 512-516. 2000.

REZENDE F. M. et al., Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: **VI Botânica no Inverno** – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. 223p.

RIBEIRO, R. V., et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 205, 69-102, 2017.

RODRIGUES DA SILVA, L. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

RODRIGUES, L. P, QUEROL, E., BRACCINI, M.D.C. Descrição morfo-histológica do ovário de *Acestrorhynchus pantaneiro* (Menezes, 1992) (Teleostei, Characidae), em seus diferentes estádios de desenvolvimento, na bacia do rio uruguaí médio, Uruguai, RS. **Biodivers Pampeana**, v.3, p.11-18, 2005.

ROGERS, J. A., METZ, L., & YONG, V. W. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. **Molecular Immunology**, v. 53, n.4, p. 421–430, 2013.

SANDHAR, H.K., KUMAR, B., PRASHER, S., TIWARI, P., SALHAN, M., SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n. 1, p. 25 – 41, 2011.

SCHULTZ, Y.D.; FAVARO, L.F.; SPACH, H.L. Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae, da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, n.19, p. 65-76. 2002.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SiBBR. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. 2021. *Buchenavia tomentosa* in: **Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/buchenavia_tomentosa>.

Acesso em 07-10-2021

SILVA, T. F. et al. Products derived from *Buchenavia tetraphylla* leaves have in vitro antioxidant activity and protect *Tenebrio molitor* larvae against *Escherichia coli* induced injury. **Pharmaceuticals**, p. 13-46, 2020.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOARES, S. et al. Contribution of human oral cells to astringency by binding salivary protein/tannin complexes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 41, p. 7823- 7828, 2016.

STACE C.A. 2010. Combretaceae: *Terminalia* and *Buchenavia* with Abul-Ridha Alwan. Flora Neotropica Monograph 107. 2010.

SUWA, K.; YAMASHITA, M. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. In: BABIN, P. J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. (Ed). The fish oocyte: from basic to biotechnological applications. **Dordrecht. Springer**, p. 323-347, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 820p.
TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology normal and pathological features. 2.ed. **Kodansha: Gustav Fischer Verlag**, 1995.

TEODORO, G. R., et al. Effects of acetone fraction from *Buchenavia tomentosa* aqueous extract and gallic acid on *Candida albicans* biofilms and virulence factors. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 647, 2018.

TEODORO, G. et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-albicans. **Future Microbiology**, 10(6), p. 917-927, 2015.

TOKARZ, J et al., Zebrafish and steroids: What do we know and what do we need to know? **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v 137, p. 165-173, 2013

ULM, R.; JENKINS, G. I. Q&A: how do plants sense and respond to UV-B radiation? **BMC Biol**, v. 13: n. 45, 2015.

VARANDA E. A.; VARELLA S. D.; RAMPAZO R. A.; KITAGAWA R. R.; RADDI M. S. G.; VILEGAS W.; SANTOS L. C. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: a naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. **Toxicology In Vitro**, v. 20, n.5, p. 664, 2006.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book**. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 4th Edition. University of Oregon Press, Eugene. 2000.

ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Rima, 2006. São Carlos, SP. 478p.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, 3 P.

R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^oed. Florianópolis: Editora da UFSC. cap.23, p.577-614, 2007.

**PERFIL QUÍMICO E CROMATOGRAFIA GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSAS –
CG/MS DOS EXTRATOS DOS FRUTOS DE *Terminalia corrugata***

RESUMO

T. corrugata é uma espécie vegetal comumente encontrada nas regiões norte e nordeste do Brasil. Produz frutos entre os meses de julho a outubro, atraindo diversos animais silvestres e animais de produção, como bovinos, caprinos e ovinos. Produtores rurais relatam que após ingestão dos frutos, os animais de produção apresentaram diversos sintomas de toxicidade, dentre eles, perda de peso, focinho seco, nascimento de animais fracos e abortos. Nesta perspectiva, objetivou-se a obtenção dos extratos hexânico, acetático dos frutos maduros de *T. corrugata* para identificação química dos compostos presentes por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas – CG/MS. Foram verificadas através da triagem fitoquímica nos extratos hexânico e acetático a presença de taninos, saponinas, esteroides e triterpenoides e açúcares redutores. No extrato butanólico e aquoso, observaram-se a presença de açúcares redutores, saponinas e taninos. Através da cromatografia gasosa/espectrometria de massas, foi possível a detecção de 2 compostos na fração acetática: furfural e 5-methylhydroxyfurfural.

Palavras-chave: Frutos. Mirindiba. Extrato vegetal. Furfural. 5-methylhydroxyfurfural.

**PHYTOCHEMICAL AND GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS/MASS
SPECTROMETRY – GC/MS OF EXTRACTS OF FRUITS OF *Terminalia corrugata***

ABSTRACT

T. corrugata is a plant species commonly found in the north and northeast regions of Brazil. It produces fruits between the months of July and October, attracting several wild animals and production animals, such as cattle, goats and sheep. Rural producers report that after ingestion of the fruits, the production animals presented several symptoms of toxicity, among them, weight loss, dry muzzle, birth of weak animals and abortions. In this perspective, the objective was to obtain the hexane and acetate extracts of the ripe fruits of *T. corrugata* for the chemical identification of the compounds present by means of Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer – GC/MS. The presence of tannins, saponins, steroids and triterpenoids and reducing sugars were verified through phytochemical screening in the hexane and acetate extracts. In the butanolic and aqueous extracts, the presence of reducing sugars, saponins and tannins was observed. Through gas chromatography/mass spectrometry, it was possible to detect 2 compounds in the acetate fraction: furfural and 5-methylhydroxyfurfural.

Keywords: Fruits. Mirindiba. Plant extract. Furfural. 5-methylhydroxyfurfural.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Terminalia* é o segundo maior gênero da família Combretaceae, possuindo cerca de 240 espécies, distribuídas nas regiões tropicais da América, África, Oceania e Ásia (STACE, 2010; MAURIN et al., 2017). As filogenias do gênero, baseadas em sequências gênicas de marcadores moleculares nucleares e plastidiais, incluíram *Buchenavia* em *Terminalia* (BERGER, et al., 2016; MAURIN et al. 2017).

T. corrugata, conhecida popularmente como mirindiba, produz de flores e frutos praticamente em simultaneidade entre os meses de julho à outubro, a quantidade de frutos produzidas variam de um ano para outro para cada espécime, sendo que em determinado ano pode-se observar uma maior produção, e no ano seguinte uma produção menor (MELLO et al., 2010; FARIAS et al., 2015).

Teodoro et al. (2018) verificaram a presença dos seguintes constituintes nos extratos das folhas de *T. corrugata*: ácido gálico, ácido quínico, kaempferol, epicatequina, ácido elágico, buchenavianina, eschweilenol b, eschweilenol c, vitexina, corilagina, 1 α , 23 β – dihydroxy - 12 – oleanen – 29 – oic – ácido - 23 β – o – α – l - 4 acetilramnopiranosídeo e punicalina. Nos frutos, Batista (2011) verificou a presença de compostos fenólicos como galato de etila, galato de metila e ácido gálico; taninos hidrolisáveis como corilagina e buchenavina; lignanas em mistura de pinoresinol com epipinoresinol.

Criadores de gado, ovinos e caprinos têm sido relatado que a ingestão dos frutos pelos animais, estaria de alguma forma, associada a ocorrência de abortos (COSTA, et al., 2011; MELLO et al., 2010), pesquisas têm demonstrado que animais submetidos ao extrato dos frutos tiveram redução de peso, absorção embrionária e toxicidade sistêmica (NUNES et al., 2010; LOPES, 2013). Nesta perspectiva, são escassas pesquisas que envolvam a avaliação por meio de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/MS) afim de identificar compostos presentes nos frutos de *T. corrugata*.

Tendo em vista os relatos de toxicidade de animais de produção após o consumo dos frutos de *T. corrugata*, é essencial a elucidação dos compostos presentes nos frutos para compreensão possam estar relacionados a ocorrência de toxicidade reprodutiva. Objetiva-se a obtenção de diferentes frações dos extratos dos frutos de *T. corrugata* (hexânico e acetático) e análise química dos compostos

presentes nos extratos através da Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas – CG/MS.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal utilizado

Foram utilizados frutos maduros da *T. corrugata*, coletados entre os meses de agosto a setembro de 2022 na região rural do município de Araguaína – TO, próximo ao campus da Universidade Federal do Norte do Tocantins – UFNT, 7° 04' 45" S 48° 11' 49" W, Araguaína – TO, Brasil. Uma exsicata foi identificada e depositada no herbário registro nº: 10301, da Universidade Federal do Tocantins – UFT, *campus* de Porto nacional.

Para a coleta dos frutos, lona plástica foi colocada embaixo da árvore, para que os frutos pudessem cair sobre a lona e serem coletados no mesmo dia. Em seguida, acondicionados em caixas termo isolantes contendo gelo e encaminhados ao Laboratório Multidisciplinar de Patologia Animal da UFNT, lavados em água destilada e selecionados quanto à integridade, ausência de doenças e fragmentos de areia, folhas e gravetos, a casca e a polpa foram retiradas manualmente e percolados em álcool 96% por 10 dias ao abrigo de luz, posteriormente, a solução foi filtrada e armazenada em freezer (-20 °C) até utilização.

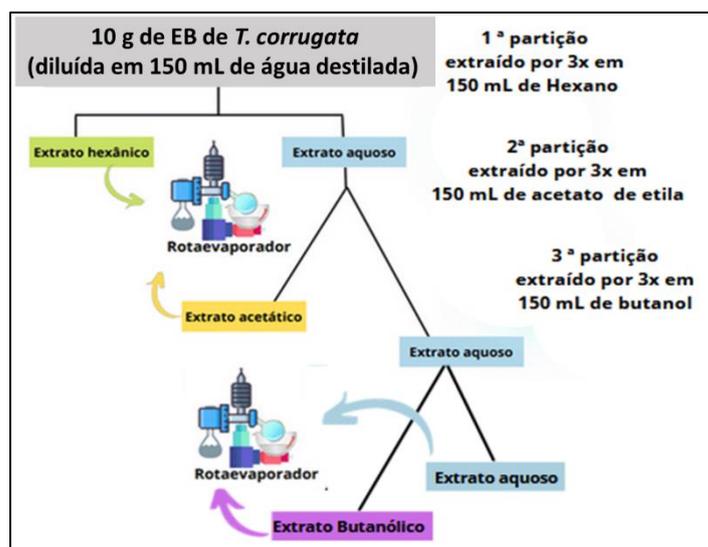
2.2 Triagem fitoquímica

Após obtenção do EB dos frutos, ocorreu o particionamento por polaridade de solventes conforme (LOPES, 2013). Para isso, 10 g do EB foi diluído em 150 mL de água destilada e submetido a sucessivas partições com hexano, acetato de etila e álcool butílico de acordo com o gradiente crescente de polaridade.

Para a obtenção da solução hexânico, acetática e butanólica o EB diluído em água (150 mL) foi particionado 3x em balão de separação com 150 mL contendo hexano, em seguida o extrato hidroalcolico foi lavado 3x em acetato de etila e posteriormente, lavado por 3x em álcool butílico. Procedeu-se a rotaevaporação por pressão reduzida para obtenção dos extratos hexano, acetático, butanólico e aquoso (figura 1). Em seguida cada extrato foi submetido a triagem fitoquímica detecção de alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas,

esteroides e açúcares por meio de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substância (FALKENBERG M. B. et al. 2007; MATOS, F. J. 1997).

Figura 1– Modelo esquemático da sequência do particionamento por polaridade de solventes EB *T. corrugata*.



Fonte: Autora.

2.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas – CG/MS

Uma amostra do extrato acetático foi encaminhada para o Laboratório Central Analítica (LABCROM) da Universidade Federal do Norte do Tocantins *campus* Araguaína, Brasil. A técnica de CG-MS foi utilizada neste estudo para separar e identificar os fitocomponentes presentes nos extratos. Primeiramente 10 mg do extrato acetático foram diluídos em 2,00 mL de hexano. Posteriormente, cada amostra foi injetada pelo modo splitless o volume de 1 μ L (90:1) em cromatógrafo a gás Agilent Technologies (5977B – MSD). A qual a fase móvel continha um fluxo de gás hélio equivalente a 1,2 mL/min e a fase estacionária da coluna foi HP-5MS 5% phenyl methyl silox, acoplado a um detector de massas. Foi utilizada uma coluna cromatográfica de 30m x 0,25mm e pressão constante de 9,7853 psi. Para que houvesse uma melhor separação dos compostos, foi utilizada uma rampa única de temperatura na coluna cromatográfica, constituindo da seguinte programação: o forno foi mantido inicialmente a 50 °C por 1 minuto e, em seguida, aquecido a uma taxa de 3 °C/min até 180 °C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Triagem fitoquímica

Na tabela 1, estão apresentados os resultados da triagem fitoquímica para os extratos hexânico, acetático, butanólico e aquoso. Observou-se presença de esteroides e triterpenoides no extrato hexânico. No extrato acetático detectou-se a presença de taninos, saponinas, esteroides e triterpenoides e açúcares redutores. No Extrato Butanólico e aquoso, observaram-se a presença de açúcares redutores, saponinas e taninos.

Tabela 1 – Prospecção química dos extratos dos frutos de *T. corrugata*.

Classes de metabólito pesquisada	Extratos de <i>T. corrugata</i>			
	Hexânico	Acetático	Butanólico	Aquoso
Alcaloides	-	-	-	-
Açúcares redutores	-	+	+	+
Açúcares não redutores	-	-	-	-
Esteroides e triterpenoides	+	+	-	-
Flavonoides	+	+	-	-
Polissacarídeos	-	-	-	-
Saponinas	-	+	+	+
Taninos	-	+	+	+

Nossos resultados corroboram os de Lopes (2013) que ao avaliar as classes dos metabólitos secundários presentes na *B. tomentosa* (sin. *T. corrugata*) constatou a presença dos mesmos metabólitos e, adicionalmente flavonoides. Ferreira et al. (2017) verificaram que na avaliação fitoquímica *Buchenavia* sp., os metabólitos secundários predominantes no extrato etanólico bruto e suas frações foram os fenóis simples, leucoantocianidinas (polifenóis naturais), flavanonas (classe dos flavonoides) e triterpenos pentacíclicos, diferentemente dos resultados obtidos.

Algumas destas substâncias podem atuar como fitoestrógenos ou fitoesteróides, desempenhando atividades semelhantes aos hormônios naturais, e quando ingeridos por um determinado organismo podem alterar o funcionamento do sistema endócrino (GHISELLI; JARDIM, 2007; LEYVA et al., 2011). Muitos destes componentes extraídos de plantas já demonstraram ter ação tóxica, como por exemplo, compostos tânicos, como o ácido gálico, pode induzir alterações metabólicas em ratos (SHI et al., 2013), a presença deste composto já foi relatado em

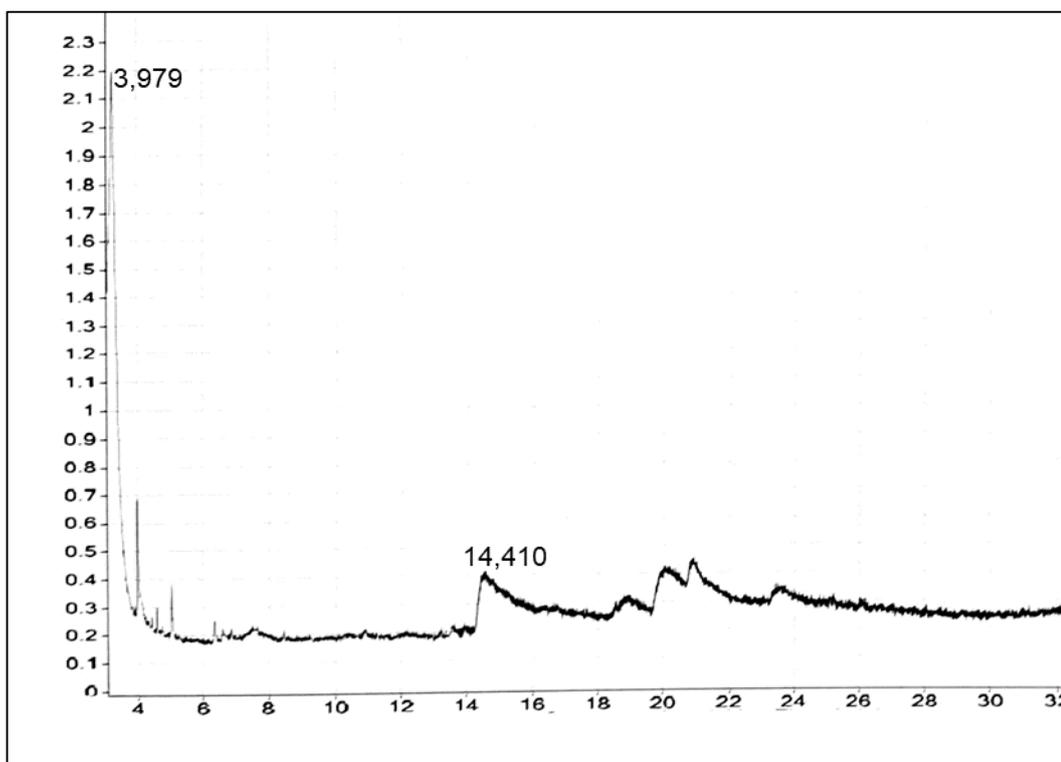
T. catappa, *T. sericea* (MARRERO DELANGE; MORALES RICO, 2016; DIQUE; SERRANO; SILVA, 2019).

Nas plantas, os flavonoides exercem funções como: proteção contra radiação UV, proteção contra microrganismos e inibição enzimática (NIJVELDT et al., 2001). Em geral, são conhecidos como os principais responsáveis pela ação antioxidante porém podem apresentar toxicidade, incluindo hepatotoxicidade, toxicidade reprodutiva e atuar como fitoestrógeno (RODRIGUES DA SILVA et al., 2015; SANIN; GÓMEZ; MORALES, 2010).

3.2 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas - CG/MS

A análise CG-MS foi avaliada para determinar a presença de possíveis compostos bioativos, na figura 2 está apresentada o cromatograma do extrato acetático dos frutos maduros da *T. corrugata*.

Figura 2 – Cromatograma (CG/MS) da fração acetática dos frutos de *T. corrugata*.



Fonte: autora.

Na tabela 2, estão apresentados os compostos detectados por CG/MS no extrato acetático dos frutos de *T. corrugata*, a fórmula molecular, o peso molecular, o

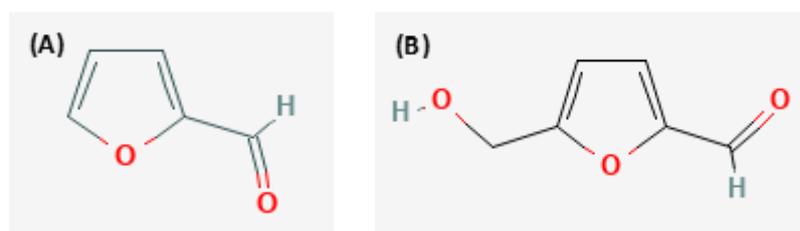
tempo de retenção e a probabilidade em porcentagem de semelhança com o furfural e 5-methyhydroxyfurfural conforme banco de dados do espectrômetro de massas.

Tabela 2 - Compostos presentes no extrato acetático dos frutos de *T. corrugata* caracterizado por análise CG-MS.

Nº	Nome do composto	Fórmula molecular	Peso molecular	Tempo de retenção (min)	Prob. %
1	Furfural	C ₅ H ₄ O ₂	96,0211	3,979	64,3
2	5-methyhydroxyfurfural	C ₆ H ₆ O ₃	126,0316	14,410	26,4

Na figura 3, estão demonstrados a estrutura química do furfural e 5-Hydrimethylfurfural. A presença destes compostos também foram verificadas em *Terminalia chebula*, (GYAWALI; KIM, 2010), e nas folhas e frutos de *T. arjuna*, sendo que estavam presentes em maior quantidade nos frutos (BANO et al., 2020).

Figura 3 – Estrutura química do furfural (A); estrutura química do 5-hydroxymethylfurfural (B).



Fonte: National Center for Biotechnology Information, Pubchem. (Acesso: 24 de abril de 2023).

Furfural (C₅H₄O₂), é um aldeído heterocíclico e aromático, conhecido também como 2-furancarboxaldehyde, 2-furaldehyde, fural, 2-furylmethanal. 5-methyhydroxyfurfural (C₆H₆O₃) ou 5-HMF, furaldehyde, 5-(hydroxymethyl), hydroxymethylfurfuralaldehyde, é um aldeído e um composto furano formado durante a decomposição térmica de açúcares e carboidratos (MESIAS-GARCIA et al., 2010). Estudos sobre a toxicidade do furfural e 5-HMF em animais e células já foram realizados e os resultados demonstram atividade tóxica (BAKHIYA et al., 2009; ZURIAGA et al., 2019; JIANG et al., 2022).

As pesquisas que envolvem a *T. corrugata* geralmente relacionam os frutos e folhas a propriedades farmacológicas. A presença de aldeídos, pode ser um dos prováveis motivos dos efeitos tóxicos relatados. Adicionalmente, é necessário avaliar a presença de outros compostos que também possam estar relacionados a toxicidade, a utilização de outras técnicas de avaliação química para a estimar a presença destes

compostos pode ser eficaz, pois amplia a possibilidade de detecção de metabólitos que não foram possíveis verificar através da cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Teodoro e colaboradores (2015 e 2018) verificaram a presença de ácido gálico, kaempferol, epicatequina, ácido elágico, vitexina e corilagina nas folhas de *T. corrugata*. Adicionalmente, Batista (2011) verificou nos frutos de *T. corrugata* ácido gálico; corilagina e buchenavina, lignanas em mistura de pinoresinol com epipinoresinol. Os fatores edafoclimáticos do ambiente podem influenciar a morfofisiologia das plantas e, conseqüentemente, promovem alterações nos metabólitos secundários (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

4 CONCLUSÕES

Os compostos químicos verificados nesta o pesquisa através do CG/MS sugerem a presença de furfural e o 5-hydroxymethylfurfural já relatados anteriormente em outras espécies e demonstrando efeito tóxico em animais.

5 REFERÊNCIAS

- BAKHIYA, N.; MONIEN, B.; FRANK, H.; et al., Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate cellular accumulation of 5-sulfooxymethylfurfural, a reactive and nephrotoxic metabolite of Maillard's product 5-hydroxymethylfurfural. **Bioquim. Pharmacol.**, v.78. p.414 – 419, 2009.
- BANO, S.; INTISAR, A.; RAUF, M. et al Comparative analysis of oil composition and antibacterial activity of aerial parts of *Terminalia arjuna* (Roxb.) **Natural Product Research**, V. 34, N. 9, p.1311–1314, 2020.
- BATISTA, A. L. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicalar dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchenavia Tomentosa* – Eichler (Combretaceae) e *Ourateaspectabilis* Aubl. (Ochnaceae)**. 2011. 176p. Tese de Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.
- BERGER B.A.; KRIEBEL R.; SPALINK D.; SYTSMA, K.J. Divergence times, historical biogeography, and shifts in speciation rates of Myrtales. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, V.95, P. 116–136 2016.
- COSTA, A. M. D. et al. Plantas tóxicas de interesse pecuário em região de ecótono amazônia e cerrado. Parte II. Araguaína, Tocantins. **Acta Veterinária Brasilica**, v.5, n.3, p.317-324, 2011.
- DIQUE, A. S.; SERRANO, R. M. O. T. S.; SILVA, O. M. D. Avaliação da atividade antimalárica e estudo da composição química do extrato de *Terminalia sericea* raiz. **Rev Bras Plantas Med / Braz J Med Plants** v21, p.269-277, (2019).

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMOES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Florianópolis, 6^o ed. Editora da UFSC. cap.10, p. 229-245, 2007

FARIAS J. et al. Seed dispersal and predation of *Buchenavia tomentosa* Eichler (Combretaceae) in a Cerrado sensu stricto, midwest Brazil. **Brazilian Journal Biology**, v. 75, n. 4, suppl. 1, p. 88-96, 2015.

FERREIRA, M. D. S.; et al. Avaliação fitoquímica e toxicológica dos extratos do fruto de *Buchenavia* sp. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n.2, p. 17-22, 2017.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F.. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, v. 30, n. Quím. Nova, 2007 30(3), p. 695–706, maio 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30. n.2, p.374-381, 2007.

GYAWALI, R.; KIM, K. Bioactive volatile compounds of three medicinal plants from nepal. **Kathmandu University Journal Of Science, Engineering And Technology**. v. 8, N. I, p. 51-62, 2012.

JIANG, U., ZHONG, Z.; WANG, W.; et al. 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde induces developmental toxicology and decreases bone mineralization in zebrafish larvae, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 254, 2022.

LEYVA, E., et al. Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. **Bol. Soc. Quím. Méx.** Ciudad de México, v.5, n. 1,2,3, p.35-43, 2011.

LOPES, D. I. S.; MAIA, N. J. R.; CASTRO, L. S.; et al. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE AMOSTRAS DE RATAS WISTAR TRATADAS COM O EXTRATO BRUTO DE *Buchenavia tomentosa*. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, (supl.2) RESUMO 077, 2013.

MARRERO DELANGE, D.; MORALES RICO, C. L. Identificación de ácidos polifenólicos en el extracto metanólico de las hojas de *Terminalia catappa* Linn. **Rev Cubana Plant Med**, Ciudad de la Habana , v. 21, n. 2, p. 223-233, 2016 .

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2^o ed. Fortaleza: Edições UFC, 141 p. 1997.

MAURIN, O.; GERE, J.; BANK, M. V. D. The inclusion of *Anogeissus*, *Buchenavia* and *Pteleopsis* in *Terminalia* (Combretaceae: Terminaliinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.184, p.312–325, 2017.

MELLO, G. W. S. et al. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Norte Piauiense, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.1-9, 2010.

NUNES, H. M. M.; PAIVA, J. A.; RAMOS, A. T.; MAIORKA, P. C.; MARUO, M. V. Effects of *Buchenavia tomentosa* consumption on female rats and their offspring. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v.32, n.4, p. 423-429, 2010.

RODRIGUES DA SILVA, L.; MARTINS, L. D. V.; Bantim, F. C. I.; Meireles de Deus, M. D. S.; Ferreira, P. M. P.; Peron, A. P. Flavonóides: constituição química, ações.

SANIN, Y. Y. L.; GÓMEZ, M. T. G.; MORALES, A. M. T. Efectos de los fitoestrógenos em la reproducción animal. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v. 63, n. 2, p. 5555-5565, 2010.

STACE C.A. 2010. Combretaceae: *Terminalia* and *Buchenavia* with Abul-Ridha Alwan. Flora Neotropica Monograph 107. 2010.

TEODORO, G. R. et al. Effects of acetone fraction from *Buchenavia tomentosa* aqueous extract and gallic acid on *Candida albicans* biofilms and virulence factors. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2018.

TEODORO, G. R.; BRIGHENTI, F. L.; DELBEM, A. C. .B et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-albicans. **Future Microbiol.** V.10, N.6, P. 917–927 2015.

ZURIAGA, E; GINER, B.; VALERO, M. S.; et al., QSAR modelling for predicting the toxic effects of traditional and derived biomass solvents on a *Danio rerio* biomodel, **Chemosphere**, V 227, 2019.

HISTOPATOLOGIA DAS BRÂNQUIAS, FÍGADO E RIM DO *Danio rerio* EXPOSTO AO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE *Terminalia corrugata*

RESUMO

Terminalia corrugata (família Combretaceae) é uma árvore típica do Brasil conhecida popularmente como mirindiba. Produtores rurais, criadores de ruminantes relatam que a ingestão dos frutos pelos animais, estaria associada de alguma forma a intoxicações. Objetivaram-se avaliar a CL_{50-96H} e os efeitos histopatológicos que a exposição ao extrato bruto (EB) dos frutos de *Terminalia corrugata* podem causar nas brânquias fígado e rim do *Danio rerio* como modelo animal. Os animais adultos foram previamente submetidos ao ensaio para estimativa da CL_{50-96H} , divididos em aquários com nove concentrações diferentes (controle, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1.000, 10.000 e 100.000 $mg.L^{-1}$, $n=15$). Em seguida, ocorreu outro ensaio para avaliação histopatológica, onde os peixes foram submetidos por 21 dias a concentrações abaixo da CL_{50-96H} (controle, 10 e 100 $mg.L^{-1}$). A CL_{50-96H} estimada foi de 774 $mg.L^{-1}$. Não houve alterações nos parâmetros físico-químicos da água que pudessem comprometer os resultados com os peixes. Não houve redução significativa no peso dos animais durante os ensaios. Em relação a histopatologia, ocorreram lesões significativas que comprometem as funções das brânquias, fígado e rim dos animais expostos ao EB dos frutos da *T. corrugata* durante 21 dias de exposição. Desta forma, verifica-se que mesmo em concentrações mais baixas, o EB pode causar lesões nos órgãos dos animais.

Palavras-chave: Combretaceae. *Buchenavia tomentosa*. Toxicidade. Histologia. *Danio rerio*.

HISTOPATHOLOGICAL OF THE GILLS, LIVER AND KIDNEY OF *Danio rerio* EXPOSED TO THE RAW EXTRACT OF THE FRUITS OF *Terminalia corrugata*

ABSTRACT

Terminalia corrugata (Combretaceae family) is a typical tree from Brazil popularly known as mirindiba. Rural producers ruminants reported that the ingestion of fruits by animals would be associated in some way with poisoning. The objective was to evaluate the CL50-96H and the histopathological effects that exposure to the crude extract (EB) of *Terminalia corrugata* fruits can cause in the gills, liver and kidney of *Danio rerio* as an animal model. The adult animals were previously submitted to the test to estimate the LC50-96H, divided into aquariums with nine different concentrations (control, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000, 10,000 and 100,000 mg.L⁻¹, n=15). Then, another test for histopathological evaluation took place, where the fish were submitted for 21 days to concentrations below the CL50-96H (control, 10 and 100 mg.L⁻¹, n=30). The estimated LC50-96H was 774 mg.L⁻¹. There are no alterations in the physical-chemical parameters of the water that could compromise the results with the fish. There was no significant reduction in the animals' weight during the tests. Regarding histopathology, there were significant lesions that compromised the functions of the gills, liver and kidney of animals exposed to EB from *T. corrugata* fruits during 21 days of exposure. Thus, it appears that even at lower concentrations, EB can cause damage to the organs of animals.

Keywords: Combretaceae. *Buchenavia tomentosa*. Toxicity. Histology. *Danio rerio*.

1 INTRODUÇÃO

Terminalia corrugata (família Combretaceae) é uma árvore típica da região de cerrado, floresta semidecídua, mata ciliar, e também é encontrada em florestas neotropicais, atlânticas e caatinga, conhecida popularmente como mirindiba, embirdiba, tarumarana ou tanimbuca (NETO; CORDEIRO; LOIOLA, 2014). No Brasil, está distribuída nos estados do Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia e Minas Gerais (LORENZI, 2002). Algumas partes do vegetal são utilizadas na medicina popular, as folhas, por exemplo, são usadas para preparo de chá como antihiperlipidêmicas e anorexígenas e a casca no tratamento de tosse, (LORENZI, 2009) há também relatos da utilização das flores e frutos por comunidades ribeirinhas no tratamento do colesterol alto, diabetes e hipertensão (RIBEIRO et al., 2017).

Produtores de animais ruminantes relatam que a ingestão de frutos da *T. corrugata* estaria de alguma forma associada à ocorrência de abortos, diarreia, focinho seco, fraqueza, perda de peso, nascimento de animais fracos e até a morte de animais (COSTA, et al., 2011; MELLO et al., 2010). Pesquisas com os frutos de *T. corrugata* tem demonstrado efeito tóxico como a redução do peso materno e reabsorção embrionária em ratos Wistar, além de perda de peso em filhotes machos, retardo no desenvolvimento físico e toxicidade sistêmica (LOPES, 2013; NUNES et al., 2010).

O Zebrafish (*Danio rerio*) conhecido popularmente no Brasil como Paulistinha, é um pequeno peixe teleósteo de água doce, medindo cerca de 4 cm de comprimento, pertencente à família Cyprinidae. Atualmente o zebrafish tem sido utilizado como modelo animal em substituição a ratos de laboratório, tendo em vista os princípios dos 3 Rs (substituição, redução e refinamento; do inglês “replacement, reduction, and refinement”), em várias áreas de pesquisas como biologia do desenvolvimento, toxicologia, farmacologia, biologia da evolução, nanotecnologia e nanomedicina, doenças humanas entre outros (CANEDO; ROCHA, 2021; CAVALCANTE et al., 2017; GUO et al., 2017; ROPER; TANGUAY, 2018;). Tendo-se demonstrado eficiente, pois possui alta similaridade genética com ratos e humanos (85 e 70 % de similaridade respectivamente), além da redução nos custos financeiros e espaços para manutenção dos animais (HOWE, 2013).

A avaliação histopatológica de órgãos alvos permite verificar as lesões provocadas devido a exposição a um agente tóxico (MAHARAJAN et al., 2012; BENZE, 2013). Tendo em vista os relatos de toxicidade provocados pelos frutos de *T.*

corrugata em animais de produção, é essencial pesquisas que avaliem o potencial de toxicidade dos frutos, especificamente os efeitos histopatológicos em órgãos alvo, haja vista que, muitos componentes secundários extraídos das plantas demonstraram ter ação tóxica podendo afetar as funções destes. Dessa forma, objetivou-se avaliar os efeitos histopatológicos que a exposição ao EB pode causar nas brânquias fígado e rim no zebrafish (*Danio rerio*).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Tocantins - UFT (número do protocolo: 23.101.002.349/2020-03).

2.1 Coleta dos frutos

Os frutos maduros da *T. corrugata* foram coletados em Agosto de 2022 na região rural do município de Araguaína – TO, próximo ao campus da Universidade Federal do Norte do Tocantins – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Araguaína – TO. Uma exsicata foi identificada e depositada no herbário registro nº: 10301, da Universidade Federal do Tocantins – UFT, *campus* de Porto nacional.

Uma lona foi colocada em baixo da árvore para que os frutos pudessem cair sobre ela possibilitando a coleta de frutos rescem caídos, haja vista que, eram coletados diariamente no início da manhã e final da tarde, até que se obtivesse quantidade suficiente para os experimentos. Os frutos foram acondicionados em caixas termo isolantes contendo gelo e encaminhados ao Laboratório Multidisciplinar de Patologia Animal/UFNT. Posteriormente, foram lavados em água destilada e selecionados quanto à integridade, ausência de doenças e fragmentos de areia, folhas e gravetos. A casca e a polpa do fruto foram percolados durante 10 dias em solução etanólica (99%). Ao término desse período, o material foi filtrado e rotaevaporado sob pressão reduzida (Fisatom Mod. 801) a uma temperatura máxima de 43 °C para a obtenção do extrato bruto (EB). O EB foi pesado em balança analítica e o seu rendimento calculado considerando a massa do extrato obtida após a rotaevaporação do solvente e a massa inicial do material vegetal. Após a rotaevaporação o EB foi congelado e armazenado em freezer até o início das experimentações com os peixes.

2.2 Determinação da CL_{50-96H}

D. rerio adultos foram aclimatados por 30 dias em caixa de água de polietileno com capacidade de 100L, dotada de sistema de filtração de água, alimentados 3x ao dia. Posteriormente foram acondicionados em aquários de vidro com volume de 10 litros e sistema de aeração artificial promovido por aeradores específicos.

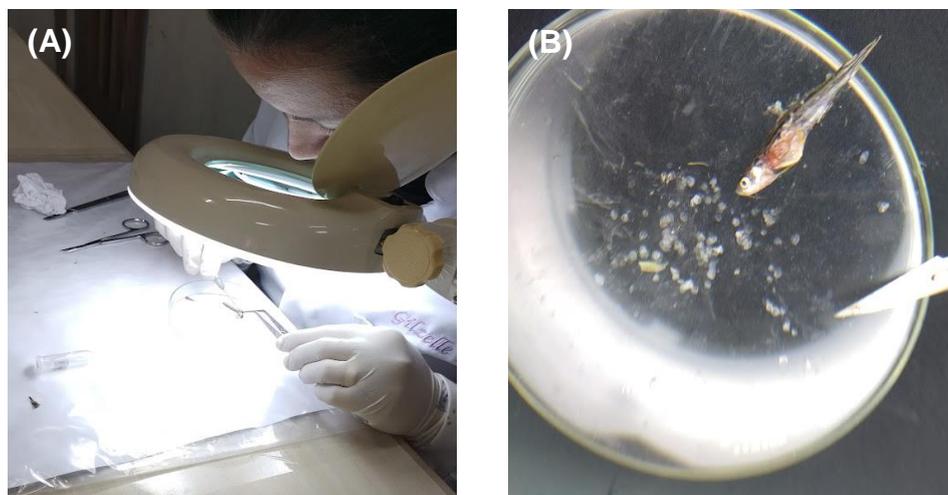
Para determinação da CL_{50-96H}, o extrato bruto dos frutos de *T. corrugata* foi pesado em balança analítica (Shimadzu AUY 220, min 10 mg, máx. 220 g), os animais foram divididos em nove concentrações: grupo controle, 0,01 mg.L⁻¹ + solução de Tween 80 (1%), 0,1 mg.L⁻¹ + Tween 80 (1%), 1 mg.L⁻¹ + Tween 80 (1%), 10 mg.L⁻¹ + Tween 80 (1%), 100 mg.L⁻¹ + Tween 80 (1%), 1.000 mg.L⁻¹ + Tween 80 (1%), 10.000 mg.L⁻¹ + Tween 80 (1%), 100.000 mg.L⁻¹ + Tween 80 (1%), contendo 5 animais por aquário e 3 repetições para cada tratamento (n=15/tratamento). Todos os aquários contaram com aeração artificial, houve um ciclo claro-escuro (14 horas de claro e 10 horas de escuro) e análise dos parâmetros físico-químicos da água. Os animais permaneceram em jejum (96H). Diariamente os peixes mortos foram retirados dos aquários e contabilizados, considerou-se a morte quando o animal não apresentava batimento opercular.

2.3 Avaliação histopatológica 21 dias de exposição

Para a avaliação histopatológica, os peixes foram expostos durante 21 dias ao EB, as concentrações utilizadas foram aquelas nas quais causaram mortalidade inferior a CL_{50-96H}: grupo controle, 10 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹. Cada tratamento contou com 30 animais, divididos igualmente em 3 aquários, sendo que em cada aquário haviam 5 machos e 5 fêmeas e também ocorreu um ciclo claro-escuro (14 horas de claro e 10 horas de escuro). As características físico-químicas da água: pH, O₂, amônia tóxica e temperatura, foram analisadas diariamente.

No 21º dia de experimento, os animais foram anestesiados com 100 mg.L⁻¹ de triclaína e 300 mg.L⁻¹ de NaHCO₃, adicionado para neutralizar o pH da água, pois a solução de anestésico é ácida, isto promoveu eficácia anestésica evitando acidemia metabólica (BROWN, 2011) e submetidos a eutanásia por secção medular, em seguida o fígado, o rim e a cabeça contendo as brânquias foram coletadas com auxílio de uma lupa (figura 1).

Figura 1 – Eutanásia dos animais e coleta dos órgãos. (A) utilização da lupa para coleta dos órgãos; (B) *D. rerio* exemplificando a coleta, em que se remove a pele/músculos lateralmente, afim de expor os órgãos para facilitar a coleta.



Fonte: autora.

Os tecidos foram fixados em boin por 12 horas, lavados em água corrente por 24 horas e adicionado álcool 70%. Posteriormente foram clivados e submetidos ao processamento histológico por uma série alcoólica de desidratação (álcool 70%, 80%, 90%, 95% e Absoluto I e II), diafanizados em xilol e incluídos em parafina histológica, seccionados à 5 μm de espessura em micrótomo manual (Leica RM 2125RT). Seguiu-se a montagem das lâminas e coloração com hematoxilina e eosina para análise em microscópio de luz Leica com uma câmera acoplada (Modelo: ICC50 HD), aumento de 400x.

A avaliação histopatológica das brânquias, fígado e rim foram realizadas conforme a metodologia proposta por Bernet et al. (1999) e adaptado por Paulino et al. (2020). As análises consistiram em avaliar 25 campos amostrais aleatórios do tecido, dispostos em 5 diferentes secções histológicas, a qual determinará a frequência de ocorrência de cada lesão. Dessa forma, considerou-se primeiramente a frequência de ocorrência, em que, 0 indica a ausência de cada lesão; 0+ indica de 1 a 5 ocorrências de cada lesão (frequência rara); + é de 6 à 10 ocorrências de cada lesão (pouco frequente); ++ é de 11 à 15 ocorrências de cada lesão (frequência moderada); +++ é de acima de 16 ocorrências de cada lesão (frequência severa). Esta frequência foi traduzida em um escore numérico (Sc), atribuindo-se um valor numérico conforme representado na tabela 1.

Tabela 1- Distribuição da ocorrência de lesões individuais em frequência de ocorrência (adaptado: PAULINO, et al. 2020).

	Ocorrência da lesão 25 campos / 5 cortes	Símbolo	Escore numérico (Sc) atribuído
Patologia A	0 vezes	A	0
Patologia B	1 a 5 vezes	0+	1
Patologia C	6 a 10 vezes	+	2
Patologia D	11 a 15 vezes	++	3
Patologia E	16 a 20 vezes	+++	4

Ausência de lesões (A); frequência rara(0+); pouca frequência (+); frequência moderada (++); frequência severa (+++).

Para as análises histopatológicas que indicam as consequências de cada patologia no órgão, atribuiu-se a aplicação do índice de alterações individuais (I_{ALT}) da lesão. Considerou-se também o fator de importância (Fi) segundo Bernet et al. (1999), que reflete na relevância da lesão de acordo com sua importância patológica (Tabela 2), onde: (1) representa lesões facilmente reversíveis e com mínima importância patológica; (2) lesões reversíveis quando o agente estressor é neutralizada e então, moderada importância patológica; (3) lesões geralmente irreversíveis e de extrema importância patológica.

Tabela 2– Classificação das alterações histopatológicas do órgão e fator de importância (Fi) em relação ao órgão e organismo, de acordo com Bernet et al (1999). 1 = mínima importância patológica; 2 = moderada importância patológica e 3 = extrema importância patológica.

Alterações em brônquias	Fi
Aneurisma (canal marginal apical e basal e redes capilares)	2
Atrofia celular	1
Células pilares (constricção/rupturas/dilatação do canal marginal)	1
Alterações circulatórias (congestão/hiperemia/hemorragia)	1
Hipertrofia do epitélio lamelar	1
Descolamento epitélio lamelar e edemas	1
Fusão parcial de lamelas	2
Fusão total de lamelas	2
Hiperplasia do epitélio	1
Necrose celular (focal/total)	3
Ruptura do epitélio	2
Alterações em fígado	Fi
Acúmulo de substâncias intracelulares	1
Alterações nucleares	2
Alterações na arquitetura hepática	1
Aneurisma	1
Atrofia	2
Centro de melanomacrófagos	1
Degeneração celular	1
Fibrose	2
Hemorragia	1
Hipertrofia dos hepatócitos	1
Hiperemia (sinusóides)	1
Necrose (focal/total)	3
Alterações em Rim	Fi
Acúmulos de substâncias intracelulares	1

Atrofia (túbulos e glomérulos)	2
Alterações da arquitetura renal	1
Alterações na estrutura celulares	1
Alterações nucleares do epitélio renal	2
Alterações do tecido intersticial	1
Alterações circulatórias (hemorragia e hiperemia)	1
Aneurismas	1
Hipertrofia dos glomérulos	1
Hipertrofia dos túbulos	1
Hiperplasia dos túbulos (oclusão tubular)	2
Hiperplasia dos glomérulos	2
Necrose (focal/total)	3

Dessa forma, levando em consideração o escore de distribuição e o fator de importância, para cada alteração, a construção do I_{alt} será multiplicando o Sc e o Fi que reflete a grau da lesão ao órgão. Após isso, será calculado o Índice de Lesão do Órgão (I_{org}) baseado na somatória do I_{ALT} , na qual representa o comprometimento morfofuncional do órgão, frente inúmeras lesões, conforme expressos abaixo (PAULINO et al., 2020):

$$I_{ALT} = Fi \times Sc$$

$$I_{org} = \sum I_{alt}$$

2.4 Análise Estatística

Os valores da CL_{50-96h} foram calculados pelo método Trimmed Sperman Karber (HAMILTON et al., 1977). Para análise estatística, os dados são exibidos como a média \pm erro padrão. Foi realizada Análise de Variância ANOVA (Teste de Dunnett) para os dados paramétricos, e valores que não apresentaram distribuição normal foram submetidos a uma análise não paramétrica (Kruskal-Wallis com Teste de Dunn) usando o software estatístico GraphPad Prism v. 5.00 para Windows, onde probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da CL_{50-96H}

Foram coletados 10,357 kg de frutos maduros de mirindiba e após separação das sementes obteve-se 7,45 kg de polpa e casca. O rendimento do EB dos frutos frescos sem semente foi de 15,3%. Na tabela 3, estão demonstrados os parâmetros

físico-químicos da água: pH, O₂, amônia tóxica e temperatura, durante o período experimental (96 horas) não foram observadas diferenças.

Tabela 3– Parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental para determinação da CL_{50-96H} (média ± desvio padrão).

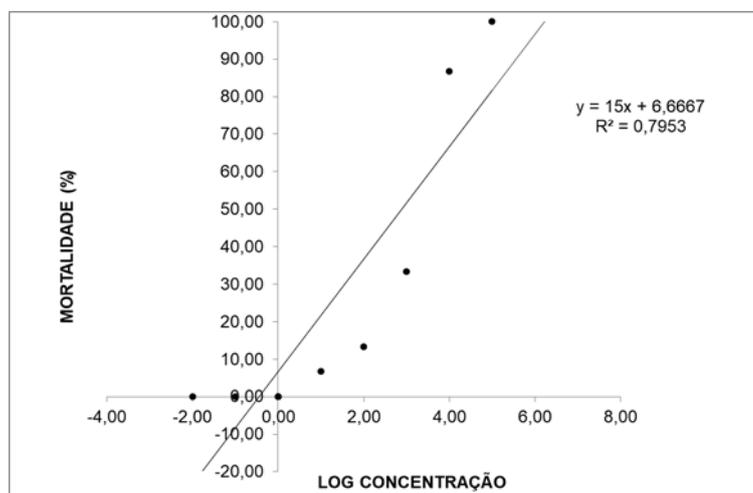
96 horas exposição dos peixes ao EB	pH	O ₂ (ppm)	Amônia (ppm)	Temperatura °C
Controle	7,3 ± 0,2	11	0	25,2 ± 0,3
Controle Tween	7,1 ± 0,1	11	0	25,0
0,01 mg.L ⁻¹	7,1 ± 0,1	11	0	25,0
0,1 mg.L ⁻¹	6,8 ± 0,1	11	0	24,9 ± 0,3
1 mg.L ⁻¹	6,8 ± 0,3	11	0,002 ± 0,004	24,9 ± 0,3
10 mg.L ⁻¹	6,7 ± 0,3	11	0,006 ± 0,004	24,9 ± 0,3
100 mg.L ⁻¹	6,7 ± 0,3	11	0,004 ± 0,004	24,9 ± 0,3
1.000 mg.L ⁻¹	6,7 ± 0,3	11	0,002 ± 0,004	24,9 ± 0,3
10.000 mg.L ⁻¹	6,7 ± 0,3	11	0,005 ± 0,004	25,0
100.000 mg.L ⁻¹	6,7 ± 0,3	11	0,004 ± 0,005	25,1 ± 0,3

*Teste Dunet, p < 0,05.

Claudiano e colaboradores (2012) observaram diminuição significativa na concentração de oxigênio dissolvido e pH da água dos aquários tratados com extrato aquoso de *Terminalia catappa*, onde o extrato provocou alteração nestes parâmetros, influenciando a mortalidade dos peixes guaru (*Phalloceros caudimaculatus*) durante o período experimental, dificultando relacionar a mortalidade dos animais ao efeito tóxico do extrato, pois a mortalidade também está ligada a baixa concentração de oxigênio na água e redução do pH. Neste trabalho, os parâmetros avaliados (pH; O₂; amônia e temperatura), se mantiveram estáveis em todo o período de exposição, e dentro dos limites aceitáveis (LIMA, et al. 2013). Desta forma, as mortalidades observadas, estão relacionadas ao efeito tóxico do extrato presente na água.

Em relação as mortalidades dos peixes durante a CL_{50-96H} observaram-se 100% de mortalidade tratamento com maior concentração do EB: 100.000 mg.L⁻¹, 86,7% de mortalidade no tratamento com 10.000 mg.L⁻¹ de EB, 33,3% de mortalidade no tratamento com 1.000 mg.L⁻¹ de EB, 13,3% de mortalidade no tratamento com 100 mg.L⁻¹ de EB e 6,7% de mortalidade no tratamento com 10 mg.L⁻¹ de EB. Não foram observadas mortalidades para o grupo controle, controle tween, 0,01 mg.L⁻¹, 0,1 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹. A CL_{50-96H} do EB de *T. corrugata* determinada para o zebrafish foi de 774 mg.L⁻¹. A equação linear, que representa a relação concentração-resposta do EB de *T. corrugata*, está apresentada na figura 2 como o logaritmo das concentrações x mortalidade.

Figura 2– Mortalidade dos peixes (*D. rerio*) x logaritmos das concentrações do EB *T. corrugata*.



Fonte: autora.

Não existem dados publicados sobre a CL_{50-96H} do extrato de *T. corrugata* em peixes. Em comparação a outra espécie, Lopes (2013) ao analisar os extratos (*Buchenavia tomentosa* sin. *T. corrugata*): hexânico (CL_{50-96H} 14,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), acetático (CL_{50-96H} 6,93 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), butanólico (CL_{50-96H} 0,14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e aquoso (CL_{50-96H} 0,09 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) frente a *Artemia salina*, verificou que a planta possui alta toxicidade, pois a co-relação é de tal forma que a $CL_{50} < 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na *Artemia* corresponderia na DL_{50} entre 100 e 1000 mg/kg em ratos.

YUNUS *et al.* (2019) verificaram que a CL_{50-96H} do extrato das folhas de *T. catappa* em *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) foi de 900 mg.L^{-1} , comparativamente *T. corrugata* apresentou maior toxicidade em *D. rerio*. Menezes *et al.* (2020) verificaram que a CL_{50-96H} do extrato aquoso das folhas de *T. catappa* para *Colossoma macropomum* (tambaqui) foi de 410 mg.L^{-1} , apresentou maior toxicidade do que o verificado neste trabalho, demonstrando que, os efeitos podem estar relacionados a espécie vegetal, pois apesar de pertencerem ao mesmo gênero, podem apresentar variações nos compostos presentes nas diferentes partes da planta, além disso, pode-se apresentar variações com a espécie animal utilizado no ensaio e a idade destes.

Durante a exposição dos animais por 96 horas, não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais ($p < 0,05$). O peso médio dos animais estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 – Média de peso (gramas) do *D. rerio* submetidos a 96 horas de exposição ao EB de *T. corrugata* (média \pm desvio padrão).

96 horas exposição dos peixes ao EB	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
Controle	0,177 \pm 0,05	0,178 \pm 0,05
Controle Tween	0,198 \pm 0,04	0,199 \pm 0,04
0,01 mg.L ⁻¹	0,193 \pm 0,04	0,189 \pm 0,06
0,1 mg.L ⁻¹	0,194 \pm 0,07	0,194 \pm 0,07
1 mg.L ⁻¹	0,201 \pm 0,08	0,188 \pm 0,04
10 mg.L ⁻¹	0,210 \pm 0,08	0,201 \pm 0,06
100 mg.L ⁻¹	0,198 \pm 0,07	0,196 \pm 0,07
1.000 mg.L ⁻¹	0,201 \pm 0,07	0,195 \pm 0,05
10.000 mg.L ⁻¹	0,187 \pm 0,05	0,187 \pm 0,04
100.000 mg.L ⁻¹	0,188 \pm 0,06	0,184 \pm 0,04

Teste Dunet, $p < 0,05$.

3.2 Toxicidade geral e histopatologia

Durante o período experimental (21 dias) não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros da água: pH, O₂, amônia tóxica e temperatura, estes se mantiveram adequados para a manutenção dos peixes (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental de 21 dias (média \pm erro padrão).

21 dias de exposição ao EB	Ph	O ₂ (ppm)	Amônia (ppm)	Temperatura °C
Controle	7,1 \pm 0,2	11	0	25,3 \pm 0,3
Controle Tween	7,0 \pm 0,1	11	0	25,0
10 mg.L ⁻¹	7,0 \pm 0,1	11	0	25,3 \pm 0,1
100 mg.L ⁻¹	7,1 \pm 0,2	11	0	25,3 \pm 0,3

Teste Dunet, $p < 0,05$.

O peso dos animais está expressos na tabela 6 e não observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) durante a exposição dos animais por 21 dias ao EB de *T. corrugata*. Diferentemente ao verificado neste trabalho, Lopes (2013) observou redução no ganho de peso de ratos machos. Essas alterações podem estar relacionadas à presença de compostos químicos de ação estrogênica presentes na planta.

Tabela 6 – Média de peso (gramas) do *D. rerio* submetidos a 96 horas de exposição ao EB de *T. corrugata* (média \pm desvio padrão).

21 dias de exposição ao EB	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
Controle	0,194 \pm 0,05	0,193 \pm 0,05
Controle Tween	0,200 \pm 0,04	0,199 \pm 0,04
10 mg.L ⁻¹	0,197 \pm 0,07	0,194 \pm 0,07
100 mg.L ⁻¹	0,217 \pm 0,08	0,189 \pm 0,06

Teste Dunet, $p < 0,05$.

3.2.1 Brânquias

Na tabela 7, estão relacionadas o IALT das alterações histopatológicas presentes no tecido branquial de *D. rerio* após exposição por 21 dias ao EB da *T. corrugata*. Os animais expostos ao EB apresentaram alterações significativas na arquitetura branquial, quando comparados ao grupo controle e, de maneira geral provocaram aumento na espessura das lamelas secundárias o que consequentemente dificultou as trocas gasosas.

Tabela 7 – Índice de Alterações Individuais (Ialt) do tecido branquial de *D. rerio* após exposição por 21 dias ao extrato bruto de *T. corrugata* (média \pm desvio padrão).

Alterações nas brânquias	Fi	Controle	10 mg.L⁻¹	100 mg.L⁻¹
Aneurisma (canal marginal apical e basal e redes capilares)	2	0 a	0,54 \pm 0,11 b	0,62 \pm 0,16 b
Atrofia celular	1	0,23 \pm 0,09 a	0,50 \pm 0,12 b	0,66 \pm 0,09 b
Células pilares (constricção/ rupturas/ dilatação do canal marginal)	1	0,02 \pm 0,06 a	0,15 \pm 0,03 b	0,16 \pm 0,05 b
Alterações circulatórias (congestão/ hiperemia/ hemorragia)	1	0,13 \pm 0,07 a	0,22 \pm 0,04 b	0,22 \pm 0,11 b
Hipertrofia do epitélio lamelar	1	0,10 \pm 0,04 a	0,44 \pm 0,08 b	0,46 \pm 0,06 b
Descolamento epitélio lamelar e edemas	1	0,14 \pm 0,03 a	0,48 \pm 0,06 b	0,56 \pm 0,13 b
Fusão parcial de lamelas	2	0,30 \pm 0,07 a	0,56 \pm 0,12 b	0,66 \pm 0,13 b
Fusão total de lamelas	2	0 a	0,21 \pm 0,08 b	0,32 \pm 0,08 b
Hiperplasia do epitélio	1	0,26 \pm 0,05 a	0,33 \pm 0,10 a	0,44 \pm 0,11 b
Necrose celular (focal/total)	3	0 a	0,18 \pm 0,10 b	0,45 \pm 0,31 b
Ruptura do epitélio	2	0 a	0,22 \pm 0,10 b	0,11 \pm 0,10 b

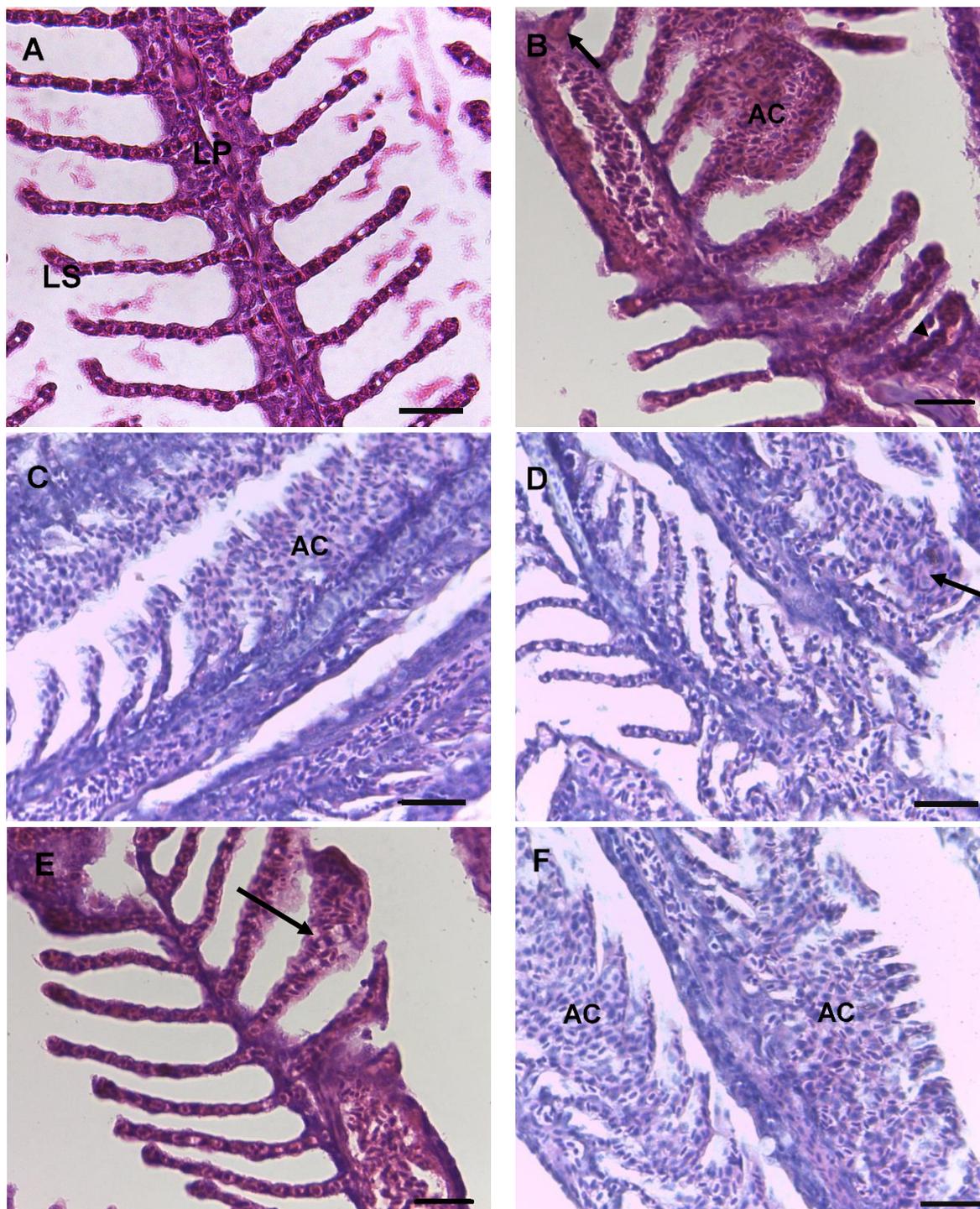
Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

As alterações nas células pilares observadas nesta pesquisa, como constricção, ruptura e dilatação do canal marginal, resultaram em alterações circulatórias. A hiperplasia e hipertrofia verificadas neste trabalho podem ser consideradas respostas adaptativas do animal, pois aumentam a distância entre o meio externo e o sangue, funcionando assim como barreira protetora (SEPICI-DINÇEL et al., 2009). A fusão lamelar está associadas a presença de hiperplasia e hipertrofia, que quando muito intensas acabam unindo as lamelas secundárias, dificultando as trocas gasosas.

Semelhante aos resultados obtidos nesta pesquisa, Meneses et al. (2020) verificaram lesões no tecido branquial de *Colossoma macropomum* expostos ao extrato aquoso das folhas de *T. catappa*. Estas lesões interferem nas trocas gasosas e podem gerar descolamento do epitélio lamelar (SACHI et al., 2021). Na figura 3 a estrutura normal branquial está representada pela figura 3A, as principais patologias encontradas nas brânquias de *D. rerio* após a exposição ao EB da *T. corrugata* por

21 dias estão apresentadas nas figuras 3 B, C, D, E e F: alterações circulatórias, hipertrofia, aneurismas.

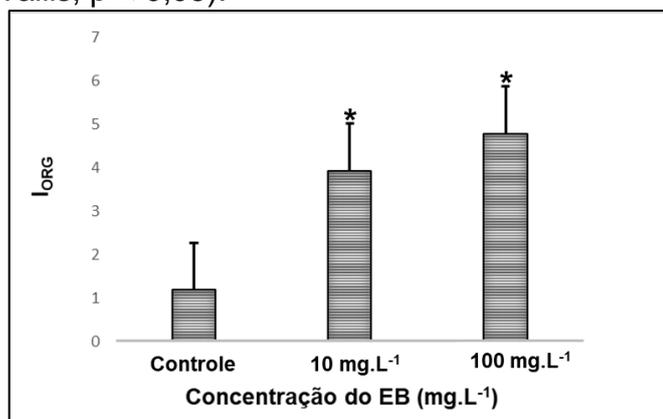
Figura 3- Fotomicrografia da brânquia de *D. rerio* exposto ao EB de *T. corrugata*. (A) grupo controle: Lamela primária (LP) e Lamela secundária (Ls); (B) Alteração circulatória hiperemia (AC), hipertrofia celular (seta) e deslocamento do epitélio lamelar (cabeça de seta); (C) Alterações circulatória - hemorragia (AC); (D) Aneurisma com rompimento da lamela (seta); (E) Aneurisma (seta); (F) Alterações circulatórias: hemorragia com fusão lamelar (AC). HE 400x; barra = 30µm.



Fonte: autora.

O comprometimento morfofisiológico do tecido foi evidenciado pelo índice de lesão do órgão (I_{ORG}), aumentado significativamente quando comparado ao grupo controle, conforme demonstrado na figura 4.

Figura 4 – Índice de lesão do órgão (I_{ORG}) do tecido branquial de *D. rerio* exposto por 21 dias ao EB de *T. corrugata*. * diferença estatística significativa em relação ao controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).



Fonte: autora

Considerando todas as alterações branquiais observadas em *D. rerio* exposto ao EB de *T. corrugata*, o I_{ORG} indicou que as lesões apresentadas geraram disfunções do órgão após o período de 21 dias de exposição. Essas alterações morfológicas podem representar estratégias adaptativas dos animais para conservação das funções fisiológicas, reduzindo a superfície de contato branquial com a água e conseqüentemente com o agente tóxico.

3.2.2 Fígado

Na tabela 8, estão relacionadas o I_{ALT} das alterações histopatológicas presentes no fígado de *D. rerio* após exposição por 21 dias ao EB da *T. corrugata*. Verificaram-se que o EB de *T. corrugata* provocou alterações leves a moderadas no tecido hepático, dentre elas, acúmulo de grânulos intracelulares, alterações nucleares, principalmente degeneração nuclear, atrofia, degeneração celular, hipertrofia dos hepatócitos, hiperemia, estas lesões provocam alterações na arquitetura hepática.

Tabela 8 – Índice de Alterações Individuais (I_{ALT}) do tecido hepático de *D. rerio* após exposição por 21 dias ao extrato bruto de *T. corrugata* (média \pm desvio padrão).

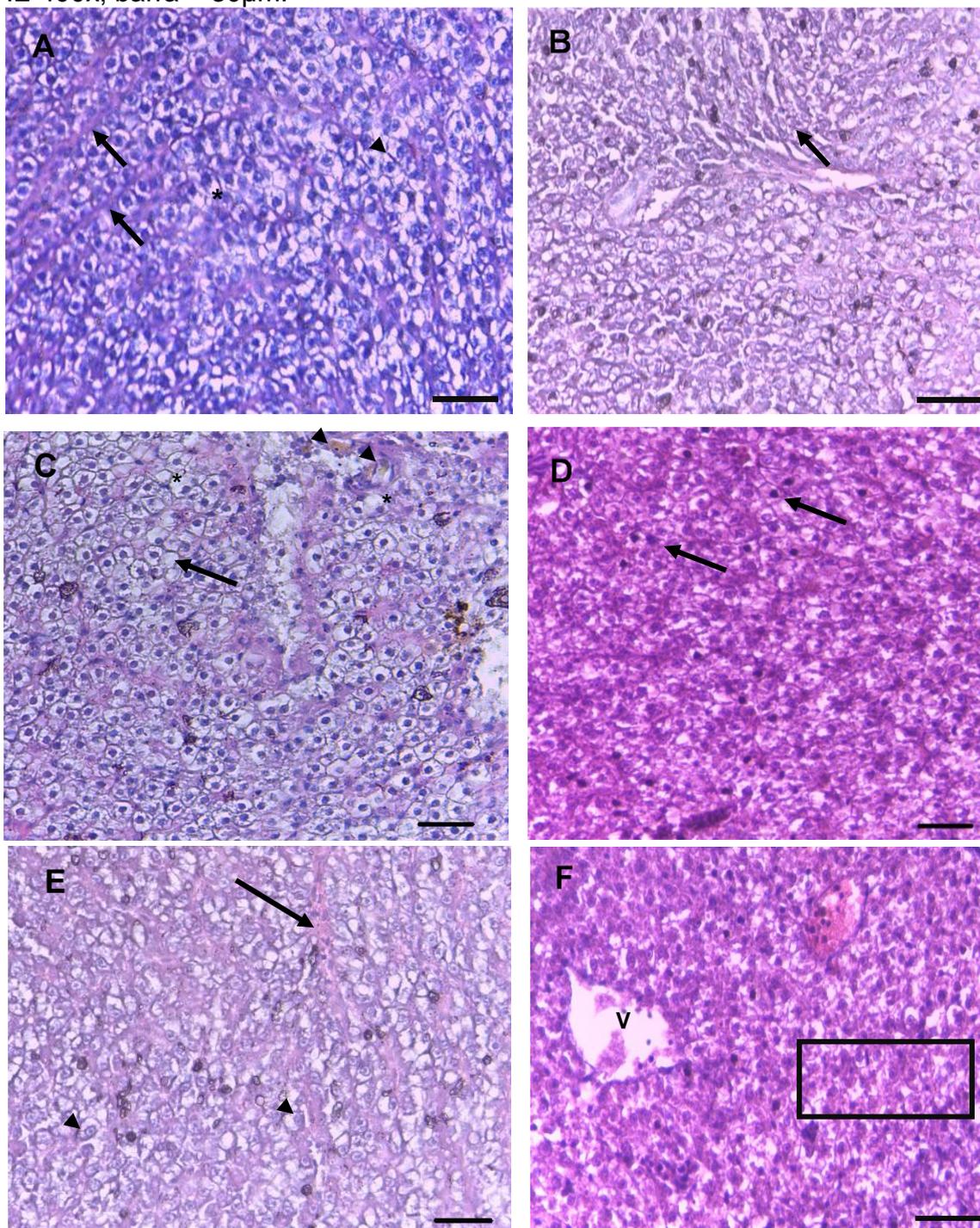
Alterações no fígado	Fi	Controle	T1	T2
Acúmulo de substâncias Intracelulares (grânulos, inclusões eletro-densas, etc.)	1	0,00 a	0,37 \pm 0,27 b	0,31 \pm 0,20 b
Alterações nucleares (degeneração nuclear, ausência de nucléolo, etc.)	2	1,43 \pm 0,55 a	3,98 \pm 0,37 b	3,68 \pm 0,20 b
Alterações na arquitetura hepática	1	0,29 \pm 0,20 a	1,27 \pm 0,34 b	1,03 \pm 0,18 b
Atrofia	2	0,40 \pm 0,51 a	4,00 \pm 0,23 b	4,64 \pm 0,18 b
Degeneração celular	1	0,76 \pm 0,21 a	1,32 \pm 0,38 a	1,64 \pm 0,54 b
Hipertrofia dos hepatócitos	1	0,16 \pm 0,17 a	1,24 \pm 0,37 b	1,64 \pm 0,16 b
Hiperemia (sinusóides)	1	0,00 a	2,04 \pm 0,59 b	2,00 \pm 0,71 b

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

Alterações no formato dos hepatócitos após a exposição pode estar relacionada a alterações no citoesqueleto causando desarranjo na arquitetura hepática. A vacuolização dos hepatócitos pode ser resultante de um acúmulo de substâncias intracelulares, estas podem resultar em alterações metabólicas relacionadas à armazenagem, transporte e desintoxicação (PACHECO; SANTOS, 2002; TRINCHET et al., 2011).

Meneses e colaboradores (2020) relataram que a exposição de *C. macropomum* ao extrato aquoso de *T. catappa* provocou vacuolização dos hepatócitos, congestão dos sinusóides e necrose, é importante ressaltar que as concentrações utilizadas pelos autores foram superiores às utilizadas neste estudo (entre 0,1 e 0,5 g.L⁻¹), demonstrando que *T. corrugata* foi mais tóxica ao *D. rerio*. A hiperemia pode ser considerada uma resposta adaptava do animal, pois aumenta o fluxo sanguíneo geral no fígado possibilitando a liberação de mais nutrientes e oxigênio, evitando a hipóxia (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; CARVALHO et. al, 2017, BORGES et. al, 2018). Na figura 5A, verifica-se a fotomicrografia do fígado de *D. rerio* e, este apresenta estrutura normal, nas figuras 5 B, C, D, E e F estão apresentadas algumas alterações histopatológicas observadas após exposição subcrônica ao extrato bruto dos frutos de *T. corrugata*.

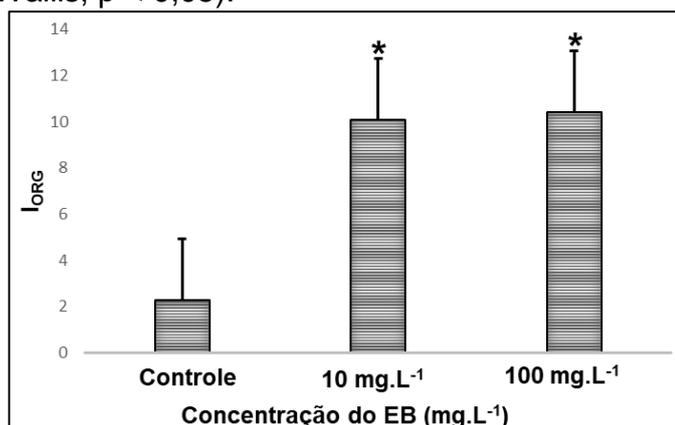
Figura 5 - Fotomicrografia do fígado de *D. rerio* exposto ao EB de *T. corrugata*. (A) grupo controle: hepatócito (*), sinusóides (setas), célula de Kupfer (cabeça de seta); (B) 10 mg.L⁻¹: Alteração na arquitetura hepática, degeneração celular (seta); (C) 100 mg.L⁻¹: Acúmulo de substâncias intracelulares (cabeça de seta), alterações nucleares: ausência de núcleo (seta), Hipertrofia celular (*); (D) 10 mg.L⁻¹: alterações nucleares: núcleo picnótico (cabeça de seta); (E) 100 mg.L⁻¹: Alteração na arquitetura hepática (seta) e alterações nucleares: núcleo deslocado (cabeça de seta); (F) 100 mg.L⁻¹ Alteração na arquitetura hepática: degeneração celular (área quadriculada). V: vaso. HE 400x; barra = 30µm.



Fonte: autora

O comprometimento morfofisiológico do tecido foi evidenciado pelo índice de lesão do órgão (I_{ORG}), verificou-se aumento significativo dos tratamentos com 10 e 100 mg.L^{-1} de EB dos frutos de *T. corrugata* quando comparados ao grupo controle, conforme demonstrado na figura 6.

Figure 6 – Índice de lesão do órgão (I_{ORG}) do tecido branquial de *D. rerio* exposto por 21 dias ao EB de *T. corrugata*. * diferença estatística significativa em relação ao controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).



Fonte: autora

Considerando todas as alterações observadas no fígado do *D. rerio* exposto ao EB de *T. corrugata*, o I_{ORG} indicou que as lesões comprometem o funcionamento do órgão após o período de 21 dias de exposição, mesmo estas lesões sendo reversíveis, devido a frequência e quantidade de alterações, podem ocasionar disfunções hepáticas. Diferentemente aos resultados observados, Lopes et al (2013) não observaram danos no tecido hepático de ratas Wistar tratadas com extrato bruto de *B. tomentosa* sin. *T. corrugata*. No presente estudo, as alterações no formato dos hepatócitos após a exposição ao EB podem estar relacionada a alterações no citoesqueleto e dissociação entre os hepatócitos causando desarranjo do parênquima hepático. De forma geral, o fígado dos peixes realiza funções vitais, essenciais à homeostasia do organismo, alterações histopatológicas podem prejudicar o funcionamento normal do órgão e consequentemente afetar o metabolismo energético, a biotransformação e excreção de xenobióticos, podendo levar o animal a morte (PAULINO et al, 2017).

3.2.3 Rim

O rim do *D. rerio* adulto é constituído por néfrons que são responsáveis pela filtração de resíduos sanguíneos, absorção de sal e água, desempenhando importante função na excreção do volume de água que entra no peixe através da boca. (TASHIMA; HIBIYA, 1995; BORGES et al., 2018). Na tabela 9, estão apresentadas os Índices de Alterações Individuais (I_{ALT}) observadas no tecido renal de *D. rerio* após exposição ao EB de *T. corrugata*. Observaram-se alterações histopatológicas significativas nos tratamentos com 10 e 100 mg.L⁻¹, estas lesões podem comprometer o funcionamento normal do tecido renal.

Tabela 9 – Índice de Alterações Individuais (I_{ALT}) do tecido renal de *D. rerio* após exposição por 21 dias ao extrato bruto de *T. corrugata* (média \pm desvio padrão).

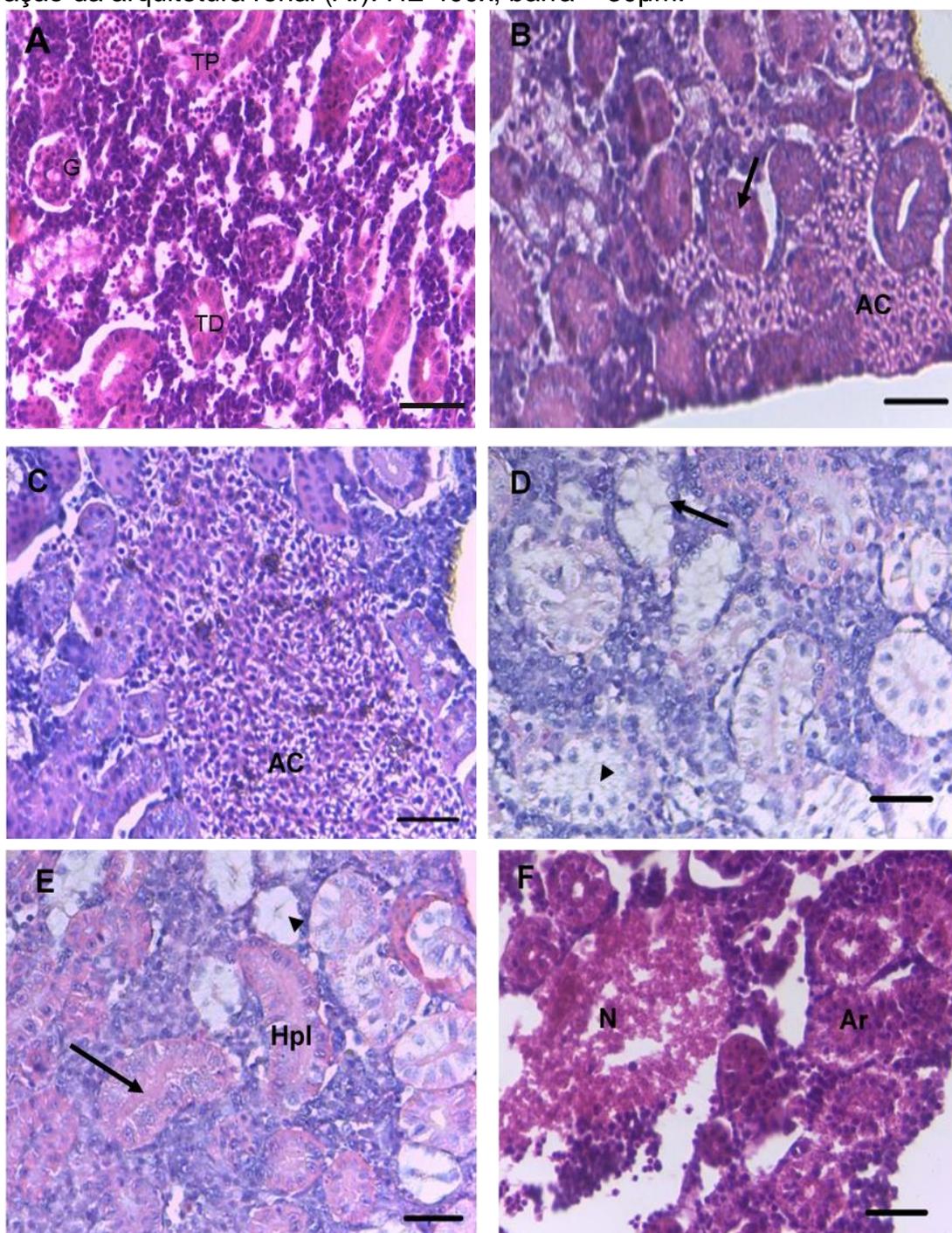
Alterações histopatológicas	Fi	Controle	10 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹
Atrofia (túbulos e glomérulos)	2	12,81 \pm 2,92 a	159,21 \pm 22,51 b	124 \pm 2,20 c
Alterações da arquitetura Renal	1	12,53 \pm 4,01 a	37,11 \pm 3,43 b	35,22 \pm 4,21 b
Alterações nas estruturas celulares	1	28,54 \pm 1,64 a	63,03 \pm 2,90 b	60,81 \pm 1,82 b
Alterações nucleares	2	102,83 \pm 9,01 a	229,10 \pm 28,55 b	275,26 \pm 5,73 c
Alterações circulatórias (hemorragia e hiperemia)	1	24,10 \pm 3,31 a	42,76 \pm 6,44 b	54,33 \pm 4,04 c
Hipertrofia dos túbulos	1	0,72 \pm 0,51 a	7,00 \pm 1,10 b	8,32 \pm 0,32 b
Hiperplasia dos túbulos (oclusão tubular)	2	61,31 \pm 11,10 a	206,01 \pm 20,00 b	170,80 \pm 7,7 b
Hiperplasia dos glomérulos	2	0,40 \pm 0,40 a	31,93 \pm 8,93 b	32,00 \pm 3,10 b
Necrose	3	0,00 a	40,51 \pm 12,02 b	33,30 \pm 2,70 b

Letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa (Kruskal-Wallis $p < 0,05$).

Alterações renais podem seguir uma variedade de padrões, o agente químico envolvido no processo, por exemplo, terá influência sobre as lesões, por isso, este órgão tem se tornado efetivo nos estudos como biomarcador histopatológico em peixes (FAHEEM; JAHAN; LONE, 2018). A atrofia observada em *D. rerio* após exposição ao EB da *T. corrugata* compreende um mecanismo de adaptação, Safahieh et al. (2011) comenta que a atrofia é uma resposta decorrente da diminuição de funções especializadas da célula. As alterações nas estruturas celulares, nucleares além de outras lesões observadas, como degenerações, ocasionam desarranjo estrutural na arquitetura renal. Estas alterações podem prejudicar a filtração glomerular, comprometendo o processo de reabsorção e excreção tubular (CAMARGO; MARTINEZ, 2007; CARMO et al., 2018). Na figura 7A, está demonstrada a estrutura renal normal de *D. rerio*, túbulos rodeado por tecido intersticial, hematopoiético e linfóide, as figuras 7 B, C, D, E, e F, estão demonstradas as

alterações observadas no rim de *D. rerio* após a exposição ao EB da *T. corrugata* por 21 dias.

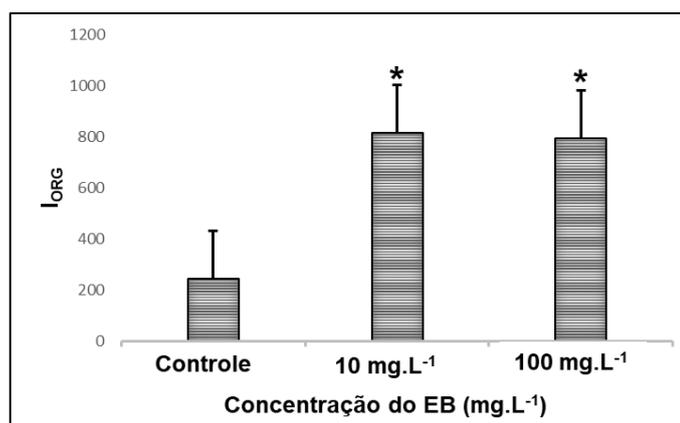
Figura 7 – Fotomicrografia do tecido renal de *D. rerio* exposto ao EB *T. corrugata*. (A) Grupo controle: Túbulo Distal (TD), Túbulo Proximal (TP) e Glomérulo (G); (B) 10 mg.L⁻¹ do extrato bruto: Alteração circulatória (AC) e oclusão tubular (seta); (C) 100 mg.L⁻¹ do extrato bruto: Alteração circulatória (AC), alterações das estruturas celulares (ausência de núcleo, seta) e Hipertrofia (cabeça de seta); (E) 10 mg.L⁻¹ do extrato bruto: Hiperplasia (Hpl), oclusão tubular (seta) e alterações das estruturas celulares (ausência de núcleo, cabeça de seta); (F) 100 mg.L⁻¹ do extrato bruto: necrose (N) e alteração da arquitetura renal (Ar). HE 400x; barra = 30µm.



Fonte: autora

No presente estudo, o I_{ORG} indicou que as patologias totais ocasionaram comprometimento do tecido e sua função. Este dado está representado na figura 8, na qual demonstra a somatória das alterações no tecido renal de *D. rerio* provocadas pela exposição ao EB de *T. corrugata*.

Figura 8 – Índice de lesão do órgão (I_{ORG}) do tecido renal de *D. rerio* exposto por 21 dias ao EB de *T. corrugata*. * diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).



Fonte: autora

Diferentemente dos resultados observados no presente estudo, Lopes et al. (2013) não observaram alterações histopatológicas nos rins de ratas Wistar submetidas ao EB de *B. tomentosa*. As alterações morfológicas observadas no rim de *D. rerio* comprometem a função do órgão, consequentemente a capacidade de excreção de xenobióticos pode estar comprometida, prejudicando ainda mais a saúde do animal.

4 CONCLUSÕES

O extrato bruto de *T. corrugata* provoca toxicidade geral ao *D. rerio*, causando alterações teciduais nas brânquias, fígado e rim, afetando o funcionamento normal destes órgãos e consequentemente comprometendo o bem-estar animal. A presença de substâncias tóxicas podem estar relacionadas a estes efeitos.

5 REFERÊNCIAS

BERNET, D., H. et al. Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish disease**, 22: 25-34, 1999.

BORGES S. B; KEITA H; ORTIZ B. L. S; et al., (2018) Anti-inflammatory activity of nanormulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: *in vitro* and zebrafish studies. **Inflammopharmacology**. Doi.org/10.1007/s10787-017-0438-9.

BROWN, L.A. **Anaesthesia for fish**. Vietfish. [s.i.], p. 68-70. mar. 2011.

CAMARGO, M.M.P., MARTINEZ, C.B.R., Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**. N.5, p. 327–336, 2007.

CANEDO, A.; ROCHA, T. H. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. **Science of The Total Environment**, V. 762, 2021.

CARMO, T. L. L., AZEVEDO, V. C., SIQUEIRA, P. R., et al. Reactive oxygen species and other biochemical and morphological biomarkers in the gills and kidneys of the Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*, exposed to titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research** V.25, n.23, p. 22963–22976, 2018.

CARVALHO, J. C.T., KEITA, H., SANTANA, G. R., SOUZ,A G. C., SANTOS, I. V. F., AMADO, J. R. R., KOUROUMA, A., PRADA, A. L., CARVALHO, H. O., SILVA, M.L. Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. **Inflammopharmacology** 25:1–12. 2017.

CAVALCANTE et al. Evaluation of resveratrol toxicity in the embryolarval stage of *Danio rerio* fish. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 12, n. 1, 2017.

CLAUDIANO, G. S. et al. Concentração letal cl50 do extrato aquoso de folhas de *Terminalia catappa* em guaru, *Phalloceros caudimaculatus*. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.3, p.15-19, 2012.

COSTA, A. M. D.; MARIANO DE SOUZA, D. P.; CAVALCANTE, T. V.; ARAÚJO, V. L.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M. Plantas tóxicas de interesse pecuário em região de ecótono amazônia e cerrado. Parte II. Araguaína, Tocantins. **Acta Veterinária Brasilica**, v.5, n.3, p.317- 324, 2011.

FAHEEM, M.; LONE, K. P. Oxidative stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. **Brazil Journal of Pharmacology Sciences**, v. 53, 2018.

GUO, S.; ZHENG, J.; YUANA, S.; ZHUB, Q.; WUA C. Immunosuppressive effects and associated compensatory responses in zebrafish after full life-cycle exposure to environmentally relevant concentrations of cádmium. **Aquatic Toxicology**, p. 64-71, 2017.

HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., THURSTON, V., Trimmed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Techenology**. V.7, p.714 - 719. 1977.

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

LOPES, D. I. S. **Toxicidade subcrônica e reprodutiva de extratos de *Buchenavia tomentosa* em ratos wistar**. 2013. 109p. Tese de (Doutorado em Ciência Animal Tropical) Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa, Editora Plantarum, p. 368, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 3º ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.2, 384p. 2009.

MELLO, G. W. S.; OLIVEIRA, D. M.; CARVALHO, C. J. S.; PIRES, L. V.; COSTAS, F. A. L.; RIET-CORREA, F.; SILVA, S. M. M. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Norte Piauiense, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.1-9, 2010.

MENESES, J.O.; DOS SANTOS CUNHA, F.; DIAS, J.A.R. et al. Acute toxicity of hot aqueous extract from leaves of the *Terminalia catappa* in juvenile fish *Colossoma macropomum*. **Aquaculture International**, n. 28, p. 2379–2396, 2020.

NETO, R. L. S.; CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**, p. 685-700, 2014.

NUNES, H. M. M.; PAIVA, J. A.; RAMOS, A. T.; MAIORKA, P. C.; MARUO, M. V. Effects of *Buchenavia tomentosa* consumption on female rats and their offspring. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v.32, n.4, p. 423-429, 2010.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, p.331–347, 2002.

PAULINO M.G., et al. Biotransformations, antioxidant system responses, and histopathological indexes in the liver of fish exposed to cyanobacterial extract. **Environmental and Toxicology Chemical** V.39, n.5, p.1041-1051, 2020.

PAULINO, M.G., ROSSI, P.A., VENTURINI, F.P., TAVARES, D., et al. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). **Chemosphere**. V.175, p.431–439. 2013.

RIBEIRO, R. V., et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 205, 69-102, 2017.

ROPER C.; TANGUAY R.L. Zebrafish as a Model for Developmental Biology and Toxicology. **Handbook of Developmental Neurotoxicology** (Second Edition). p.143-151, 2018

SACHI, I. T. C., BONOMO, M. M., SAKURAGUI, M. M., MODENA, P. Z., PAULINO, M. G., CARLOS, R. M., FERNANDES, J.B, FERNANDES, M. N., 2021. Biochemical

and morphological biomarker responses in the gills of a Neotropical fish exposed to a new flavonoid metal-insecticide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 208, 111459.

SAFAHIEH, A., HEDAYATI, A., SAVARI, A., MOVAHEDINIA, A., 2011. Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream. **Toxicology and Industrial Health**. 28, 583–592.

SEPICI-DINÇEL A, CALAN KBA, SELVI M, SARIKAYA R, SAHIN D, AYHAN OZKUL I, ERKOC F. 2009. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. **Ecotoxicol Environmental Safety**. 72: 1433-1439.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. (eds). An atlas of fish histology. In: **Normal and pathological features**, 2nd ed n. Kodansha Ltd, Tokyo. 1995.

TRINCHET, I.; DJEDIAT, C.; HUET, H, DAO, S.P.; EDERY, M. Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. **Reproductive Toxicology**, v.32 , p.329– 340, 2011.

YUNUS K.; JAAFAR A.M.; JOHN, A. Effect of *Terminalia Catappa* Linn. leaves extract on *Oreochromis Niloticus* (Red Nile Tilapia) juveniles under static toxicity exposure. **Oriental Journal of Chemistry**, v.35, n.1, p.270–274, 2019.

TOXICIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO BRUTO DOS FRUTOS DE *Terminalia corrugata* em ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL

RESUMO

O gênero *Terminalia* é o segundo maior gênero da família Combretaceae, possuindo cerca de 240 espécies, distribuídas nas regiões tropicais da América, África, Oceania e Ásia. A espécie *T. corrugata* conhecida na região norte do Brasil como mirindiba, é relatada por produtores de bovinos, caprinos e ovinos como tóxica aos animais que ingerem os frutos, principalmente alterações relacionadas a desordens reprodutivas. Objetiva-se avaliar a toxicidade reprodutiva do extrato bruto dos frutos de *T. corrugata*, utilizando o zebrafish como modelo experimental. Para isto, os animais foram submetidos a diferentes concentrações do extrato por 21 dias e grupo controle (água livre de extrato). Em seguida, ocorreu avaliação de mortalidade, alterações reprodutivas e histologia das gônadas. Não foram observadas redução de peso dos animais expostos ao extrato em relação ao grupo controle. Quanto a toxicidade reprodutiva, o EB causou redução na desova dos animais expostos a concentração de 100 mg.L⁻¹, além disso a histologia das gônadas das fêmeas demonstrou redução no número de ovócitos de fase IV e V. Em relação aos machos, a histologia não demonstrou alterações significativas nos testículos. O EB da *T. corrugata*, causou toxicidade reprodutiva nas fêmeas, com redução da maturação ovocitária e consequente redução no número de ovos diários, sugerindo que há presença de compostos nos frutos da *T. corrugata* que estão causando desordens reprodutivas nos animais.

Palavras-chave: Fruto. Mirindiba. Paulistinha. Teleósteo. Gônadas.

REPRODUCTIVE TOXICITY OF THE RAW EXTRACT OF FRUITS OF *Terminalia corrugata* IN ZEBRAFISH AS AN EXPERIMENTAL MODEL

ABSTRACT

The genus *Terminalia* is the second largest genus of the Combretaceae family, having about 240 species, distributed in the tropical regions of America, Africa, Oceania and Asia. The species *T. corrugata* known in the northern region of Brazil as mirindiba, is reported by producers of cattle, goats and sheep as being toxic to animals that eat the fruits, mainly alterations related to reproductive disorders. The objective is to evaluate the reproductive toxicity of the crude extract of *T. corrugata* fruits, using zebrafish as an experimental model. For this, the animals were submitted to different concentrations of the extract for 21 days and control group (extract-free water). Then, mortality, reproductive alterations and histology of the gonads were evaluated. No weight reduction was observed in the animals exposed to the extract compared to the control group. As for reproductive toxicity, EB caused a reduction in spawning in animals exposed to a concentration of 100 mg.L⁻¹, in addition to the histology of female gonads, a reduction in the number of phase IV and V oocytes was observed. histology did not demonstrate significant alterations in the testes. The EB of *T. corrugata* caused reproductive toxicity in females, with reduced oocyte maturation and consequent reduction in the number of daily eggs, suggesting that there are compounds in the fruits of *T. corrugata* that are causing reproductive disorders in animals.

Keywords: Fruit. Mirindiba. Paulistinha. Teleost. Gonads.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Terminalia* é o segundo maior gênero da família Combretaceae, possuindo cerca de 240 espécies, distribuídas nas regiões tropicais da América, África, Oceania e Ásia (STACE, 2010; MAURIN et al., 2017). As filogenias do gênero, baseadas em sequências gênicas de marcadores moleculares nucleares e plastidiais (ITS, rbcL, psaA e ycf3), incluíram *Buchenavia* em *Terminalia* (BERGER, 2016; MAURIN et al., 2017).

Terminalia corrugata, conhecida popularmente como imbu-do-sertão, tanimbuca mirindiba, piá-banheira, tarumã, biriba, tarumarana, cambry, miringiba, imbuzeiro, pau pilão, merindiba, mirindiba, migol, tanimbuca, pebanheira, cuiarana ou tanebuco, é uma árvore típica do cerrado, floresta semidecídua, mata ciliar também encontrada em florestas neotropicais, florestas atlânticas e caatinga, está amplamente distribuída no território brasileiro (SiBBR, 2021).

Algumas partes do vegetal são utilizadas na medicina popular, as folhas, por exemplo, são usadas para preparo de chá e a casca no tratamento de tosse, como antihiperlipidêmicas e anorexígenas (LORENZI, 2009) há relatos da utilização das flores e frutos por comunidades ribeirinhas no tratamento do colesterol alto, diabetes, hipertensão (RIBEIRO et al., 2017). Adicionalmente, criadores de bovinos, ovinos e caprinos relatam que a ingestão de frutos da *T. corrugata* estaria de alguma forma associada à ocorrência de abortos, diarreia, focinho seco, fraqueza, perda de peso, nascimento de animais fracos e até a morte de animais (COSTA, et al., 2011; MELLO et al., 2010). Lopes (2013) avaliando a Toxicidade subcrônica e reprodutiva dos extratos butanólico e aquoso de *T. corrugata* em ratos Wistar, observou que os extratos promoveram toxicidade reprodutiva, com consequente reabsorção embrionária. Nos machos, o tratamento prolongado com os extratos induziu a um quadro de toxicidade sistêmica, causando diminuição do ganho peso. Sugerindo que estes resultados foram desencadeados pelos metabólitos secundários presentes nos extratos de *T. corrugata*.

Nesta perspectiva, a presença de substâncias que podem implicar em desordens reprodutivas e os relatos de intoxicação espontânea causados pelo fruto de *T. corrugata* em animais de produção, torna necessário estudos que verifiquem os possíveis efeitos tóxicos de *T. corrugata* sobre os parâmetros reprodutivos. Assim,

objetiva-se avaliar a toxicidade subcrônica e reprodutiva do extrato bruto dos frutos de *T. corrugata* utilizando o zebrafish como modelo animal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta dos frutos

Os frutos maduros da *T. corrugata* foram coletados entre os meses de agosto a setembro de 2022 na região rural do município de Araguaína – TO, próximo ao campus da Universidade Federal do Norte do Tocantins – UFNT, 7° 04' 45" S 48° 11' 49" W, Araguaína – TO, Brasil. Uma exsicata foi identificada e depositada no herbário registro nº: 10301, da Universidade Federal do Tocantins – UFT, *campus* de Porto nacional. Para a coleta dos frutos, lona plástica foi colocada embaixo da árvore, para que os frutos pudessem cair sobre a lona e serem coletados no mesmo dia, evitando desta forma o processo de fermentação.

Os frutos maduros foram acondicionados em sacos plástico, mantidos em caixas termo isolantes contendo gelo e encaminhados ao Laboratório Multidisciplinar de Patologia Animal da UFNT, lavados em água destilada e selecionados quanto à integridade, ausência de doenças e fragmentos de areia, folhas e gravetos, a casca e a polpa foram retiradas manualmente e percolados em álcool 96% por 10 dias ao abrigo de luz, posteriormente, a solução foi filtrada e armazenada em freezer (-20 °C) até utilização. Ao término desse período, o material foi filtrado e rotaevaporado sob pressão reduzida (Fisatom® Mod. 801) em temperatura máxima de 43 °C, obtendo-se o extrato bruto (EB) e congelado até o experimento com os peixes.

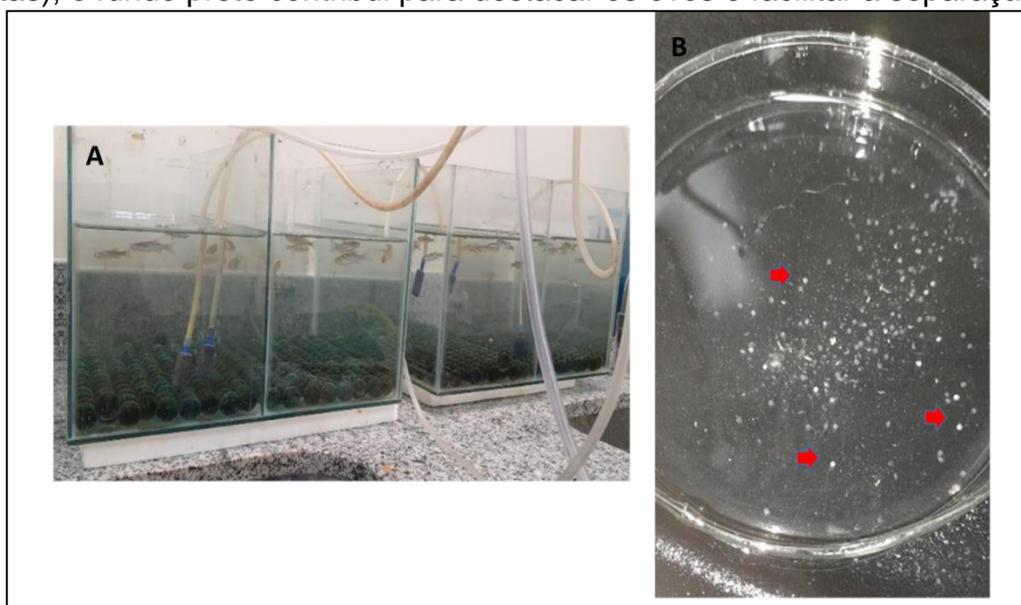
2.2 Toxicidade reprodutiva do extrato bruto de *T. corrugata*

A toxicidade reprodutiva foi testada de acordo com a Organização para Diretriz de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) nº 229 (OECD 229, 2012). O experimento constituiu em uma pré-exposição de 14 dias e exposição de 21 dias em concentrações subletais do extrato bruto. Para determinação das concentrações utilizadas, foi estimada a CL_{50-96H} e utilizadas concentrações inferiores.

2.2.1 Condições gerais de manutenção dos peixes

Durante os 14 dias de pré-exposição, os peixes-zebra adultos (cerca de 4 meses) foram colocados aleatoriamente em aquários de vidro de 10 L para estabelecer o nível básico de reprodução. Em cada aquário de criação continham 5 peixes fêmeas e 5 machos. Para coletas dos ovos, seguiu-se a metodologia descrita por Westerfield (2000), no fundo dos aquários foram colocados bolas de gude para que os animais desovasse e os ovos escorregassem entre as esferas, impedindo desta forma a predação. A coleta dos ovos ocorreu por sifonamento, utilizando uma mangueira fina e uma peneira com um tecido de cor preta para que os ovos se destacassem e pudessem serem separados das excretas e contabilizados diariamente (figura 1).

Figura 1 – A: Os aquários contendo bolinhas de gude para separação dos peixes adultos e dos ovos depositados. B: ovos coletados, na imagem observa-se a presença de pontinhos brancos: são os ovos (setas vermelhas destacando) e detritos menores (excretas), o fundo preto contribui para destacar os ovos e facilitar a separação.



Fonte: autora.

2.2.2 Exposição ao EB 21 dias

Após 14 dias de pré-exposição, os peixes-zebra adultos foram expostos às concentrações do extrato de *T. corrugata* por 21 dias. As concentrações utilizadas foram escolhidas conforme a base na Diretriz 229 da OECD (OECD 229, 2012) e experimentos preliminares, sendo: grupo controle, 10 e 100 mg.L⁻¹ de EB (3 repetições, n = 30). As concentrações de exposição foram renovadas diariamente

proporcionalmente ao volume retirado de cada aquário e o sistema de condução dos testes foi o semi-estático. Os peixes foram alimentados com ração 3 vezes ao dia com ração comercial e 2 vezes ao dia com náuplios de *Artemia salina*, intercalando entre os tipos de alimentos, permaneceram em jejum nas 24 horas anteriores à eutanásia. Além disso, as variáveis físico-químicas da água incluindo pH, amônia dissolvida, temperatura °C e O₂ devem foram monitoradas durante todo o período experimental.

A desova foi estimulada uma vez todas as manhãs, quando a luz da sala era ligada (controlada por um time eletrônico), uma hora depois o número total de embriões quantificados e examinados sob um estereomicroscópio para calcular a taxa de fertilização (%). Para isso, os aquários foram sifonados com auxílio de uma mangueira e os ovos realocados em outro aquário (maternidade) com água limpa, para que ocorra o a eclosão das larvas e quantificação.

No final da exposição, os peixes adultos foram anestesiados com 100 mg.L⁻¹ de triclaína e 300 mg.L⁻¹ de NaHCO₃ adicionado para neutralizar o pH da água, pois a solução de anestésico é ácido, isto promoverá eficácia anestésica evitando acidemia metabólica (PALMER; MESINGER, 2004). Em seguida, submetidos à coleta das gônadas, nas quais foram fixadas boim por 12 horas e lavadas em água corrente por 24 horas. Posteriormente foram submetidas a uma serie de desidratação em álcool, diafanizadas em xilol, incluídas em parafina histológica, cortadas em 5µm e montagem das lâminas, coradas em hematoxilina e eosina, analisadas em microscopia com aumento de 400x.

As gônadas foram coletadas para análises morfológicas através da avaliação histológica por meio de foto microscopia do tecido para a medição de parâmetros que indicam seu estado de atividade.

2.3 Histologia das gônadas

As gônadas foram avaliadas qualitativamente em microscópio de luz, quanto a maturação gonadal conforme a OECD 123 (OECD 123, 2010). Foram avaliadas 25 campos aleatórios distribuídos em 5 cortes por animal (10 machos e 10 fêmeas para cada tratamento). Além disso, os tecidos foram avaliados quanto a presença de alterações histopatológicas, como: hipertrofia, hiperplasia, folículos atrésicos, inflamação granulomatosa e necrose tecidual. Foi atribuído um sistema de categorias para abranger uma variedade de diferentes alterações teciduais:

- Discretas: mudanças que podem ser prontamente contadas. Exemplos incluem folículos atrésicos, ovócitos nos testículos (testículos-óvulos) e aglomerados de células apoptóticas (atresia de ovócitos).
- Espacial: mudanças que podem ser quantificadas por medições de área. Isso inclui lesões que são tipicamente classificados como focais, multifocais, coalescentes ou difusos. Exemplos específicos incluem alterações no estadiamento gonadal, inflamação granulomatosa e necrose tecidual.
- Global: são mudanças generalizadas que geralmente requerem medições mais sofisticadas técnicas de quantificação. Hiperplasia/hipertrofia de células intersticiais e hiperplasia/hipertrofia de células perifoliculares.

Com isso, as alterações observadas foram classificadas quanto a sua frequência no tecido gonadal, conforme tabela 1.

Tabela 1 – Classificação das alterações gonadais baseado na frequência de ocorrência. Adaptado OECD nº 123 (2010).

Classificação	Escala geral de classificação
A	Ausente
1	1 observação ou < 20% alterações espaciais
2	3 à 5 observações 20% à 50% alterações espaciais
3	6 à 8 observações 50% à 80% alterações espaciais
4	> que 9 ou > 80% alterações espaciais

Foram considerados arquitetura gonadal normal em macho de *D. rerio* a presença de diferentes fases de maturação: espermatogônia tipo 1 e tipo 2, espermatócito, espermatíde, espermatozoides, células de Sertoli, célula de Leydig e espermatocisto. Nas fêmeas foram considerados arquitetura normal de diferentes fases de maturação dos folículos ovarianos (fases: I, II, III, IV e V): ovogônia, ovócitos perinucleolares, ovócitos alveolares corticais, ovócitos vitelogênicos precoces, ovócitos maduros, células perifolicular. As alterações consideradas estão relacionadas na tabela abaixo e serão classificadas conforme a ocorrência no órgão:

Tabela 2 - Alterações nas gônadas de *D. rerio*. Adaptado: OECD (2010).

Macho	Fêmea
Proporção aumentada de espermatogônias	Fases de maturação dos folículos ovarianos
Presença de óvulos testiculares Degeneração testicular	Aumento da atresia oocitária Hiperplasia/hipertrofia de células perifoliculares
Hiperplasia/hipertrofia de células intersticiais	-
Diminuição da proporção de espermatogônias	-

Os dados serão apresentados como a média \pm desvio padrão. Será realizada Análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett, para os dados paramétricos, os dados que não apresentarem distribuição normal, serão submetidos à análise não paramétrica (Kruskall Wallis), através do programa estatístico software GraphPad Prisma v 5.0 para Windows. Será considerada a probabilidade de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante o período experimental (21 dias) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos parâmetros da água: pH, O₂, amônia tóxica e temperatura, estes se mantiveram adequados para a manutenção dos peixes (MOREIRA et al., 2001) e não interferiram nos resultados experimentais (Tabela 3). Não foram observadas diferença significativa ($p < 0,05$) durante a exposição crônica dos animais ao EB de *T. corrugata* no peso dos animais (tabela 4).

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos da água durante o período experimental de 21 dias (média \pm desvio padrão).

21 dias de exposição ao EB	Ph	O ₂ (ppm)	Amônia (ppm)	Temperatura °C
Controle	7,1 \pm 0,2	11	0	25,3 \pm 0,3
10 mg.L ⁻¹	7,0 \pm 0,1	11	0	25,3 \pm 0,1
100 mg.L ⁻¹	7,1 \pm 0,2	11	0	25,3 \pm 0,3

Teste Dunet, $p < 0,05$.

Tabela 4 – Média de peso (gramas) do *D. rerio* submetidos a exposição crônica ao EB de *T. corrugata* (média \pm desvio padrão).

21 dias de exposição ao EB	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
Controle	0,194 \pm 0,05	0,193 \pm 0,05
10 mg.L ⁻¹	0,197 \pm 0,07	0,194 \pm 0,07
100 mg.L ⁻¹	0,217 \pm 0,08	0,189 \pm 0,06

Teste Dunet, $p < 0,05$.

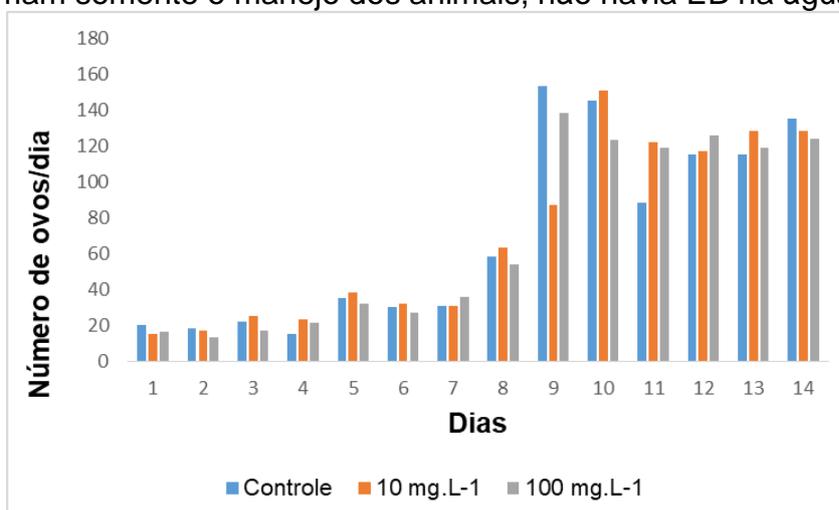
Claudianno et al. (2012) observaram alterações em alguns parâmetros físico-químicos da água dos aquários tratados com extrato aquoso de *Terminalia catappa*, como diminuição significativa da concentração de oxigênio dissolvido e, em menor proporção, do pH o que poderia ter influenciado na mortalidade dos peixes. Em relação ao peso de animais expostos ao EB, alguns trabalhos demonstraram efeito sobre o peso, o extrato provocou redução do peso de ratos adultos e (LOPES, 2013; NUNES, et al. 2010; MELLO et al., 2010; MAZZINGHY; ADAMS; MARUO, 2009), diferentemente do observado no presente estudo, onde não observou-se variação significativa entre os tratamentos.

3.1 Toxicidade Reprodutiva

3.1.1 Produção de ovos

Durante os 14 dias de pré-exposição, os animais foram mantidos sobre as condições ambientais que seriam utilizadas durante a exposição ao EB. Neste período, ocorreram coletas diárias dos ovos para assegurar que as fêmeas estavam com maturidade sexual e desovando. Observou-se que durante os primeiros dias da pré-exposição a desova estava ocorrendo em menor quantidade (ovos/dia) e no passar dos dias o número de ovos/dia aumentaram. Além disso, nos últimos dias da pré-exposição, o número de ovos diários não variaram significativamente, conforme demonstrado na figura 2. Provavelmente, o número de ovos mais baixo nos primeiros dias estariam relacionados a adaptação dos animais ao ambiente e ao manejo.

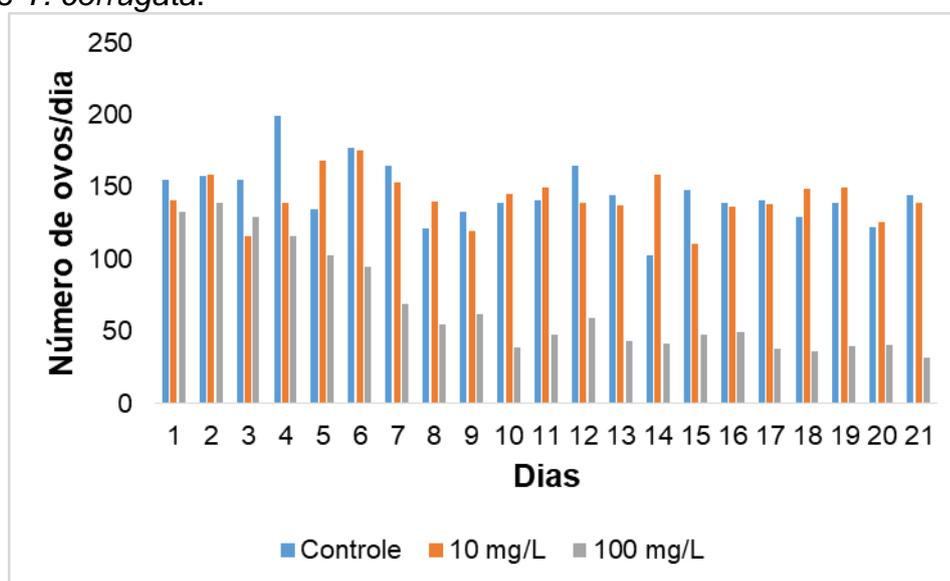
Figura 2– Número de ovos/ dia durante o período de pré-exposição ao EB, neste período ocorriam somente o manejo dos animais, não havia EB na água.



Fonte: autora.

Durante o período experimental (21 dias), não ocorreu diferença significativa em relação ao grupo controle e o tratamento com 10 mg.L⁻¹ do EB *T. corrugata* quanto ao número de ovos/dia. No tratamento com 100 mg.L⁻¹ de EB, verificou-se uma redução na quantidade de ovos/dia nos tratamentos em comparado ao grupo controle, indicando que o extrato estaria associado a uma redução na produção de ovos. A figura 3 demonstra a desova dos animais durante os 21 dias de experimento.

Figura 3 - Número de ovos/dia durante o período experimental 21 dias de exposição ao EB de *T. corrugata*.



Fonte: autora.

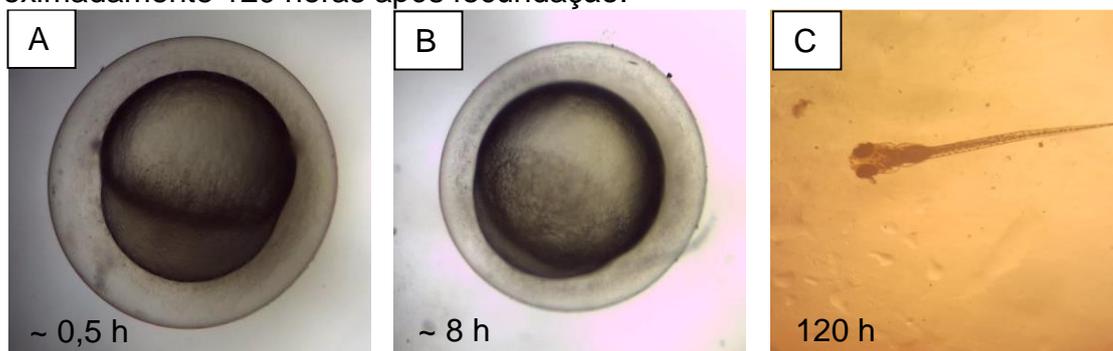
Na tabela 5 observa-se a média de ovos fecundado, ovos eclodidos e a fertilização (%) do *D. rerio* exposto ao EB de *T. corrugata*. Não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos quanto a fertilização dos ovos. Apesar de ter ocorrido menor desova no tratamento 100 mg.L⁻¹, a quantidade de ovos eclodidos não foi afetada. A figura 4 demonstra ovos fecundados e *D. rerio* e larva após eclosão.

Tabela 5 – Desova diária, ovos fecundados, ovos eclodidos e fertilização (em percentagem) de *D. rerio* exposto ao EB de *T. corrugata* por 21 dias.

	Controle	10 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹
Ovos/dia	145,33 ± 20,27 a	142,38 ± 15,63 a	67,47 ± 34,86 b
Ovos fecundados	130,90 ± 14,88 a	132,57 ± 16,05 a	61,52 ± 35,14 a
Ovos eclodidos	124,47 ± 14,61 a	124,42 ± 16,83 a	57,38 ± 36,14 a
Fertilização (%)	84,45 ± 2,36 a	84,37 ± 3,36 a	83,65 ± 10,67 a

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística, teste de Dunet (p < 0,05).

Figura 4 – Ovos de *D. rerio* após fecundação (A- zigoto, aproximadamente 0,5 horas após fecundação; B – gástrula, aproximadamente 8 horas após fecundação); C - larva, aproximadamente 120 horas após fecundação.



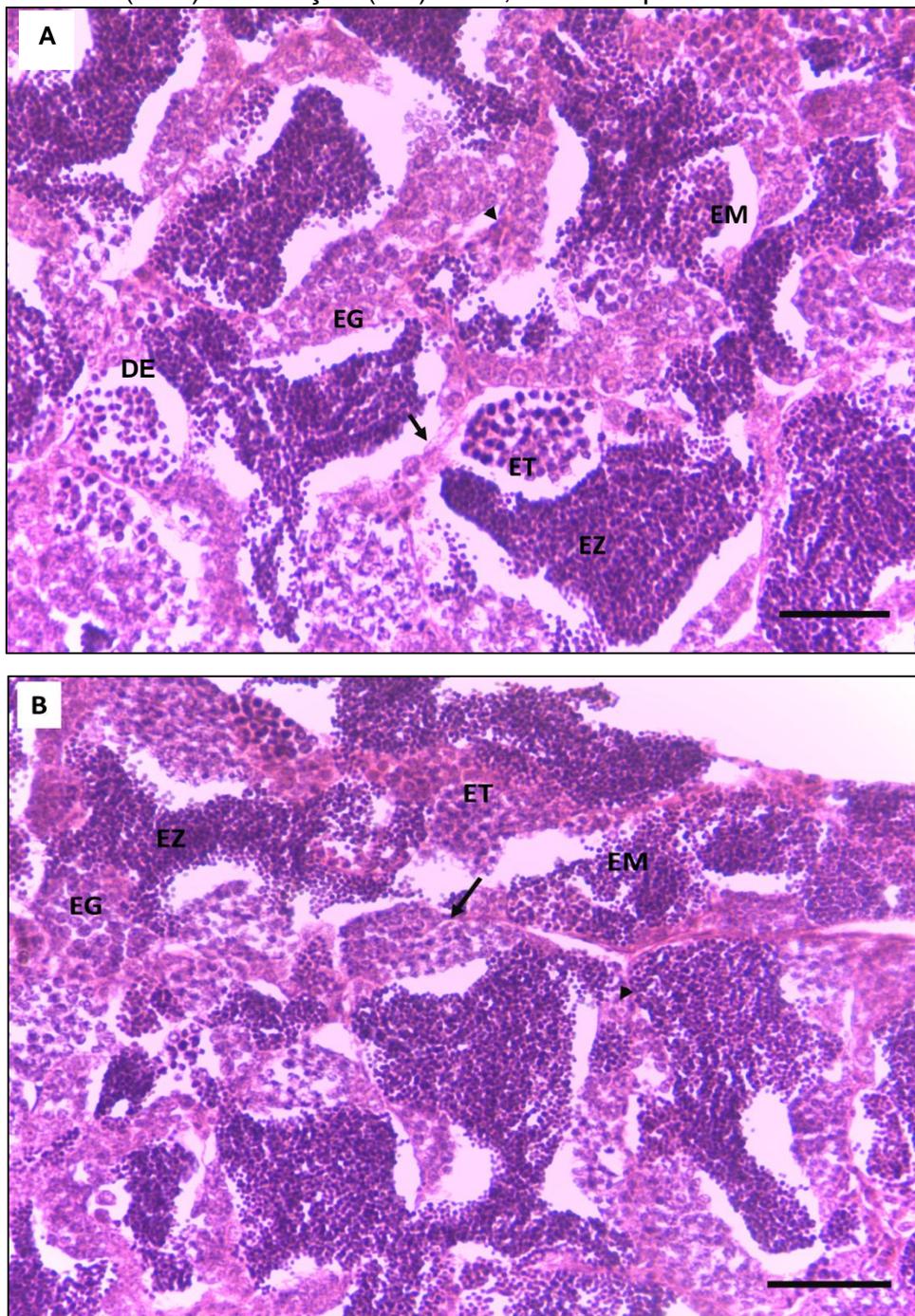
Fonte: autora.

Pesquisas tem demonstrado que o 5-hydroxymethylfurfural (5HMF) causa toxicidade em embriões de *D. rerio*, alterando o desenvolvimento e comportamento, como: aumento das taxas de mortalidade e deformidade nas larvas, inibiu o desenvolvimento da cartilagem, reduziu a mineralização óssea, aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio e na frequência cardíaca, demonstrando o efeito tóxico do 5HMF (JIANG et al., 2022^a; JIANG et al., 2022^b).

3.1.2 Histologia das gônadas

Em relação a histologia das gônadas, os machos do controle e dos tratamentos 10 e 100 mg.L⁻¹ apresentaram um padrão de desenvolvimento gonadal normal, sem alterações. Observaram-se todas as fases de desenvolvimento das células germinativas, fase inicial de diferenciação: espermatogônia, a fase secundária com divisões meióticas responsáveis pela formação dos espermatócitos e espermatídes e a fase de diferenciação das espermatídes em espermatozóides, observaram-se também a presença das células de Leydig e as células de Sertoli (figura 5).

Figura 5 – Fotomicrografia dos testículos de *D. rerio*. A (controle) e B (100 mg.L^{-1}) Espermatogênese apresentando diversas fases de desenvolvimento gonadal de *D. rerio*. (EG) - Espermatogônia, (ET) - Espermatócitos, (EM) - Espermatíde, (EZ) – Espermatozoides; DE – Ducto Espermático; Células de Leydig (cabeça de seta); Célula de Sertoli (seta). Coloração (HE) 400x, barra 30 μm .



Fonte: autora.

As análises histológicas das gônadas das fêmeas de *D. rerio* do controle e 10 mg.L^{-1} EB revelaram padrão normal de distribuição e maturação gonadal, mostrando células em diferentes fases de desenvolvimento e ovários em diferentes estádios de

maturação gonadal (OECD 123, 2010), conforme características da própria espécie, haja vista que, *D. rerio* apresenta, em condições adequadas, o desenvolvimento assincrônico dos ovócitos, ou seja, apresenta desova contínua conforme a maturação das células germinativas (SILVA, 2016).

Na tabela 6 estão apresentadas o valor médio dos ovócitos e suas respectivas fases de maturação. Verificou-se uma redução nos ovócitos de estágio IV e V no tratamento com maior concentração de EB.

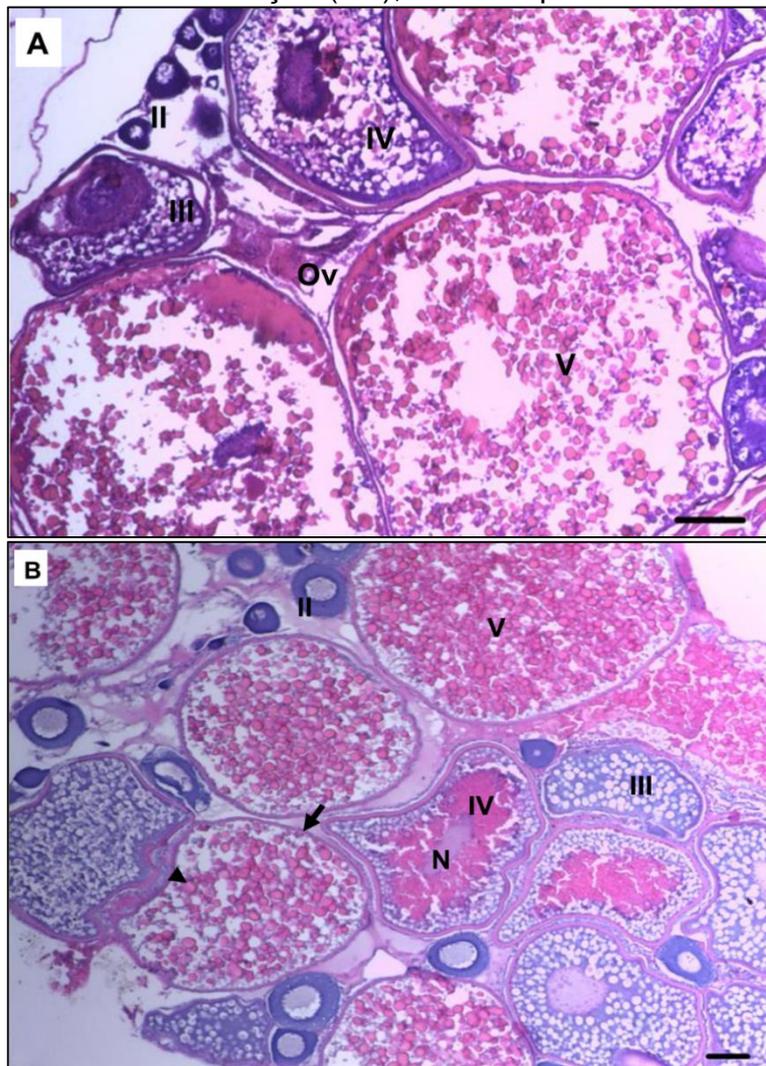
Tabela 6 – histologia ovário de *D. rerio* exposto ao EB de *Terminalia corrugata*.

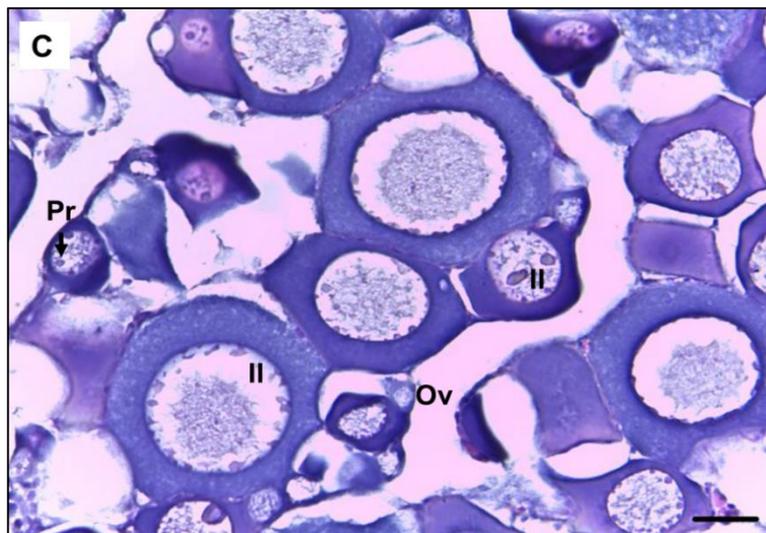
	Controle	10 mg.L ⁻¹	100 mg.L ⁻¹
Hipertrofia células perifoliculares	0,00 a	0,00 a	0,208 ± 0,07 b
Fases ovócitos I	0,22 ± 0,10 a	0,23 ± 0,09a	0,012 ± 0,02 b
Fases ovócitos II	4,87 ± 0,17 a	4,88 ± 0,14 a	7,628 ± 0,18 b
Fases ovócitos III	4,056 ± 0,29 a	3,44 ± 0,08 b	5,336 ± 0,16 c
Fases ovócitos IV	1,84 ± 0,28 a	0,92 ± 0,21 b	0,7 ± 0,16 c
Fases ovócitos V	1,62 ± 0,24 a	1,74 ± 0,10 a	0,228 ± 0,03 b

Letras diferentes nas linha indicam diferença estatística significativa (Kruskal-Wallis p < 0,05).

Nas Figuras 6 (A e B), é possível observar as fases de desenvolvimento ovocitário, I (ovogônias); II (ovócitos de estoque reserva), percebe-se grande núcleo em relação ao tamanho do ovócito; III (ovócitos com vacúolos lipídicos) nesta fase podemos ver o núcleo e o nucléolo mais evidentes, e seus vacúolos lipídicos mais acentuados; IV (ovócitos com vitelogênese lipídica e proteica), destaca-se também o envelope vitelogênico bem evidente; V (vitelogênese completa), grânulos de vitelo evidentes e em grande quantidade, ovócitos maduros (OECD, 2010). Para as fêmeas expostas ao EB a 100 mg.L⁻¹, foi possível observar um predomínio de ovócitos na fase I, II e III, e também a presença ovócitos perinucleares.

Figura 6 – Fotomicrografia dos ovários de *D. rerio*. A (controle, aumento 400x) e B (10 mg.L⁻¹ 100x) ovário apresentando ovócitos do *D. rerio* em diferentes fases de desenvolvimento oocitário. II - ovócitos estoques de reserva (Fase II); III - ovócito com vitelogênese lipídica (Fase III); IV - ovócito com vitelogênese lipídica e proteica (Fase IV); ovócito com vitelogênese completa (Fase V); C (100 mg.L⁻¹, aumento de 1000x) observa-se ovócitos de fase II. N - núcleo, seta – envelope vitelínico, cabeça de seta - grânulo de vitelo. Coloração (HE), barra 30 µm.





Fonte: autora.

Os resultados obtidos da histologia de gônadas de fêmeas, machos de *Danio rerio* indicam potencial de atuação de interferência endócrina. Okuzawa et al. (2003) comenta que o atraso no desenvolvimento das gônadas pode estar relacionado com o nível de atividade do hormônio de estimulação (GnRH) para secreção de gonadotrofinas tipo 2 (GTH II) importante para a maturação final dos ovócitos. Efeitos de disruptores endócrinos em peixes incluem fertilidade reduzida e efeitos sobre o desenvolvimento das gônadas (ANDERSEN et al. 2012). A possível presença de 5-HMF pode ter relação com a toxicidade reprodutiva verificada nesta pesquisa e a sua toxicidade foi descrita em embriões e adultos de *D. rerio* (JIANG et al., 2022^a; JIANG et al., 2022^b).

4 CONCLUSÕES

O extrato bruto de *T. corrugata* causou toxicidade reprodutiva em *Danio rerio* expostos a concentração de 100 mg.L⁻¹, especificamente nas fêmeas. Estas alterações estão relacionados a presença de compostos secundários na planta com a capacidade de alterar o metabolismo hormonal dos animais expostos, resultando em desordens reprodutivas observadas experimentalmente.

5 REFERÊNCIAS

ANDERSEN, L.; PETERSEN, GI.; GESSBO, Å. et al. Zebrafish *Danio rerio* and roach *Rutilus rutilus*: Two species suitable for evaluating effects of endocrine disrupting chemicals? **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v.4 p.275-282, 2012.

BERGER B.A.; KRIEBEL R.; SPALINK D.; SYTSMA, K.J. Divergence times, historical biogeography, and shifts in speciation rates of Myrtales. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, V.95, P. 116–136 2016.

COSTA, A. M. D.; MARIANO DE SOUZA, D. P.; CAVALCANTE, T. V.; ARAÚJO, V. L.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M. Plantas tóxicas de interesse pecuário em região de ecótono amazônia e cerrado. Parte II. Araguaína, Tocantins. **Acta Veterinária Brasilica**, v.5, n.3, p.317-324, 2011.

JIANG, U., ZHONG, Z.; WANG, W.; et al. 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde induces developmental toxicology and decreases bone mineralization in zebrafish larvae, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 254, 2022^a.

JIANG, Y.; GENG, N.; WANG, M.; et al. 5-HMF affects cardiovascular development in zebrafish larvae via reactive oxygen species and Wnt signaling pathways, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.262, 2022.^b

LOPES, D. I. S. **Toxicidade subcrônica e reprodutiva de extratos de *Buchenavia tomentosa* em ratos wistar**. 2013. 109 p. Tese de Doutorado em Ciência Animal Tropical. Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 3^o ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.2, 384p. 2009.

MAURIN, O.; GERE, J.; BANK, M. V. D. The inclusion of *Anogeissus*, *Buchenavia* and *Pteleopsis* in *Terminalia* (Combretaceae: Terminaliinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.184, p.312–325, 2017.

MAZZINGHY, C. L.; ADAMS, F. K.; MARUO, V. M. Toxicidade de *Buchenavia tomentosa* Eichler sobre a fertilidade e parâmetros reprodutivos em ratos. In: V Seminário de iniciação Científica da UFT, 2009.

MELLO, G. W. S.; OLIVEIRA, D. M.; CARVALHO, C. J. S.; PIRES, L. V.; COSTAS, F. A. L.; RIET-CORREA, F.; SILVA, S. M. M. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Norte Piauiense, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.1-9, 2010.

MELLO, G. W.S., OLIVEIRA D.M., CARVALHO, C. J. S., PIRES, L.V., COSTAS, F.A.L, RIET-CORREA, F., SILVA, S. M.M. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Norte Piauiense, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.1, p.1-09, 2010.

MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. et al. Fundamentos da moderna aquicultura. **Canoas: ULBRA**, 200 p. 2001.

NUNES, H. M. M.; PAIVA, J. A.; RAMOS, A. T.; MAIORKA, P. C.; MARUO, M. V. Effects of *Buchenavia tomentosa* consumption on female rats and their offspring. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v.32, n.4, p. 423-429, 2010.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. In: Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 229: **Fish Short Term Reproduction Assay**. Paris, 2012.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads **Fish Short Term Reproduction Assay**. Paris, 2010.

OKUZAWA, K.; NAOKI, K.; KOICHIRO G. et al. Effect of high water temperature on brain-pituitary-gonad axis of the red seabream during its spawning season. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.28, p.439-440, 2003.

PALMER, L. M.; MENSINGER, A. F. Effect of the Anesthetic Tricaine (MS-222) on Nerve Activity in the Anterior Lateral Line of the Oyster Toadfish, *Opsanus tau*. **Journal of neurophysiology**, v. 92, p. 1034-1041, 2004.

RIBEIRO, R. V., et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 205, 69-102, 2017.

SiBBR. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. 2021. *Buchenavia tomentosa* in: **Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/buchenavia_tomentosa>. Acesso em 07-10-2021

SiBBR. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. 2021. *Buchenavia tomentosa* in: **Ficha de Espécies do Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/buchenavia_tomentosa>. Acesso em 07-10-2021

STACE C.A. 2010. Combretaceae: *Terminalia* and *Buchenavia* with Abul-Ridha Alwan. Flora Neotropica Monograph 107. 2010.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book**. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 4th Edition. University of Oregon Press, Eugene. 2000.

CONCLUSÃO GERAL

A identificação química realizada no extrato acetático da *T. corrugata* indicou a presença de furufural e o 5-hydroxymethylfurfural, estas substâncias são tóxicas e podem estar relacionadas as lesões teciduais observadas nos animais, incluindo toxicidade reprodutiva. Estudos que verifiquem alterações hormonais causadas pelos frutos de *T. corrugata* em animais são importantes para melhor elucidação dos efeitos tóxicos, haja vista que, houve alterações reprodutivas em fêmeas e isto pode estar relacionado a desregulação endócrina. É fundamental ressaltar a importância ecológica e farmacológica de *T. corrugata*, com isso, sugere-se a restrição de animais de produção em período reprodutivo a locais em pastagens onde ocorra a *T. corrugata* durante o período de frutificação, afim de evitar a intoxicação destes animais e minimizar perdas na produção.