UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CONVENCIONAL E INTEGRATIVA

Gabriela Dias R.M. Tobias

Efeitos da exposição ao chumbo no peixe-zebra (*Danio rerio*) e avaliação do potencial protetor da *Eugenia involucrata DC*

Curitibanos, 2025.

Gabriela Dias R.M. Tobias

Efeitos da exposição ao chumbo no peixe-zebra (*Danio rerio*) e avaliação do potencial protetor da *Eugenia involucrata DC*

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa.
Orientador: Profª. Drª. Evelyn Winter da Silva, Dra.
Coorientador: Profª. Drª. Greicy Michelle Marafiga Conterato

Curitibanos, 2025

Tobias, Gabriela Dias Rodrigues de Mello
Efeitos da exposição ao chumbo no peixe-zebra (Danio rerio) e avaliação do potencial protetor da Eugenia involucrata DC /Gabriela Dias Rodrigues de Mello Tobias ; orientador, . Evelyn Winter da Silva, coorientador, Greicy Michelle Marafiga Conterato, 2025.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa, Curitibanos, 2025.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. 2. Água. 3. Chumbo. 4. Peixe-Zebra. 5. Eugenia involucrata. I. Silva, . Evelyn Winter da . II. Conterato, Greicy Michelle Marafiga. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. IV. Título.

Gabriela Dias Rodrigues de Mello Tobias

Efeitos da exposição ao chumbo no peixe-zebra (*Danio rerio*) e avaliação do potencial protetor da *Eugenia involucrata DC*

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 17 de Março de 2025 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

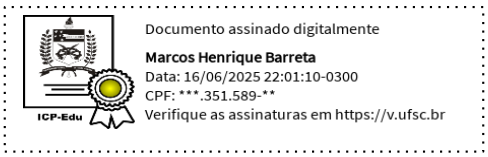
Prof.(a) Viviane Glaser, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Karoline Felisbino, Dr.(a)
Instituição University of Kentucky

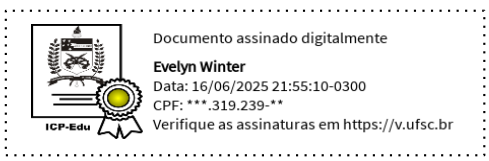
Prof.(a) André Lucio Fontana Goetten, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Graciele Cristiane More Manica Benetti, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre/Mestra em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof.(a) Evelyn Winter da Silva, Dr.(a)
Orientador(a)

Curitibanos, 2025

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido na trilha certa durante este processo de pesquisa e conclusão de minha dissertação.

Sou grata à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

Dedico um agradecimento especial às minhas orientadoras pelo incentivo e pela dedicação do seu escasso tempo a minha dissertação.

Minha gratidão para o Dr. André Goetten que muito me auxiliou nos experimentos e me ensinou com paciência e clareza em meus momentos de dúvida.

Agradeço aos meus colegas orientandos que trabalharam comigo para a criação do biotério que tornou possível a realização deste projeto.

Também desejo agradecer à Universidade Federal de Santa Catarina e a todos os professores do meu curso pela excelência em seus trabalhos.

Resumo

A água é um recurso essencial para a vida e indispensável no cotidiano do ser humano, todavia, é um recurso finito, sujeito a alterações climáticas e ações antrópicas, que podem causar impactos severos em um ecossistema, resultando em contaminações por esgotos e outras substâncias de potencial tóxico, como por exemplo os metais. O chumbo é um dos mais tóxicos contaminantes dos corpos d'água, com a casuística de intoxicação variando de alterações do sistema nervoso central, mudanças comportamentais e alterações do trato gastrointestinal, independente da espécie, até nos casos mais graves ocorrendo a possibilidade de óbito. Para avaliar o efeito *in vivo* do chumbo em concentrações 10 vezes maiores e 10 vezes menores do padrão de qualidade da água determinado pelo CONAMA, foi utilizado larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*) em exposições de até 96h. Neste estudo, também avaliou-se o possível efeito protetor do extrato hidroalcoólico dos frutos da cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata*) sobre alterações morfológicas, comportamentais, de estresse oxidativo e de genes envolvidos na defesa antioxidante e na apoptose. Esta planta já apresentou atividades antioxidante, antitumoral e antiinflamatória previamente descritas em estudos *in vitro*, estabelecendo-se para este estudo uma concentração do extrato na faixa de 12,5 mg/L e 100 mg/L. Os resultados deste trabalho mostraram que o chumbo causou baixa mortalidade, mas induziu alterações morfológicas já em concentrações baixas. O extrato de *E. involucrata* não ofereceu proteção contra os efeitos nocivos do chumbo na concentração utilizada durante o tempo de exposição na espécie estudada. Não obstante, o reconhecido potencial antioxidante *in vitro* dos frutos de *E. involucrata* sugere que estudos adicionais são necessários a fim de melhor elucidar o potencial biológico desta espécie em condições relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-Chave: Água, Chumbo, Peixe-zebra, *Eugenia involucrata*.

Abstract

Water is an essential resource for life and indispensable in the daily lives of human beings, notwithstanding, it is a finite resource, subject to climate change and human actions, which can cause severe impacts on an ecosystem, resulting in contamination by sewage and other potentially toxic substances, such as metals. Lead is one of the most toxic contaminants of water bodies, with cases of poisoning ranging from alterations to the central nervous system, behavioral changes and alterations to the gastrointestinal tract, regardless of the species, to the possibility of death in the most severe cases. To evaluate the in vivo effect of lead in concentrations 10 times higher and 10 times lower than the water quality standard determined by CONAMA, zebrafish larvae (*Danio rerio*) were used in exposures of up to 96-hour. This study also evaluated the possible protective effect of the hydroalcoholic extract of wild cherry (*Eugenia involucrata*) fruits on morphological, behavioral, oxidative stress and gene alterations involved in antioxidant defense and apoptosis. This plant has previously shown antioxidant, antitumor and anti-inflammatory activities in in vitro studies, and for this study, an extract concentration ranging from 12.5 mg/L to 100 mg/L was established. The results of this study showed that lead caused low mortality, but induced morphological alterations even at low concentrations. The extract of *E. involucrata* did not offer protection against the harmful effects of lead at the concentration used during the exposure time in the species studied. Nevertheless, the recognized in vitro antioxidant potential of *E. involucrata* fruits suggests that additional studies are necessary in order to better elucidate the biological potential of this species under conditions related to oxidative stress.

Keywords: Water, Lead, Zebrafish, *Eugenia involucrata*.

Lista de Figuras

Figura 1. Árvore de *Eugenia involucrata*.....29
Figura 2. Frutos de *Eugenia involucrata* 30
Figura 3. Seleção e Plaqueamento de ovos.....34
Figura 4. Caracterização morfológica das larvas.....41
Figura 5. Mortalidade observada em larvas de *Danio rerio* **expostas ao chumbo**.....43
Figura 6. Avaliação da toxicidade de chumbo em relação ao tempo de exposição.....44
Figura 7. Escore de toxicidade induzido por chumbo após 96 horas de exposição.....45
Figura 8. Alterações morfológicas em *Danio rerio*.....46
Figura 9. Avaliação da taxa de edema de pericárdio em larvas expostas ao chumbo.....47
Figura 10. Avaliação da taxa de curvatura de coluna em larvas expostas ao chumbo.....48
Figura 11. Avaliação da taxa de nanismo em larvas expostas ao chumbo.....49
Figura 12. Avaliação da taxa de alterações de movimento em larvas expostas ao chumbo.....51
Figura 13. Avaliação da taxa de hiperatividade em larvas expostas ao chumbo.....52
Figura 14. Mortalidade observada em larvas de *Danio rerio* **expostos a diferentes concentrações de extrato de** *E. involucrata*.....54
Figura 15. Escore de toxicidade induzido por extrato de *E. involucrata* **após 96 horas de exposição**.....55
Figura 16. Mortalidade observada em larvas de *Danio rerio* **expostas ao chumbo e ao extrato de** *E.involucrata*.....57
Figura 17. Avaliação da toxicidade de chumbo e do extrato de *E.involucrata* **em relação ao tempo de exposição**.....59
Figura 18. Escore de toxicidade na exposição ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata* **após 96 horas de exposição**.....60
Figura 19. Avaliação da taxa de edema de pericárdio em larvas expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata*.....61
Figura 20. Avaliação da taxa de curvatura de coluna em larvas expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata*.....62
Figura 21. Avaliação da taxa de nanismo em larvas expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata*.....63
Figura 22. Avaliação da taxa de alterações de movimento em larvas expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata*.....64

Figura 23. Níveis de SNHP em larvas de *Danio rerio* **expostas ao chumbo e ao extrato** de *E.involucrata***.....66**
Figura 24. Peroxidação Lipídica em larvas de *Danio rerio* **expostas ao chumbo e ao extrato de** *E.involucrata***.....68**
Figura 25. Efeito do chumbo associado ou não ao extrato de *E.involucrata* **na expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante.....71**
Figura 26. Efeito do chumbo associado ou não ao extrato de *E.involucrata* **na expressão de COX1.....74**
Figura 27. Efeito do chumbo associado ou não ao extrato de *E.involucrata* **na expressão de genes envolvidos na morte celular.....75**
Figura 28. Alterações morfológicas vistas durante as exposições.....97
Figura 29. Curvatura de coluna em larva de peixe-zebra exposta ao chumbo e ao chumbo com extrato.....98
Figura 30. Desenvolvimento de somitos de embrião e larva de peixes-zebra saudáveis.....99
Figura 31. Anatomia normal de um embrião e larva de peixe-zebra saudáveis.....100

Lista de Tabelas

Tabela 1. Alterações avaliadas em larvas de *Danio rerio*.....36
Tabela 2. Primers analisados por qPCR 39

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATP	Adenosina Trifosfato
ATSDR	*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*
BCL2	Célula B de linfoma 2
CAT	Catalase
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COX1	Citocromo-C-Oxidase
DL50	Dose Letal
EPA	*Environmental Protection Agency*
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GSH	Glutationa Reduzida
GPX	Glutationa Peroxidase
GST	Glutationa S-Tranferase
HMOX-1	Heme-Oxigenase-1
Hpf	Horas pós fertilização
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LAFRA	Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal
Nrf2	Fator Nuclear Eritróide Relacionado ao Fator 2
OECD	*Organization for Economic Co-operation and Development*
P53	Proteína Tumoral P53
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido Ribonucléico
SHNP	Tióis Não Protéicos
SINGREH	Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD 2	Superóxido Dismutase 2
TBARs	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TGI	Trato Gastro Intestinal
TUBA-I	Tubulina α-I
UCP-2	Proteína Desacopladora 2
WHO	*World Health Organization*

Sumário

1.Introdução.....15
2. Revisão Bibliográfica.....17
2.1.Metais na água.....17
2.2.Toxicologia dos Metais.....19
2.3.Peixe-zebra (Danio rerio) como modelo animal de pesquisa em toxicologia.....23
2.4.Estresse Oxidativo.....25
2.5.Rspiração Celular.....26
2.6.Morte Celular.....27
2.7.Antioxidantes.....28
2.8.Eugenia involucrata DC.....29
3.Objetivos.....30
3.1.Objetivo geral.....30
3.2.Objetivos específicos.....31
4.Materiais e Métodos.....31
4.1.Preparo da solução de chumbo para exposição em Danio rerio.....31
4.2. Preparo do extrato dos frutos de Eugenia involucrata.....32
4.3.Manutenção dos animais.....32
4.4. Avaliação de mortalidade e parâmetros morfológicos em larvas de peixes Danio rerio expostos ao chumbo.....33
4.5. Avaliação da toxicidade do extrato.....36
4.6.Avaliação da toxicidade do chumbo associado ao extrato vegetal.....37
4.7.Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo.....37
4.8.Extração de RNA.....38
4.9. Obtenção de DNA complementar (cDNA.....38
4.10.Reação em cadeia da polimerase (qPCR.....39
4.11. Análise Estatística.....40
5.Resultados e Discussão.....41
5.1.Avaliação do efeito do chumbo através de parâmetros de mortalidade e morfológicos.....41
5.2. Avaliação da toxicidade do extrato.....53

5.3.Avaliação do efeito protetor do extrato de E. Involucrata frente à exposição ao chumbo.....56
5.4. Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo.....66
5.4.1. Dosagem de tióis totais não proteicos.....66
5.4.2. Avaliação da peroxidação lipídica.....67
5.5. Avaliação da expressão gênica em resposta ao chumbo e extrato vegetal.....70
6.Conclusão.....76
7.Referências.....77
8. Apêndices 97
9. Anexos.....99

1.Introdução

O planeta Terra tem cerca de três quartos de sua superfície coberta pela água, embora, deste volume, uma porção significativamente menor seja composta por água doce e potável. Essa parcela disponível para uso tem sua disposição variável nas geleiras (70%), no subsolo (30%) e em mananciais na superfície (0,3%). (AUGUSTO, L. G. S. *et al.*, 2012).

Historicamente, já se observa que, desde o surgimento das primeiras civilizações no oriente médio, na região do Crescente Fértil, a água sempre foi um recurso de fundamental importância para o homem, que conseguiu utilizá-lo durante milhares de anos sem que se registrasse uma grande degradação. Entretanto, a partir do renascimento urbano e comercial na Europa Ocidental, no final da Idade Média, o aumento populacional teve um impacto fundamental nas relações do homem com o meio ambiente. Segundo March Bloch:

> *"A própria terra cultivável, da qual a aldeia retirava o seu sustento, tinha que ser, proporcionalmente ao número dos habitantes, muito mais vasta do que hoje. Pois naquele tempo a agricultura era uma grande devoradora de espaço. Nas terras lavradas, incompletamente cavadas e sempre privadas de adubos suficientes, as espigas não cresciam bem criadas nem muito bastas.[1]"*

O aumento populacional e consequente aumento das ações antrópicas no meio-ambiente levaram a disparidade na distribuição e qualidade deste recurso. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2011), essas condições, em especial aquelas relacionadas ao saneamento básico já causaram em torno de cinco milhões de mortes entre a seca e o aumento das doenças transmitidas pela água contaminada devido à falta de saneamento, tendo os metais potencialmente tóxicos que tendem a estar presentes em águas contaminadas associados a diversos problemas de saúde.

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2020), no Brasil, a exposição aos metais está associada ao desenvolvimento de câncer, que é a segunda principal causa de morte por doenças no Brasil, bem como provável etiologia para a manifestação de alterações neurocomportamentais e hepatotóxicas.

Dentre os metais considerados altamente tóxicos encontra-se o chumbo que, segundo Cebra & Cebra (2004), a casuística de toxicidade aguda e crônica entre humanos e animais

---

[1] BLOCH, March. A Sociedade Feudal. Lisboa. Edições 70, 1940.

varia de acordo com o meio de contaminação, a idade e o tempo de exposição. Sua sintomatologia tem especificidades dependendo da espécie, embora de forma geral, os indivíduos, humanos ou não, apresentem alterações no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central, o que pode levar a óbito nos casos mais graves.

As águas, quando contaminadas por substâncias prejudiciais à saúde, contribuem para o processo de bioacumulação em organismos aquáticos, o que, de acordo com Hobbs, Bigot & Smith (2020) descreve, de forma potencializada, os danos ao meio ambiente local, levando assim ao desequilíbrio do ecossistema, trazendo, então, além do risco de intoxicação nos diferentes níveis tróficos, um crescente processo de eutrofização que tornaria inviável qualquer aproveitamento do corpo de água afetado, seja na pesca ou no lazer, ou mesmo na oferta de água para os animais, que, por sua vez, tende também a afetar a saúde dos seres humanos. Outro grande fator de impacto na contaminação por metais, segundo Francisco, Troya & Agüera (2003), está na contaminação das pastagens que servem de alimento para animais domésticos de produção e em estruturas humanas adjacentes, o que, por sua vez, tende a afetar a economia local.

O zebrafish ou peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno peixe tropical de água doce e vertebrado. Apresenta, de acordo com Lee & Freeman (2014), uma série de vantagens em relação a outros modelos de vertebrados utilizados em pesquisas por ter alta fecundidade, rápido desenvolvimento, transparência durante a embriogênese, baixo custo, facilidade de manutenção, capacidade de absorver compostos dissolvidos em água, além de sua genética ter uma semelhança de 70% com o genoma humano. Os efeitos de metais vêm sendo avaliados em peixes-zebra através de ensaios de genotoxicidade, comportamento animal, reprodução, entre outras formas.

Quando ocorre danos causados pela exposição por metais, um dos efeitos observados é o estresse oxidativo, o qual resulta em danos celulares e teciduais de difícil recuperação e um prognóstico reservado. Sendo assim, é possível oferecer proteção ao organismo na forma de compostos antioxidantes, mantendo, portanto, a homeostasia celular. (LIVINGSTONE, D. R. 2001; PISOSCHI, A. M. & POP, A. 2015; FU, Z. & XI, S. 2019; KATABA, A. *et al*., 2020; ALQHATANI, S. W., ALBASHER, G. 2021; PAITHANKAR, J. G *et al*., 2021; SANTOS, A. S. E. *et al*., 2021).

Infante *et al.* (2016) e Schulz *et al.* (2020) em seus estudos buscaram identificar na biodiversidade, em especial na flora brasileira, substâncias que pudessem ser consideradas antioxidantes naturais, mais comumente vistos na forma de extratos de plantas, e/ou de seus compostos isolados como forma de remediação ou prevenção desses danos.

A *Eugenia involucrata* DC popularmente conhecida como “cerejeira-do-mato” é uma espécie do gênero *Eugenia L*. (*Myrtaceae*), nativa de Santa Catarina e ainda pouco conhecida. Estudos iniciais *in vitro* com esta planta apresentaram atividades antioxidantes, antitumorais e/ou anti-inflamatórias de seus frutos, sementes e folhas. (NICÁCIO, A. N. *et al.*, 2017; TOLEDO, A. P. *et al.,* 2018; GIRARDELO, J. R. *et al.,* 2020; MANNINO, G. *et al.,* 2022).

A avaliação do perfil químico de extratos das folhas e frutos de *E. involucrata* nos estudos de Toledo *et al.* (2018), Girardelo *et al*. (2020) e Mannino *et al. (*2022), por exemplo, revelaram a presença de saponinas, de esteroides, de flavonoides e de taninos. Substâncias, estas, que diante do exposto potencialmente podem proteger contra condições relacionadas ao estresse oxidativo.

Este estudo avaliou a toxicidade do chumbo em modelo animal de peixe-zebra, bem como realizou um estudo inédito para avaliar o possível efeito protetor do extrato do fruto da *E. involucrata* em um organismo vivo.

2.Revisão Bibliográfica

2.1.Metais na água

Estudos feitos por Augusto *et al*. (2012) sobre a importância da água como recurso natural com grande impacto na vida em sociedade e na natureza são variados e explorados profundamente, como também a sua deveras limitada distribuição para uso potável. O volume de água recobre aproximadamente três quartos da superfície do planeta Terra e dessa quantidade a disposição de água apta para uso humano varia entre geleiras (70%), subsolo (30%) e mananciais na superfície (0,3%).

Ao longo das eras, segundo Pagliosa *et al*. (2006), áreas com presença de água contaminada, principalmente água doce, apresentaram um impacto notável em seu equilíbrio ecológico, levando a uma consequente diminuição da disponibilidade no decorrer do tempo. Parcialmente, essa diminuição se deu por mudanças naturais na geografia e no próprio clima, porém, a partir do momento em que o ser humano passou a viver em sociedade, parte da diminuição desses corpos d’água doce se deu devido a atividade humana, uma vez que, o crescimento das civilizações foi em muito influenciado pela presença desse recurso tão importante, logo, estes eram, e ainda são, corpos d’águas suscetíveis às ações antrópicas.

O desequilíbrio ecológico, como também a contaminação e perda da flora e da fauna local como retrata Dias, Parizotto & Bonetti (2014) é um possível resultado das consequências das ações do homem no decorrer do avanço da humanidade.

A distribuição de água potável e água doce propícia para uso humano não é, todavia, igual na sociedade atual. Embora as condições geográficas e de clima afetem o volume de água presente em uma região, a própria gestão desse recurso se mostra relacionada com a condição social desse local, como mostram estudos onde a parcela de água potável e saneamento básico é relativa a desigualdade social. Segundo a World Health Organization (WHO), (2011), essa disparidade no acesso a esse recurso e ao tratamento de esgoto e outros efluentes já causou em torno cinco milhões de mortes entre a seca e a falta de saneamento, essa última também traz um aumento das doenças transmitidas pela água contaminada.

A WHO (2011) também é a organização mundial responsável por publicar diretrizes para qualidade de água potável, que cada país deve usar como orientação. No Brasil, há organizações nacionais e estaduais que lidam com a qualidade, tratamento e disponibilização de água. Parte deste processo é desenvolvido pelo Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SINGREH) e/ou pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que juntos estabelecem condições e padrões para lançamento de efluentes em corpos d'água (resolução 393/2007, 397/2008, 410/2009 e 430/2011).

Outras providências destes órgãos são estipular padrões para a quantidade de substâncias que podem estar presentes na água, substâncias estas como os metais: Chumbo, Arsênio, Cádmio, Ferro, Zinco, entre outros inorgânicos e orgânicos.

De acordo com a CONAMA, a classificação das classes de água se dividem a partir dos tipos de água disponíveis, que seriam Águas Doces, Salinas e Salobras, por isso, segundo a resolução 357/2005 da CONAMA o teor permitido de chumbo para Água Doce classe I é de 0,01 mg/L, valor utilizado como base para a realização deste estudo (Ministério da Saúde, 2005).

A contaminação deste recurso aquático por substâncias prejudiciais à saúde não se limita a coluna da água, mas também ocorre em sedimentos, o que, por sua vez, contribui para o processo de bioacumulação em organismos aquáticos e em um ciclo, leva ao desequilíbrio do ecossistema e danos ao meio ambiente local, afetando por sua vez, a saúde dos humanos que ali vivem, prejudicando a economia local e a cultura de subsistência. Deste modo, este crescente processo de eutrofização, portanto, pode tornar inviável qualquer aproveitamento do corpo de água afetado e dependendo do nível, esse tipo de dano pode perdurar por anos, como foi demonstrado em estudos envolvendo os recentes desastres no Brasil sobre os rompimentos das

barragens de Mariana e Brumadinho. (GABRIEL, F. A. *et al.*, 2020; HOBBS, D., BIGOT, M. & SMITH, R. E. W., 2020; DUARTE, E. B. *et al.*, 2021; TERAMOTO, E. H. *et al.*, 2021; MALUF, C.B. *et al.*, 2022; PEIXOTO, S.V. & FRÓES-ASMUS, C.I.R., 2022; WILD, M. *et al.*, 2023).

2.2.Toxicologia dos metais

Uma das formas em que os metais podem ser categorizados é em leves ou pesados segundo o peso molecular. Outro modo de classificação, observado na biologia é: a) metais não essenciais, como chumbo (Pb), alumínio (Al), mercúrio (Hg), estanho (Sn) e cádmio (Cd), ou b) essenciais, como ferro (Fe), molibdênio (Mo), cobalto (Co), cobre (Cu) e zinco (Zn). Os metais essenciais se mostram necessários para o organismo em reações metabólicas, e não são produzidos pelo organismo tendo uma demanda que é preenchida em sua maioria através da alimentação, sendo que sua falta pode levar a deficiências metabólicas e na homeostase do indivíduo, e o seu excesso também pode trazer danos à saúde. Os metais não essenciais por outro lado, não mostram um papel biológico conhecido, e pode haver intoxicação mesmo nas menores quantidades, sendo sua toxicidade dose dependente (KENNEDY, C. J., 2011; YIN, J. *et al*., 2017).

Há uma ampla gama de estudos relatando os danos que uma substância tóxica pode causar a um organismo vivo, e algumas das substâncias estudadas com maior impacto ambiental, socioeconômico e na saúde são os metais. Um grande número de patologias pode ser atribuído a intoxicação por metais. As revisões de Francisco & Troya (2003) e Guitart *et al*. (2010) citam estudos a respeito do envenenamento animal por substâncias como o chumbo, que induzem danos no trato gastrointestinal, além de alterações comportamentais em aves e gado, em diferentes idades e tempos de exposição.

Uma pesquisa realizada por Ferreira, Horta & Cunha (2010) avaliou a concentração de metais pesados tanto na água quanto nos sedimentos da baía de Sepetiba, RJ, e correlacionou os valores dessas concentrações com as concentrações presentes nos órgãos de uma espécie aviária presente na região (*Nycticorax nycticorax*), constatando tanto no fígado quanto no rim desta ave um acúmulo de zinco, cobre, níquel, cádmio e cromo, sendo que o cádmio foi o metal com maior número de correlações positivas significativas entre seu teor na água e no fígado do animal em análise.

Ainda cabe considerar que uma das possíveis causas de câncer em humanos, principalmente no pulmão, ocorre com a exposição a metais pesados como o chumbo, através de exposições ocupacionais ou ambientais (SALMAN, M. *et al.*, 2011; INCA, 2020).

Outro fator de influência da toxicidade por metais é o meio pelo qual a intoxicação ocorre. Com o chumbo, por exemplo, pode acontecer com o descarte de efluentes de empresas que geram resíduos com essa substância, rejeitos de partes de ferramentas, pastos em áreas que eram de mineração ou mesmo campos de tiro (STROJAN, S.T. & PHILLIPS, C.J.C., 2002; RODRÍGUEZ-ESTIVAL, J., BARASONA, J. A. &MATEO, R. 2012; ROEGNER, A. *et al.*, 2013; JOHNSEN, I. V. & AANEBY, J. 2019; TERAMOTO, E. H. W, 2021).

A água para irrigação, abastecimento humano e dessedentação dos animais pode apresentar-se como fonte de envenenamento por metais devido a possíveis estruturas comprometidas. Pesquisas feitas por organizações governamentais como CDC (2023) e EPA (2024) observaram casos de intoxicação por metais na atividade diária, através de canos que continham chumbo em sua composição. Uma pesquisa publicada por Veterinary Record (2016) constatou casuística de intoxicação por chumbo em gado leiteiro devido a ingestão de baterias que não foram devidamente descartadas, e Raisbeck (2020) observou intoxicação em rebanho através da água contaminada. Algo semelhante condiz com os achados de Francisco, Ruiz & Troya (2003), que observaram intoxicação por chumbo em aves (de vida livre e domésticas) que ingeriram pellets de balas de chumbo ao confundir com gastrólitos. Ali, Khan & Ilalhi (2019) observaram que além de presença natural no ambiente através do intemperismo de rochas com metais em sua composição ou erupções vulcânicas, por exemplo, por ações antrópicas com alocação incorreta de rejeitos, ou por desmatamento que permite erosão de solo com alto teor de metais pode ocorrer contaminação do ambiente.

Os principais danos induzidos por metais tóxicos nos organismos vivos em geral estão relacionados ao estresse oxidativo, os quais resultam em danos celulares e teciduais com um prognóstico reservado, devido a difícil recuperação e gravidade dos danos. (LIVINGSTONE, D. R., 2001; SPINOSA, GÓRNIAK & PALERMO-NETO, 2020; PAITHANKAR, J. G. *et al*., 2021).

O chumbo, de fórmula química Pb, é um elemento natural presente na crosta terrestre e membro do grupo 14 da tabela periódica, é um metal branco-azulado ou cinza-azulado lustroso, dependendo da temperatura e pressão em que se encontra. É um metal com baixa condutividade, baixa dureza e com baixo ponto de fusão, portanto altamente maleável, também é resistente a corrosão. No ambiente é comumente encontrado na forma mineral, em conjunto com enxofre

ou oxigênio, o mineral de Pb mais importante é a galena (PbS), outros minerais comuns que contêm Pb incluem anglesita ($PbSO_4$), cerusita ($PbCO_3$) e minium (Pb_3O_4) (ATSDR, 2020).

A toxicose por chumbo (plumbismo) mostra uma casuística que varia de aguda a crônica, dependendo de fatores como idade, espécie e o manejo utilizado. Em animais jovens e aqueles que consomem pastagens, a contaminação se dá por alimento e/ou água contaminada, bem como por ingestão de outras fontes como cartuchos de bala ou até mesmo baterias que contenham chumbo, por exemplo. Já em humanos, além da contaminação por ingestão, também há a contaminação por itens de construção, artesanato e pesca e tiro esportivo, por exemplo. Estas fontes de transmissão, por sua vez, trazem situações que tendem a afetar a economia do local, pois o contágio destes animais pelo chumbo não só é constatado na carne dos mesmos, como também na mão e roupa dos que manejam e nas superfícies de trabalho com estes animais infectados (FRANCISCO, N. De, RUIZ, J. D. & TROYA, E. I., 2003; CEBRA, C. K. & CEBRA, M. L., 2004; KRAMETTER-FROETSCHER, R. *et al*., 2007; ROEGNER, A. *et al*., 2013).

Em relação a toxicocinética do chumbo, sua absorção ocorre por todas as vias, embora a via respiratória seja a mais rápida. A intoxicação por via oral, forma mais predominante na Medicina Veterinária, sofre influência da solubilidade do chumbo, o qual tem facilidade de absorção pelo trato gastrointestinal. A casuística mostra que animais jovens têm uma ampla margem de absorção do chumbo devido à sua fisiologia, que nesta fase, pela necessidade vinda do metabolismo mais ativo, possuem os enterócitos em desenvolvimento, com maior permeabilidade e uma barreira intestinal menos desenvolvida, portanto, menos seletiva, permitindo, assim, a absorção de agentes tóxicos como o chumbo em um nível maior que animais mais maduros e idosos. (CEBRA, C. K. & CEBRA, M. L., 2004; SPINOSA, GÓRNIAK & PALERMO-NETO, 2020).

Outro momento analisado é o caso de deficiência nutricional, no qual ocorre hipocalcemia, o que impede a competição entre os íons de cálcio e chumbo, promovendo uma maior absorção do metal e consequentemente intoxicação. Diferente de outros metais, a absorção por via cutânea é pouco significativa, exceto em casos de perfurocortantes como projéteis, que se alojam em tecidos moles, onde podem ser solubilizados e distribuídos no organismo. Uma outra forma de absorção do chumbo no organismo é vista no desenvolvimento embrionário resultante de contágio pela placenta. A excreção dessa substância foi observada pela via urinária, fezes ou leite. (CEBRA, C. K. & CEBRA, M. L., 2004; SPINOSA, GÓRNIAK & PALERMO-NETO, 2020; WANI, A. L., ARA, A & USMANI, J. A., 2015)

Em relação a distribuição do chumbo nos organismos, o mesmo tende a ter uma concentração maior nos eritrócitos, seguida de tecido ósseo. Esse reservatório no osso também possibilita uma reativação da intoxicação quando ocorre a falta de cálcio no organismo, como em casos de osteoporose e prenhez. O chumbo também age no sistema nervoso central ao interferir na ação da acetilcolina, noradrenalina, dopamina, GABA e na reação celular ao interferir na fosforilação oxidativa mitocondrial (CEBRA, C. K. & CEBRA, M. L., 2004; SPINOSA, GÓRNIAK & PALERMO-NETO, 2020; WANI, A. L., ARA, A & USMANI, J. A., 2015; JOHNSEN, I. V. & AANEBY, J. 2019)

A sintomatologia da intoxicação por chumbo tem especificidades dependendo da espécie afetada. Em humanos há lesões do sistema nervoso central, função pulmonar reduzida, dano hepático, cólicas gastrointestinais, alterações hematológicas como anemia e disfunção cardiovascular, além de alterações comportamentais, ademais, casos graves de intoxicação podem levar a óbito. (PETERSON, S. *et al.*, 2011; CDC, 2023; EPA, 2024)

A intoxicação aguda em animais tende a apresentar sinais de encefalopatia e outras alterações gástricas. Em bovinos, há dificuldade de ficar em estação, hiperestesia, cegueira (parcial ou total) que pode levar a acidentes graves, nistagmo, opistótono, agressão, convulsão recorrente que pode levar a óbito, sialorréia, bruxismo, atonia ruminal e constipação que pode levar a diarreia enegrecida e fétida, semelhante ao que ocorre em suínos. Na intoxicação crônica por chumbo em bovinos, observou-se inibição do crescimento de bezerros e alterações de comportamento como isolamento e agressividade. Em ovinos, a casuística mostra paralisia de membros pélvicos, presença de reticulócitos no hemograma de exemplar adulto, com anemia normocítica normocrômica e imunossupressão. Em equinos, há alterações respiratórias devido à paralisia do nervo laríngeo recorrente, regurgitação com possível sufocamento e pneumonia aspirativa, bem como anorexia, dor abdominal, paralisia dos membros (pélvicos e torácicos), depressão do sistema nervoso central, convulsões e óbito. Para cães e gatos, os sinais mais observados são de alteração do comportamento, apatia, ataxia, nistagmo, opistótono, convulsões e possibilidade de cegueira, além de êmese, diarreia, anorexia e dor abdominal. Gatos, especificamente, apresentam poliúria, polidipsia, megaesôfago e disfagia. Em aves, os sinais observados de anemia, alterações intestinais, anorexia com consequente queda de peso, paralisia, ataxia e outros sinais do sistema nervoso central (opistótono e convulsões). (CEBRA, C. K. & CEBRA, M. L., 2004; KRAMETTER-FROETSCHER, R. *et al*., 2007 ; GUITART, R. *et al*., 2010; CHEN, J. *et al*., 2012; ROEGNER, A. *et al*., 2013; VETERINARY RECORD, 2020, 2022).

A avaliação da toxicidade do chumbo no desenvolvimento embrionário e/ou fetal, já foi analisada *in vivo* através de modelos de pesquisa com roedores e peixes, como o peixe-zebra (*Danio rerio*), assim como ensaios toxicológicos que avaliam alterações físicas e comportamentais expostos a substâncias nocivas. (SIPPEL, A. J. A., GERACI, J. R. & HODSON, P. V. 1983; EUBIG, P. A. *et al.,* 2010; DOU, C. & ZHANG. 2011; XU, Y. *et al*., 2023).

2.3.Peixe-zebra (Danio rerio) como modelo animal de pesquisa em toxicologia

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é uma espécie de peixe tropical de água doce, nativo do sul da Ásia. As condições ambientais onde esse peixe se desenvolveu permitiram uma boa tolerância a grandes variações no padrão de qualidade da água, o que o tornou atraente tanto na aquariofilia quanto na área acadêmica, em pesquisas sobre sua biologia e sua aplicação como modelo de estudo *in vivo*. Embora fossem pesquisados antes, foi a partir da década de 80, através de um estudo de George Streisinger, que trouxe técnicas para estudar a genética desses peixes, que estes animais passaram a ser amplamente usados como modelos de pesquisa *in vivo* aplicados a estudos em diversas áreas de pesquisa. (STREISINGER, G. *et al.,* 1981; BRADFORD, Y.M. *et al.,* 2017).

Os peixes-zebra são organismos vertebrados aquáticos que além de um grande número de genes específicos da espécie, possuem cerca de 70% dos genes em comum com o ser humano (HOWE, K. *et al.,* 2013; TAI, J. K. A. C & FREEMAN, J. L., 2020), sendo uma boa escolha para esta pesquisa *in vivo* por seus benefícios como baixo custo e fácil manejo comparado a outros vertebrados. (LELE, Z. & KRONE, P. H. 1996; WESTERFIELD, M. 2000; BRANNEN, K. C. *et al*., 2010; DAL, N-J. K. *et al*., 2022). Em biotério, é possível atingir as condições ideais de desenvolvimento e reprodução do peixe-zebra. Cada fêmea pode dispor de até 200 ovos por desova, e a eclosão das larvas se dá entre 48 a 72 horas, sendo todo o desenvolvimento embrionário facilmente observado em estéreo microscópios, devido ao seu tamanho e transparência. (HILL, A. J. *et al*., 2005)

Os peixes em geral são bons indicadores da condição ambiental, uma vez que a absorção de contaminantes se dá pelas brânquias, trato digestivo e pele, em graus variados, dependendo da toxicidade dos contaminantes, de qual tipo é, qual espécie está sendo afetada e em qual fase da vida. Estudos apontam que estágios embrionários e larvais dos peixes tendem a ser mais sensíveis a intoxicações quando comparados a outras fases da vida, e os sinais de intoxicação

mostram-se como atraso no desenvolvimento, deformidades morfológicas e funcionais e mortalidade. (OECD, 2013; KATABA, A., *et al*, 2020, 20222).

A toxicidade de uma substância pode ser avaliada nos diferentes sistemas de um organismo em alterações de grau variável, um exemplo seria um estudo feito por Horie *et al.* (2017) que avaliou efeitos letais e subletais de 20 substâncias químicas em embriões de peixe-zebra, até 8 dias pós fertilização (dpf). Uma correlação positiva foi encontrada entre alteração significativa da frequência cardíaca e mortalidade, e nas concentrações menores observou-se efeitos subletais como edema, curvatura de coluna e ausência de inflação da bexiga natatória.

Brannen *et al.* (2010) desenvolveram um ensaio de teratogenicidade para prever o potencial teratogênico de 31 produtos químicos em embriões de peixe-zebra. Dentre os parâmetros morfológicos analisados estavam o comprimento do corpo, pigmentação, morfologia craniofacial, da coluna e dos órgãos, determinando ao final do estudo que 87% dos compostos químicos estudados eram teratógenos.

As respostas de um embrião de peixe-zebra causadas pela exposição de contaminantes podem ser consideradas subletais ou letais. A letalidade é constatada quando o óbito é observado, há coagulação dos ovos ou há ausência de batimentos cardíacos. (OECD, 2013; HORIE, Y. *et al*., 2017.)

Já as respostas consideradas subletais aparecem quando há alterações morfológicas e comportamentais, porém, não há óbito. Um exemplo seria o atraso no desenvolvimento, que é observado com a presença de características como: não descolamento da cauda e formação incompleta de estruturas como cauda e somitos. Edemas também são considerados alterações inespecíficas da resposta do peixe-zebra, aqueles de grau leve tem possibilidade maior de serem reversíveis e podem aparecer ao longo do corpo, mas principalmente no pericárdio e saco vitelino. Outras mudanças no sistema cardiovascular tendem a surgir com o edema, como bradicardia, taquicardia ou arritmia, congestão sanguínea e ausência ou diminuição do fluxo sanguíneo. (JEFFRIES, M. K. S. *et al.*, 2015; ZHANG, J. *et al*., 2015; SZABÓ, E. R. *et al.*, 2018).

Algumas deformidades morfológicas, mais comumente observadas, são alterações na conformação da coluna como lordose, cifose e escoliose, que surgem em graus variados e podem chegar a comprometer a capacidade de natação e interação com o ambiente. (HOU, J. L. *et al.*, 2011; OECD, 2013; KATABA, A. *et al.*, 2020, 2022). Outros efeitos adversos são: a alteração na conformidade do otólito, no qual há aumento ou diminuição de tamanho dessa estrutura, uni ou bilateralmente, a má formação dos olhos, seja na mudança de pigmentação da íris ou uma diferença de tamanho em um ou ambos os olhos, ou mesmo ciclopia ao ter a

formação de apenas um olho. (CHOW, E. S. H. & CHENG, S. H. 2003; De Silva, D. *et al.*, 2021). Ocorrem também malformações craniofaciais como encurtamento ou alongamento em mandíbula e outras desorganizações do crescimento esquelético, como ausência da boca, por exemplo, ou alterações na conformação do crânio. Outra alteração importante é a redução ou inibição na pigmentação, localizada em um local específico ou em todo o corpo. (CHOW, E. S. H. & CHENG, S. H. 2003; VILLENEUVE, D. L. *et al*., 2005). Outros pontos de avaliação de toxicidade são as alterações na conformação das nadadeiras em tamanho, formato e presença, e na notocorda, com deformação ou fragmentação de sua estrutura (CHOW, E. S. H. & CHENG, S. H. 2003; VILLENEUVE, D. L. *et al*., 2005; De Silva, D. *et al.*, 2021).

Afora as alterações morfológicas, outros parâmetros que podem ser avaliados são as mudanças comportamentais, como tremores, movimentos espontâneos, hiperatividade ou ataxia (incapacidade/ausência de movimentação), indicativos de sinais neurológicos que podem estar vinculados a neurotoxicidade. A avaliação pode ser por meio de observar a presença ou ausência dessas alterações, com e sem estímulo ou feita de forma quantitativa através de rastreamento de vídeo e análise elaborada feita por software. (LI, X. *et al.*, 2019; LEANDRO, L. P. *et al.*, 2021; SACHETT, A., 2022).

2.4. Estresse Oxidativo

Os danos induzidos por metais tóxicos nos organismos vivos, muitas vezes estão relacionados ao estresse oxidativo, os quais resultam em danos teciduais com uma recuperação difícil, um prognóstico reservado e danos nos componentes celulares como proteínas, lipídios e DNA. O estresse oxidativo advém de um desequilíbrio entre a geração e a respectiva remoção das espécies reativas(ERs). (LIVINGSTONE, D. R., 2001; KATABA, A. *et al.*, 2020; PAITHANKAR, J. G. *et al*., 2021).

Estudos como Livingstone (2001), Hou *et al.*(2011) e a pesquisa de Richetti *et al* (2011) sobre deformidades em larvas de peixes causadas por metais pesados, incluindo o chumbo, enfatizam o potencial para esse tipo de dano oxidativo. Segundo, Richetti *et al*. (2011) os efeitos do chumbo no sistema de defesa antioxidante foram documentados, sendo que a exposição ao chumbo alterou a atividade de enzimas antioxidantes no cérebro de peixes-zebra.

Patra, Rautray & Swarup (2011), Fu & Xi (2019) e Santos, A. de S. E. *et al.* (2021) por outro lado, observaram os efeitos de metais pesados no metabolismo humano, e dentre esses efeitos, o mais proeminente foi o estresse oxidativo e os danos decorrentes deste processo. O

chumbo induziu estresse oxidativo tanto devido a um desequilíbrio entre a geração e a remoção de ERs, quanto alterando o metabolismo antioxidante, visto que sua afinidade com grupos sulfidrila (SH) inibe grupos SH funcionais em várias enzimas antioxidantes, além de afetar o processo de respiração celular, elevando o número de EROs produzidas. Uma vez que o estresse oxidativo também pode levar ao dano celular, quando este dano se torna irreversível é ativado no organismo a apoptose, ou morte celular programada.

2.5. Respiração Celular

A respiração celular mitocondrial é um processo do metabolismo celular onde ocorre a conversão de energia por meio de reações mediadas enzimaticamente e a energia dos substratos absorvidos é transformada na produção de ATP. Este processo pode ser separado em três etapas: glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico mitocondrial (TCA), também chamado de Ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

A primeira via é a da glicólise, uma via anaeróbica em que, no citoplasma, ocorre o processo de oxidação da glicose em piruvato e o primeiro ganho de ATP, a segunda via ocorre na matriz mitocondrial e é aeróbica, onde o piruvato é quebrado, forma-se Acetil-Coa e se inicia o ciclo em si, também liberando sua parcela de ATP. A última etapa é a cadeia respiratória que ocorre na crista mitocondrial, onde os elétrons são transportados para seus aceptores, bombeando íons H^+ para o espaço intermembranar, gerando um gradiente de prótons, esse processo alimenta a síntese de ATP.

Na terceira etapa da respiração celular há a atividade de complexos na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, localizado na membrana interna mitocondrial e que, através da ação de suas subunidades, atuam na transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular (O_2), reduzindo-o a água (H_2O). A citocromo c oxidase desempenha um papel essencial na formação do gradiente de prótons, que leva a fosforilação oxidativa, contribuindo para a produção de ATP. Caso haja uma disfunção na cadeia de transporte de elétrons pode gerar acúmulo de elétrons desemparelhados no organismo, resultando na geração acentuada de espécies reativas de oxigênio (EROs). O possível dano gerado pode levar a apoptose. (BADEN, K. N. *et al*., 2007; RAK, M. *et al*., 2016; RAMZAN, R., KADENBACH, B., VOGT, S. 2021).

Durante esse processo ocorre também a ação da proteína desacopladora 2 (UCP2), para regular o organismo em caso de desequilíbrio na cadeia transportadora de elétrons, desacoplando-a e impedindo a formação de EROs ao reduzir a síntese de ATP sem alterar

significativamente o consumo de O_2. Seu efeito leva a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio e assim reduzindo os danos oxidativos que podem levar a apoptose. (FERNIE, A. R., CARRARI, F. & SWEETLOVE, L, J. 2004; YIN, J. *et al.*, 2017).

2.6. Morte Celular

A morte celular é um processo do organismo que busca eliminar células comprometidas. A morte celular por necrose é onde a morte da célula tende a ocorrer por injúria grave (como toxinas ou infecções severas), apresentando tumefação celular e rompimento das membranas plasmática e nuclear, extravasando seu conteúdo e causando danos aos tecidos circulantes. Quando a degradação do conteúdo celular é causada pela fusão do autofagossomo com o lisossomo e ocorre vacuolização citoplasmática a morte celular é denominada autofagia. Por fim, um evento que pode ocorrer devido a danos celulares como os causados pelo estresse oxidativo, em que há condensação da cromatina nuclear, fragmentação do DNA, volume celular aumentado, prolongamento da membrana celular e formação de corpos apoptóticos, pode resultar em morte celular programada, também chamada de apoptose. (D'ARCY, 2019)

A apoptose pode ocorrer por duas vias: A via extrínseca ocorre através da ativação dos receptores de morte (Fas, DR4 e 5 e TNF, como TNFR 1 e 2), que acabam por levar a ativação da cascata de caspases e a apoptose; e a via intrínseca, onde ocorre a liberação do citocromo c da mitocôndria e aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial. A permeabilidade da membrana e a inibição da liberação do citocromo c é controlada por proteínas anti-apoptóticas da família BCL (BCL-2, BCLXL, BCL-W, BCL-2-A1 e MCL1).

A proteína BCL2, em específico tem sua ação regulada por NOXA e PUMA, proteínas pró-apoptóticas cujos genes tem sua expressão regulada pela ação do gene P53, responsável por ativar essa via de morte celular devido aos danos irreversíveis. A inibição da proteína BCL2 permite que outras proteínas pró-apoptóticas como BAX e BAK aumentem a permeabilidade da membrana interna mitocondrial, evento que permitirá a ativação da cascata de caspases, que levará a morte celular programada.

Algumas substâncias tóxicas como o chumbo e outros metais podem levar a apoptose da célula devido ao estresse oxidativo em si e ao interferir em sua permeabilidade, seja competindo nos canais de cálcio, afetando a cadeia transportadora de elétrons de modo a aumentar a produção de EROs e levando a peroxidação lipídica, por exemplo.

(LIVINGSTONE, D. R., 2001; WEI, M. C. *et al.* 2001; CORY, S. & ADAMS, J., 2002; D'ARCY, 2019; VALVERDE-LOPEZ, J. A. *et al*., 2024).

2.7. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que retardam ou impedem a oxidação de outras moléculas, e auxiliam na proteção do organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo ao neutralizar ERs e prevenir possíveis patologias que surgem com o seu excesso no organismo. Segundo Ferreira & Matsubara (1997) e Campos & Yoshida (2004) os antioxidantes são classificados em enzimáticos e não enzimáticos e, de acordo com o seu nível de atuação, podem atuar na eliminação e/ou reparo dos danos oxidativos. As defesas enzimáticas são principalmente constituídas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx), as quais atuam na remoção direta de ERs, em especial, das espécies reativa de oxigênio (EROs). As defesas não enzimáticas incluem aquelas produzidas endogenamente, como a glutationa (GSH) ou que podem ser adquiridas a partir da dieta. Neste contexto, os metabólitos secundários de plantas também atuam na remoção de ERs, prevenção de danos oxidativos ou mesmo, na modulação de enzimas antioxidantes. Entre os principais metabólitos secundários com ação antioxidante, destacam-se os polifenóis, os flavonóides e os carotenóides, os quais são escolhidos em detrimento aos antioxidantes sintéticos, devido ao menor risco de apresentarem efeitos carcinogênicos e menor toxicidade observada em células normais. (PISOSCHI, A. M. & POP, A. 2015; INFANTE, J. *et al.,* 2016; SANTO, G. D. *et al.*, 2018). De fato, extratos de plantas com uma ampla concentração de compostos antioxidantes em diversos estudos indicam capacidade de proteção e mesmo redução dos danos causados pelo estresse oxidativo (KHAROUBI, O. *et al*., 2008; KO, S-C. *et al.*, 2011; SACHETT, C. *et al*., 2015; INFANTE, J. *et al.*, 2016; SANTO, G. D. *et al*., 2018; TOLEDO, A. P. *et al.*, 2018 GIRARDELO, J. R. *et al.*, 2020; OH, J-Y. *et al.*, 2020; ALQAHTANI, W. S. & ALBASHER, G. 2021; DEIVIARUNACHALAM, K. *et al.*, 2021; TAMAGNO, W. *et al,*. 2022).

2.8. Eugenia involucrata DC

A *Eugenia involucrata DC*, popularmente conhecida como cerejeira-do-rio-grande e cerejeira-do-mato, é uma árvore frutífera das matas da região sudeste até o sul do Brasil,

abrangendo os estados de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. Está presente também em alguns outros países da América do Sul. É uma planta que faz parte da família Myrtaceae, e pertence ao gênero *Eugenia L,* com um bom potencial econômico e ambiental. De acordo com Barzotto *et al.*(2019), as árvores de *E. involucrata* tem folhas de coloração verde-escura, brilhante do lado superior, com uma estrutura simples, medindo de 5 a 9 cm de comprimento, 2 a 3 cm de largura e com um crescimento que pode atingir de 5 a 20 m de altura. A partir das suas flores, são gerados os frutos que são comestíveis e tem um tamanho médio de 2,5 x 2 cm, de constituição frágil e coloração avermelhada, com epicarpo fino e brilhante, conteúdo suculento e de sabor ácido-adocicado, possui de um a cinco caroços branco-esverdeados e formato arredondado com cerca de 1,0 cm de diâmetro. (Fig. 1 e Fig. 2).

Porém, é menos conhecida fora da cultura e economia local, e apenas em estudos recentes seu potencial biológico foi reconhecido, com destaque para as atividades antioxidante e anti inflamatória de suas folhas, sementes e frutos analisadas *in vitro.* Nesses estudos destacou-se o alto teor de compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides, além de taninos nos extratos dos frutos, sementes e folhas, compostos com uma ampla ação antioxidante, anti inflamatória e antimicrobiana. (INFANTE, J. *et al*., 2016, TOLEDO, A.P. *et al*, 2018). Nicácio *et al*. (2017) em específico, observaram que as sementes e a casca do fruto da *E. involucrata* apresentaram maior atividade antioxidante em relação a polpa.

Fig. 1. Árvore de *Eugenia involucrata.*

Fonte: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2014).

Fig. 2. Frutos de *Eugenia involucrata*

Fonte: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2014).

Nos estudos de Girardelo *et al.* (2020) identificou-se os compostos fenólicos presentes no fruto e na semente. Os derivados de hidroxibenzoato foram a principal classe de fenólicos para ambos os extratos, seguidos por derivados de flavonóis e derivados de ácido elágico e hidroxicinamato. Outros compostos fenólicos presentes foram a epicatequina, catequina, rutina, ácido elágico, miricetina e quercetina, com o extrato da semente apresentando maior quantidade de epicatequina e catequina e o extrato do fruto tendo uma maior quantidade de rutina. A atividade antioxidante e antitumoral de extratos etanólicos do fruto e das sementes da *E. involucrata* foi avaliada e os resultados demonstraram forte capacidade de neutralizar radicais livres, protegendo células contra danos oxidativos em um modelo de pesquisa *in vitro.*

Desta forma, baseado nas suas propriedades antioxidantes, este trabalho propôs avaliar os efeitos do extrato dos frutos de *E. involucrata* em um modelo de toxicidade aguda induzido por chumbo, em peixe-zebra.

3.Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos toxicológicos do chumbo em modelo de toxicidade aguda em peixe-zebra (*Danio rerio*) e investigar o efeito protetor do extrato dos frutos de *E. involucrata.*

3.2. Objetivos Específicos

• Avaliar a toxicidade aguda do chumbo através de parâmetros de viabilidade, como presença de coagulação e batimentos cardíacos, bem como parâmetros morfológicos e comportamentais, como presença de má formações e alterações no nado em embriões e larvas de peixe-zebra.

• Determinar a concentração máxima tolerada do extrato do fruto de *E. involucrata* em relação a viabilidade e morfologia de embriões e larvas de peixe-zebra.

• Avaliar o efeito da exposição ao chumbo e/ou ao extrato do fruto de *E. involucrata* por meio de parâmetros de viabilidade, como presença de coagulação e batimentos cardíacos, bem como parâmetros morfológicos e comportamentais, como presença de má formações e alterações no nado em embriões e larvas de peixe-zebra.

• Avaliar o efeito da exposição ao chumbo e/ou ao extrato do fruto de *E. involucrata* através de parâmetros bioquímicos na forma de dosagem de tióis não proteicos e avaliação da peroxidação lipídica em larvas de peixe-zebra.

• Avaliar o efeito da exposição ao chumbo e/ou ao extrato do fruto de *E. involucrata* na expressão de genes ligados ao metabolismo oxidativo, morte e respiração celular em larvas de peixe-zebra.

4.Materiais e Métodos

4.1. Preparo da solução de chumbo para exposição em Danio rerio

Segundo as resoluções do CONAMA Nº 357/2005, N° 393/2007, N° 397/2008, N° 410/2009 e N° 430/2011 o teor de chumbo total máximo permitido em água doce é de 0,01mg/L (10µg/L). A partir deste parâmetro, optou-se por testar uma concentração 10 x maior e uma 10x menor que este valor permitido de10µg/L. Assim, as concentrações de exposição foram de 0 µg/L; 1 µg/L; 10 µg/L e 100 µg/L de chumbo. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de 100.000 µg/L de chumbo, utilizando acetato de chumbo trihidratado (com peso molar de 379,33 g/mol). A concentração da solução estoque corresponde à concentração de átomos de chumbo. A solução estoque foi mantida em geladeira e permaneceu estável durante todo período de armazenamento.

4.2. Preparo do extrato dos frutos de Eugenia involucrata

O extrato hidroalcóolico 70% dos frutos de *E. involucrata* foi preparado de acordo com protocolo previamente descrito em Girardelo, *et.al*. (2020). Os extratos foram liofilizados e mantidos à -80ºC até a sua utilização.

Para a utilização, o extrato liofilizado foi pesado e diluído na água a fim de atingir a concentração de 400 mg/L. As soluções finais desejadas foram preparadas por diluição seriada. Todas as soluções de extrato vegetal em água foram preparadas no dia do experimento.

4.3. Manutenção dos animais

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC e está protocolado sob o CEUA nº 7427200422. Peixes adultos da espécie *Danio rerio* foram obtidos de um fornecedor e aclimatados por 2 semanas antes de iniciar os protocolos para reprodução e obtenção dos ovos.

Os animais foram mantidos em aquários de 25 litros com densidade de 2 peixes/ litro, em uma sala com temperatura controlada (28 ºC) e ciclo claro-escuro de 14/10 h. A manutenção da água foi feita com água de osmose reversa e adição de sal Instant Ocean na proporção de 0,3 g/L e os parâmetros de qualidade da água, deste experimento, foram avaliados diariamente. Os parâmetros avaliados foram pH, nitrito, nitrato, amônia, oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade e condutividade da água. A troca parcial de água era realizada a cada 2-3 dias ou quando algum parâmetro se mostrava alterado. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração específica (Alcon Basic) e artêmia.

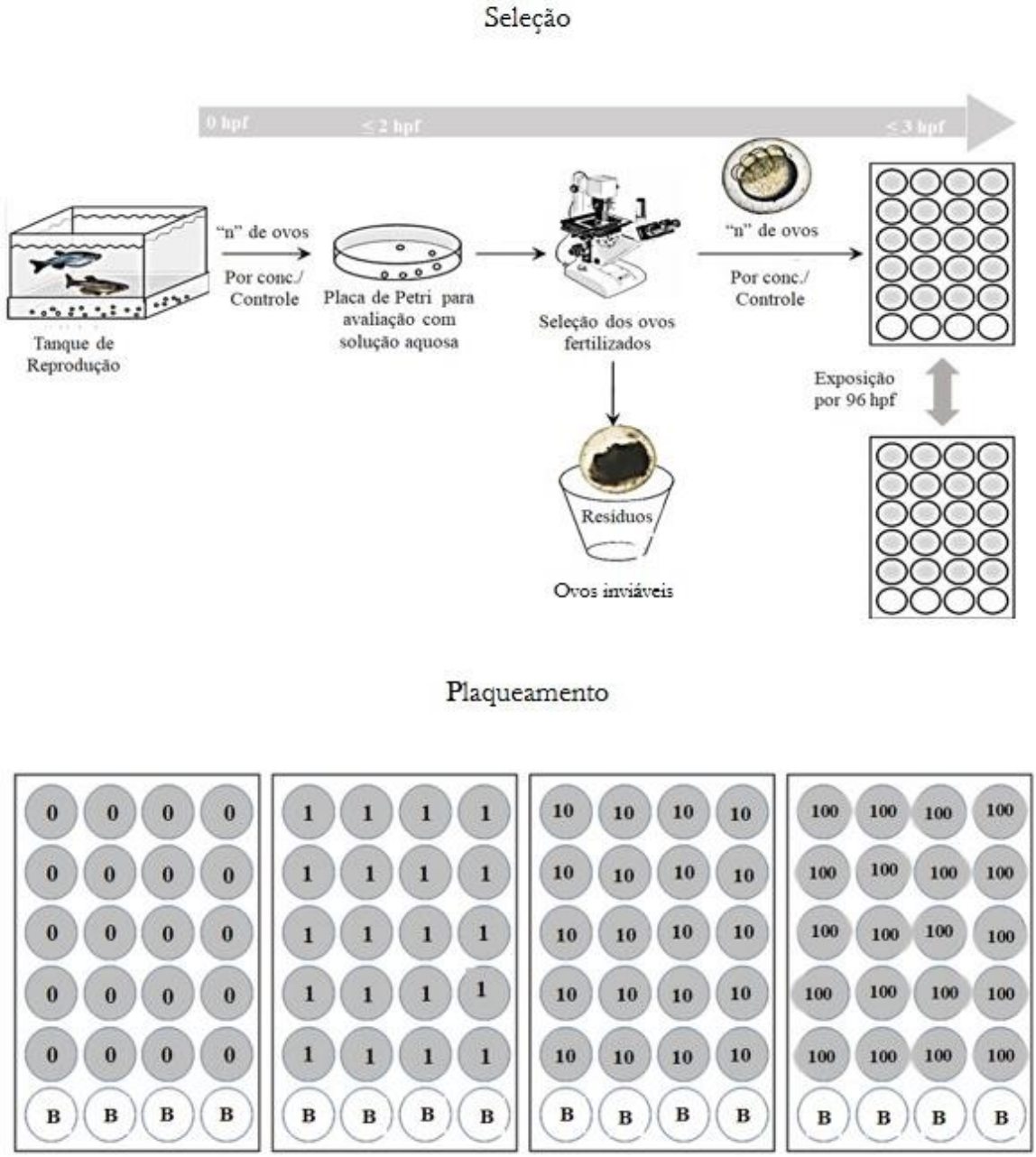
Para a obtenção dos ovos, cestas de reprodução eram colocadas dentro dos aquários com uma proporção de 3:1 entre machos e fêmeas. Após o ciclo noturno e o início do ciclo claro, iniciava-se a reprodução dos animais. Após a desova, as cestas eram cuidadosamente recolhidas e os ovos transferidos para placas de petri, onde eram selecionados, com auxílio de estéreomicroscópio, aqueles que estavam fertilizados e com formato normal. Ovos não fertilizados, coagulados ou com alteração estrutural eram descartados. Os ovos eram mantidos em água durante todo período de seleção até o seu plaqueamento.

Para classificação, os animais são considerados como embriões a partir da fertilização até sua eclosão (entre 48 e 72 horas pós fertilização). Após esse período, são denominadas larvas.

4.4. Avaliação de mortalidade e parâmetros morfológicos e comportamentais em larvas de peixes Danio rerio *expostos ao chumbo*

Ovos de peixe-zebra com 3 hpf foram expostos em placas de 24 poços (1 ovo/poço) aos tratamentos, tendo volume final de 2 mL, durante 96 horas. Para o teste utilizou-se o protocolo da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) 236 (OECD, 2013). Em cada placa foram selecionados 4 poços para o branco (B, na figura 3) que funciona como um controle interno da placa e deve ter uma taxa de sobrevivência ≥ 90 % até ao final do período de 96 horas. Os outros 20 poços da placa foram expostos às respectivas concentrações de 0, 1 µg/L; 10 µg/L e 100 µg/L de acetato de chumbo. Utilizou-se pelo menos 1 placa para cada concentração e os experimentos foram repetidos 7 vezes. (Fig. 3). Os animais foram monitorados a cada 24h até a avaliação final em 96h. Após 96h, as larvas foram eutanasiadas por hipotermia, através de imersão em água com gelo.

Fig. 3. Seleção e Plaqueamento dos ovos



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

A avaliação de mortalidade em larvas de peixe-zebra se deu por meio da verificação de parâmetros de letalidade estabelecidos na OECD 236 como coagulação do embrião e ausência de batimentos cardíacos.

Além da avaliação de mortalidade, avaliou-se também aspectos morfológicos que correspondem a alterações toxicológicas de acordo com Lammer, *et al*. (2009):

- Formação de somitos: Presença ou ausência;
- Separação da cauda: Presença ou ausência
- Edema do pericárdio: Presença ou ausência;
- Edema do saco vitelino: Presença ou ausência;
- Eclosão incompleta do ovo: Se entre o 3º e 4º dia pós fertilização o embrião permanece com o córion envolto na cabeça;
- Otólitos: Presença ou ausência;
- Nanismo: Presença ou ausência;
- Pigmentação: Alteração da pigmentação quando comparado a um embrião normal;
- Congestão sanguínea: Presença de acúmulo de células sanguíneas observado na forma de manchas avermelhadas;
- Má formação do olho: Presença ou ausência uni ou bilateral do olho e formato anatomicamente irregular quando comparado a um embrião normal;
- Coluna Torta: Presença ou ausência;
- Aspectos comportamentais foram observados através da movimentação do animal. Considerou-se:
- Alteração de movimento*:* Atraso na reação diante de estímulo ou ataxia, sem resposta a fuga. Parâmetro avaliado através de estímulo direto com ponteira. Considerou-se ataxia quando não houve reação (sem resposta a fuga) ou letargia, quando se observaram atraso na resposta de fuga e tremores.
- Hiperatividade: Parâmetro avaliado através de observação do nado individual de cada larva por aproximadamente 1 minuto sem nenhum estímulo direto ou movimentação da placa. Foi considerado hiperatividade quando houve nado errático e de início súbito, sem nenhum estímulo e este comportamento permanecia por mais de 30 segundos.
- A taxa de eclosão também foi avaliada. Considerou-se atraso na eclosão quando a mesma não ocorreu em 96h, pós fertilização.

Os parâmetros morfológicos avaliados neste trabalho estão condensados na tabela 1.

Tabela 1- Alterações avaliadas em larvas de *Danio rerio*.

Alteração	Método de Avaliação	Uso de estímulo externo	Momento de Avaliação (hpf)
Formação de somitos	P/A	N	24h-48h
Separação da cauda	P/A	N	24h-48h
Edema de pericárdio	P/A	N	48h-96h
Edema do saco vitelino	P/A	N	48h-96h
Eclosão Incompleta	P/A	N	96h
Otólito	P/A	N	48h-96h
Nanismo	P/A	N	48h-96h
Pigmentação	P/A	N	48h-96h
Congestão sanguínea	P/A	N	48h-96h
Má formação do Olho	P/A	N	48h-96h
Curvatura de Coluna	P/A	N	48h-96h
Alteração de movimento	P/A	S	48h-96h
Hiperatividade	P/A	N	48h-72h
Eclosão	P/A	N	96h

P/A: Presença ou Ausência; N: Não; S:Sim. Hpf: Horas Pós Fertilização quando cada ponto é analisado

A fim de realizar uma análise conjunta de todos os parâmetros de toxicidade avaliados, calculou-se um escore de toxicidade. Esse escore também permitiu avaliar de modo quantitativo o nível de toxicidade. Foi computado um valor de 1 para cada alteração observada e ao final, calculou-se o escore de toxicidade usando a seguinte fórmula:

$$\text{Escore de toxicidade por animal} = \frac{\text{Número de alterações em 20 animais}}{20}$$

Dessa forma, calculou-se um valor de escore de toxicidade por animal em cada concentração testada e também nos animais controles que não foram expostos aos tratamentos. Exemplos de indivíduos saudáveis em seu desenvolvimento se encontram nos Anexos I e II.

4.5. Avaliação da toxicidade do extrato

Seguiu-se o mesmo protocolo de exposição descrito no item **4.4.** Inicialmente, realizou-se um ensaio a fim de definir a máxima concentração tolerada de extrato nos embriões de peixe-zebra.

Avaliou-se o efeito do extrato dos frutos de *E. involucrata* nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 100 mg/L. As larvas/embriões foram monitorados a cada 24h até findar as 96h pós fertilização. Os mesmos parâmetros de toxicidade foram avaliados conforme descrito no item **4.4**. Os experimentos foram realizados duas vezes.

4.6. Avaliação da toxicidade do chumbo associado ao extrato vegetal

Seguiu-se o mesmo protocolo de exposição descrito no item **4.4.** Avaliou-se o efeito do chumbo na concentração de 100 µg/L em associação a 100 mg/L de extrato de fruto de *E. involucrata.* As larvas foram monitoradas a cada 24h até atingir 96h pós fertilização. Os mesmos parâmetros de toxicidade foram avaliados conforme descrito no item **4.4.** Os experimentos foram repetidos quatro vezes.

4.7. Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo

As amostras foram compostas por solução homogeneizada de um *pool* de 15 larvas após o término dos experimentos (96h) em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4, Sigma-Aldrich). Após a homogeneização dos embriões, os mesmos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos à 4ºC e o sobrenadante foi coletado e mantido a -80ºC até a sua utilização na avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo (SACHETT, A., *et.al*, 2022).

Realizou-se dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, M. M., 1976) e posteriormente avaliou-se a lipoperoxidação através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi preparado uma solução estoque de 2.000 nmol/mL de de 1,1,3,3-tetraetoxipropano, cuja reação final libera MDA, para posteriormente preparar uma solução de 20 nmol/mL para ser utilizada no experimento. Para o teste foi feito uma solução (branco) utilizando os reagentes TCA (Ácido Tricloroacético) à 20%, TBA (Ácido Tiobarbitúrico) à 0,5% e água ultrapura em um volume final de 250µL para obtenção de uma curva padrão em microtubos resistentes ao calor. Em paralelo também realizou-se o teste utilizando TCA (Ácido Tricloroacético) à 20%, TBA (Ácido Tiobarbitúrico) à 0,5% e as amostras substituindo a água ultrapura. Os microtubos foram incubados a 100 ºC por 1 hora e a leitura de absorbância foi medida em 532nm em placas de 96 poços. (DRAPER, H. H. & HADLEY, M. 1990; DRAPER, H. H. *et al*., 1993). Este experimento foi feito de modo semelhante a um estudo realizado por

Sachett *et al.* (2020), que otimizou um protocolo para quantificação de TBARS em tecido cerebral de peixe-zebra, porém usando uma curva padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano e os resultados foram expressos como nmol TBARS/mg de proteína.

Outro experimento realizado foi a dosagem de tióis não-protéicos (NPSH) (ELLMAN, G. L. 1959), no qual foi preparada uma solução estoque de 10mM de DTNB (Ácido 5,5'-Dithiobis-2-Nitroenzóico), uma solução estoque de 1 M de Tampão Fosfato de Potássio com pH de 7 e uma solução estoque de TCA (Ácido Tricloroacético) à 6%. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, sendo adicionado o volume em µL de cada amostra correspondente a 40 µg de proteína, em seguida o mesmo volume de TCA à 6% e tampão fosfato sendo feita a leitura em 421nm. Após a primeira leitura, adicionou-se 15 µL de DTNB por poço, a placa foi então incubada no escuro por 1 hora, após o qual foi feita a segunda leitura, também em 412nm. Os valores foram calculados usando o coeficiente de extinção molar de 13.600 M/cm e os resultados expressos em µmol SH/mg de proteína.

4.8. Extração de RNA

Ao término do período de exposição das larvas, as mesmas foram coletadas para formação das amostras, por uma solução homogeneizada composta por um *pool* de 15 larvas após o término dos experimentos (96h) e utilizou-se o kit *mir*Vana PARIS para extração do RNA seguindo protocolo indicado pelo fabricante. O RNA obtido foi eluído em 100 µL de água *RNAse-free* e foi quantificado utilizando leitura espectrofotométrica em um *NanoVue plus* (GE *Healthcare*, USA) e a pureza foi avaliada através da razão 260/280 e 260/230.

A extração de RNA foi realizada duas vezes para cada grupo avaliado. O RNA foi armazenado em microtubos à – 80ºC.

4.9. Obtenção de DNA complementar (cDNA)

O RNA extraído foi usado para a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *GoScript™ Reverse Transcription* (*Promega Corporation*, Madison, WI, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Foi utilizado 600 ng de RNA em volume final de 20 µL de reação. O experimento foi executado em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*, California,

USA) com parâmetros térmicos de 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42ºC, 15 minutos a 70ºC e resfriamento a 4ºC.As amostras foram posteriormente armazenadas em freezer – 80ºC.

4.10. Reação em cadeia da polimerase (qPCR)

A expressão dos os genes propostos (Tabela 2.), referentes ao metabolismo oxidativo, respiração e morte celular, foram avaliados por PCR em tempo real (qPCR) usando termociclador MX3000P (Stratagene, San Diego, USA), empregando como reagente para amplificação *o Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, USA). Os parâmetros dos ciclos de reação foram (um ciclo de 10 minutos a 95 °C e 40 ciclos de: 30 segundos a 95 °C, 60 segundos a 60 °C, 60 segundos a 72 °C, 60 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 95°C). As amostras foram processadas em duplicatas e expressas relativamente ao TUBA-I como gene de referência. Os dados foram normalizados através do método ΔΔCt com correção para a eficiência de amplificação. (PFAFFL, M. W., 2001

Tabela 2. Primers analisados por qPCR.

Genes	Sequência (5'3') do Primer	Referência
zTUBA-I	**F:**TTT GTG CAC TGG TAC GTG GG **R:**CCA CAC TCT CAG CTC CAA CCT C	(Kataba. *et al*., 2020)
zGST	**F:**ACA ACC TGT TCG ATC TCC TGC TGA **R:**GTT GCC GTT GAT GGG CAG TTT CTT	(Kataba. *et al*., 2020)
zSOD2	**F:**CGC ATG TTC CCA GAC ATC TA **R:**GAG CGG AAG ATT GAG GAT TG	(Kataba. *et al*., 2020) (Guo. *et al*., 2023)
zCAT	**F:**AGT GCT CCT GAC GTC CAG CCA **R:**TGA AGA ACG TGC GCA CCT GGG	(Kataba. *et al*., 2020) (Guo. *et al.*, 2023)
zGPX 4b	**F:**GGA CGA TCC AAG CTG GGT GGA **R:**CAG CCG TCA CAC GTC TGG GC	(Kataba. *et al*., 2020)
zUCP-2	**F:**TGG CTC AAC CCA CTG ATG TA **R:**CAA TGG TCC GAT ATG CGT C	(Kataba. *et al*., 2020)

zHMOX-1	**F:**GGA AGA GCT GGA CAG AAA CG **R:**CGA AGA AGT GCT CCA AGT CC	(Kataba. *et al*., 2020)
zBCL2	**F:**AGG AAA ATG GAG GTT GGG ATG **R:**CTG CGC GCA CTC TAC TAC A	(Kataba. *et al*., 2020) (Guo. *et al*., 2023)
zBAX	**F:**GGC TAT TTC AAC CAG GGT TCC **R:**TGC GAA TCA CCA ATG CTG T	(Guo. *et al*., 2023)
zP53	**F:**CCC AGG TGG TGG CTC TTG CT **R:**GAG TGG ATG GCT GAG GCT GTT CT	(Kataba. *et al*., 2020) (Guo. *et al*., 2023)
zNRF2	**F:**GAC AAA ATC GGC GAC AAA AT **R:**TTA GGC CAT GTC CAC ACG TA	(Kataba. *et al*., 2020) (Guo. *et al*., 2023)
zCOX1	**F:**GGA TTT GGA AAC TGA CTT GTG **R:**AAG AAG AAA TGA GGG TGG AAG	(Kataba. *et al*., 2020)
zNOXA	**F:**CGA ACC TGT GAC AGA AAC TTG **R:**CTG CGC GCA CTC TAC TAC A	(Kratz. *et al*., 2006)
zPUMA	**F:**GAA CAC ACG GGT TAC AAA AGA **R:**GAA AAT TCC CAG AGT CTG TAA GTG	(Kratz. *et al*., 2006)

4.11. Análise estatística

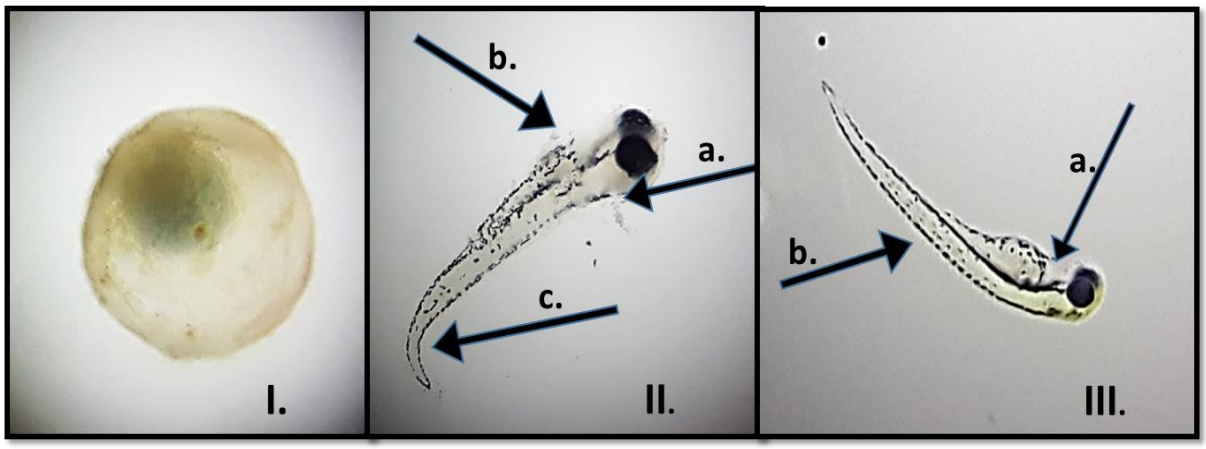
A apresentação dos resultados se deu através de média ± Erro Padrão da Média (EPM) e as análises entre os grupos foram realizadas por meio da ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparação entre os grupos, incluindo o controle através de software *GraphPad Prism* 10.2.2 e considerados significativos quando $p < 0.05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Avaliação do efeito do chumbo através de parâmetros de mortalidade e morfológicos

O experimento realizado buscou avaliar o efeito do chumbo em uma concentração maior (100µg/L) e uma menor (1ug/L) daquela descrita na resolução do CONAMA (10µg/L) (MS, 2005), visando verificar a toxicidade dessa substância e sua relação concentração-dependente. A mortalidade foi avaliada a cada 24h durante o período de exposição de 96h e os principais parâmetros avaliados estão ilustrados na figura 4, avaliados de acordo com o método descrito no item **4.4**. Na figura 4 há um exemplo de embrião coagulado, larvas em óbito e apresentando curvatura de coluna.

Fig. 4 – Caracterização morfológica das larvas



Exemplos de alterações morfológicas observadas após exposição ao chumbo. (I) Embrião coagulado, (II.a) Óbito em larva, com sinais de deterioração, (II.b) Larva sem reação a estímulo externo e com ausência de batimentos cardíacos, (II.c) Larva apresenta curvatura de coluna na porção final do corpo, (III.a) Larva sem reação a estímulo externo e com ausência de batimentos cardíacos, sem sinais de deterioração, (III.b) Larva apresenta curvatura de coluna Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

A relação entre a concentração de metal e a taxa de mortalidade foi registrada em porcentagem como pode ser visto na Figura 5. Os resultados deste trabalho demonstram que houve uma toxicidade tempo-dependente, mas que não ultrapassou 20% de mortalidade, sendo uma possível razão para este resultado, a variação no tempo de vida dos embriões no momento em que foram expostos aos tóxicos em questão e o tempo à que ficaram expostos.

Neste estudo, os embriões foram expostos com 3hpf ao chumbo, visto que durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes, os animais se encontram com maior

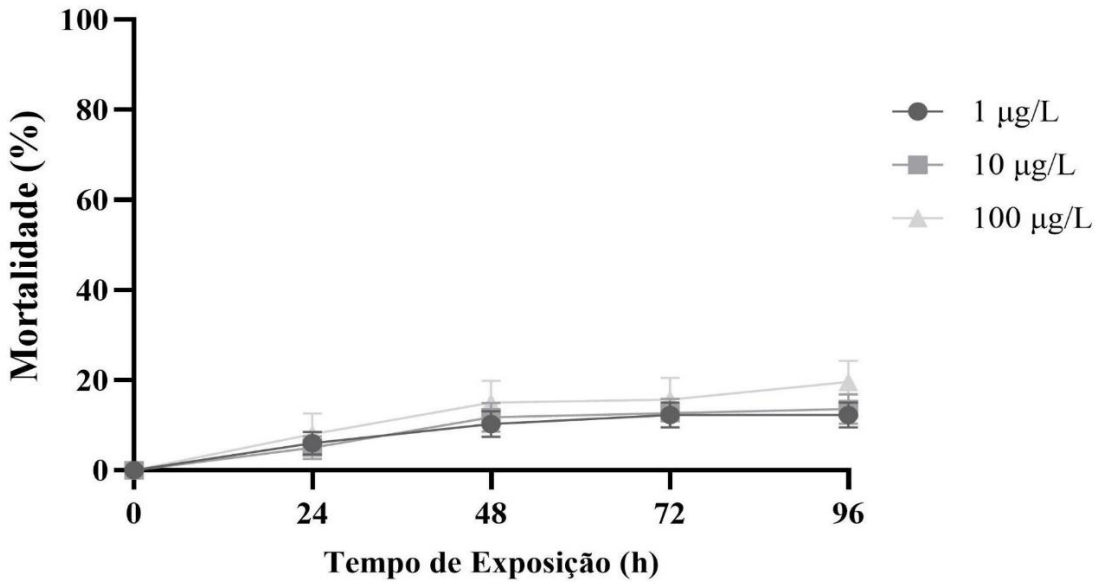
suscetibilidade à intoxicações, principalmente por metais, devido à ampla permeabilidade da membrana do embrião na organogênese à íons metálicos. Mesmo uma variação mínima pode levar a uma diferença em relação a alguns artigos da literatura como ocorreu no artigo de Kataba, *et al* (2022), que expos os embriões com 2,5 hpf e constatou uma mortalidade superior ao visto neste estudo. (GRAYSSE, MONS & GARRIC. 2006; KATABA. *et al.*, 2020).

Outro ponto que pode ser responsável pela divergência encontrada em relação a alguns trabalhos é a metodologia utilizada, que além de oferecer protocolos diferentes para seguir do que o que foi utilizado como base para este estudo, também pode levar a uma análise diferente dos resultados. Por exemplo, Kataba *et al.* (2022) esteve em conformidade com o protocolo da OECD 236, onde houve uma mortalidade considerada relevante de 16% em uma das concentrações estudadas, semelhante ao protocolo que foi seguido neste estudo, enquanto que este valor seria considerado como uma taxa de mortalidade normal (não relevante) para estudos que se embasaram no protocolo da OECD 212, como no caso de Graysse, Mons & Garric (2006).

O tempo em que os embriões e larvas foram expostos neste estudo foi de 96h, avaliando sua mortalidade e toxicidade a cada 24 horas, e o resultado obtido pode ser devido ao tempo em que os animais foram expostos ao tóxico, uma vez que quanto maior o tempo de exposição, tende-se a apresentar uma maior queda de viabilidade, como visto em algumas literaturas, como relatado por Tu *et al*. (2017), que avaliaram a mortalidade do chumbo em larvas de *D.rerio* por um período de 120 hpf em concentrações de 2,5 µmol/L a 10 µmol/L, semelhante ao que foi visto em um estudo de Yin *et al*. (2017), onde larvas de *D. rerio* foram expostas a diferentes concentrações de cádmio (0 a 192 mg/L), e diferentes concentrações de chumbo (0 a 48 mg/L). Ambos constataram uma maior mortalidade em relação ao maior tempo de exposição.

Outros estudos na literatura também sugerem que mesmo em concentrações mais baixas de chumbo há uma relação concentração-dependente de seus efeitos, e também indicam que o peixe– zebra (ou mesmo outras espécies) são sensíveis quanto a intoxicação por contaminantes como os metais pesados especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento. (JONES, I., KILLE, P., SWEENEY, G. 2001; OSMAN, A. G. M. *et al,*. 2007; ZHU, B. *et al*., 2011; ZHANG, H. *et al*., 2012; KATABA, A. *et al*., 2020, 2022).

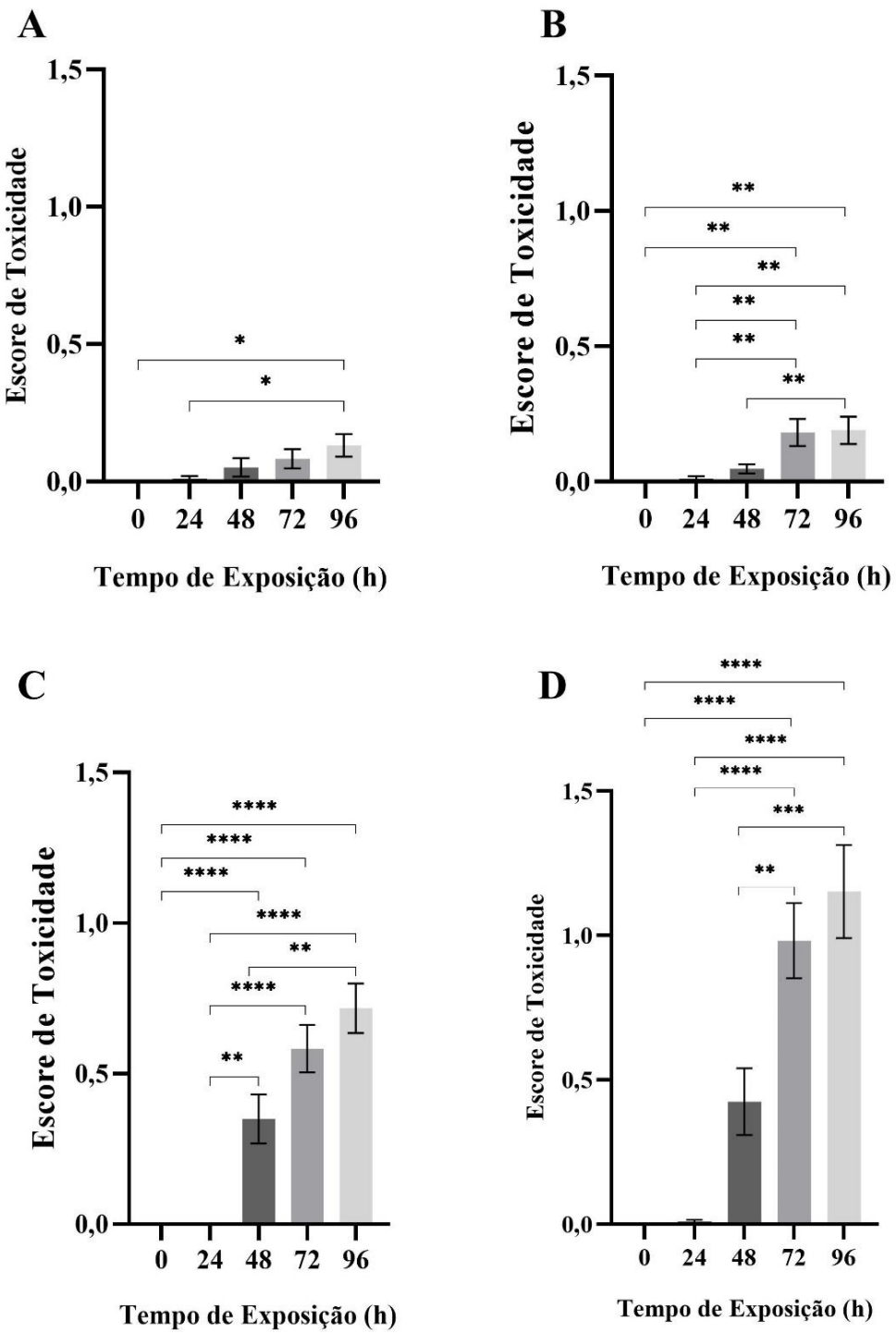
Fig. 5 –Mortalidade observada em larvas de *Danio rerio* expostas ao chumbo.



As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações crescentes de chumbo e a mortalidade avaliada a cada 24h. Cada ponto representa a média ± EPM dos experimentos realizados. (N=7). Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

A figura 6 descreve os resultados do escore de toxicidade obtidos após a exposição das larvas a concentrações crescentes de chumbo. Podemos observar na Figura 6A que os animais controles apresentaram uma presença de alterações morfológicas no escore de toxicidade em especial durante o tempo de exposição de 96 hpf. Apesar de não ser desejado, esse aumento pode ser devido a alterações que surgem aleatoriamente no desenvolvimento do embrião, como durante a fase de gastrulação, algo observado por Hammershmidt *et al.* (1996). No tratamento com 1 µg/L, (Fig. 6B) podemos observar que há um aumento significativo do escore de toxicidade após 72h de exposição. Nos tratamentos com 10 e 100 µg/L, (Fig. 6C e 6D) é possível observar que há um aumento significativo no escore de toxicidade já a partir de 48h.

Fig. 6 – Avaliação da toxicidade do chumbo em relação ao tempo de exposição.

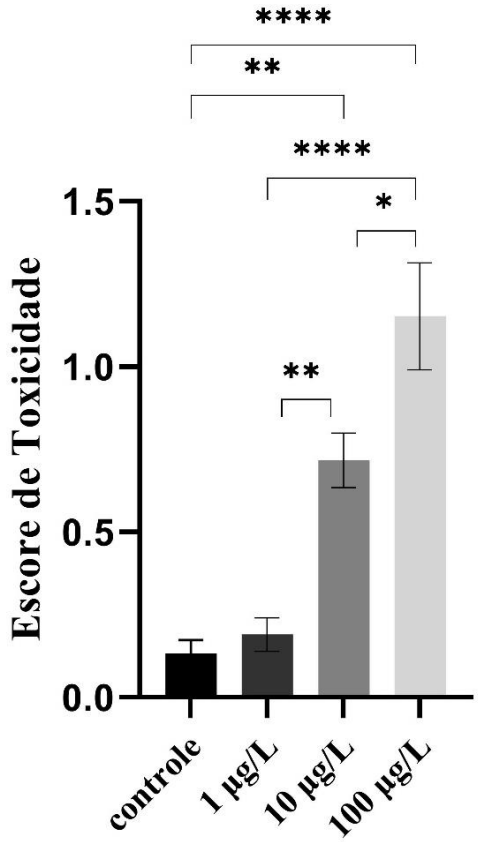


As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações crescentes de chumbo e a toxicidade foi avaliada de acordo com parâmetros morfológicos. (A) Controle, (B) 1 µg/L, (C) 10 µg/L ,(D) 100 µg/L . Cada ponto representa a média ± EPM dos experimentos realizados. (N=7). A significância foi definida como *P< 0,05; **P <0,01; ***P <0,001 e ****P < 0,0001 quando comparado com o tempo 0h, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

A fim de comparar melhor o efeito de diferentes concentrações de chumbo em um mesmo gráfico, escolheu-se o tempo de 96h de exposição e os resultados estão expressos na Figura 7. Podemos observar que o chumbo induziu um aumento significativo no escore de toxicidade a partir da concentração de 10 µg/L.

Estes resultados sugerem que o chumbo induziu um efeito tóxico que é concentração e tempo dependente, como em Yin *et al*.(2017) em seu estudo identificando biomarcadores de toxicidade, que além de observar a mortalidade também analisou alterações morfológicas que mostraram maior incidência quanto maior a concentração.

Fig. 7 – Escore de toxicidade induzido por chumbo após 96 horas de exposição.

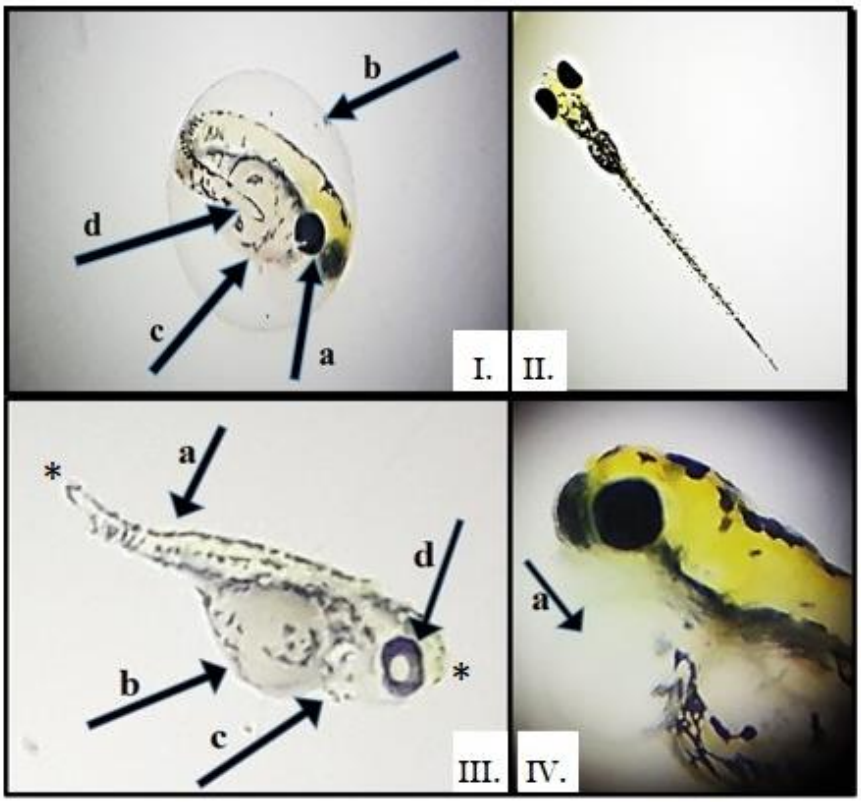


As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações crescentes de chumbo e a toxicidade foi avaliada de acordo com parâmetros morfológicos. Cada ponto representa a média ± EPM dos experimentos realizados. (N=7). A significância foi definida como *P <0,05; **P <0,01 e ****P < 0,0001 quando comparado com o controle, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

A morfologia normal de um embrião e larva pode ser visualizada na Figura 8. Nestas imagens observa-se boa conformidade em embrião olhos (Fig.8.I.a), córion íntegro (Fig.8.I.b), saco vitelino uniforme (Fig.8.I.c) e início da separação da cauda (Fig.8.I.d), e em uma larva

uma conformação anatômica normal (Fig.8.II). As principais alterações observadas nos animais tratados com chumbo foram nanismo (Fig.8.III*), curvatura de coluna (Fig.8.III.a), edema de saco vitelino (Fig.8.III.b) e edema de pericárdio (Fig.8.III.c e Fig.8.IV.a), também foi observado anoftalmia unilateral (Fig.8.III.d).

Fig. 8- Alterações morfológicas em *Danio rerio*.



Exemplos de características anatômicas normais e alterações de toxicidade avaliada em larvas de *Danio rerio* expostas a diferentes concentrações de chumbo. Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Dentre as alterações observadas neste estudo, a presença de edema em pericárdio e em saco vitelino, bem como a curvatura em coluna, são alterações comuns encontradas na literatura em estudos que avaliaram o efeito tóxico do chumbo e de outros metais. (HOU, J. L. *et al.*, 2011; ZHANG, H. *et al.*, 2012; YIN, J. *et al.*, 2017).

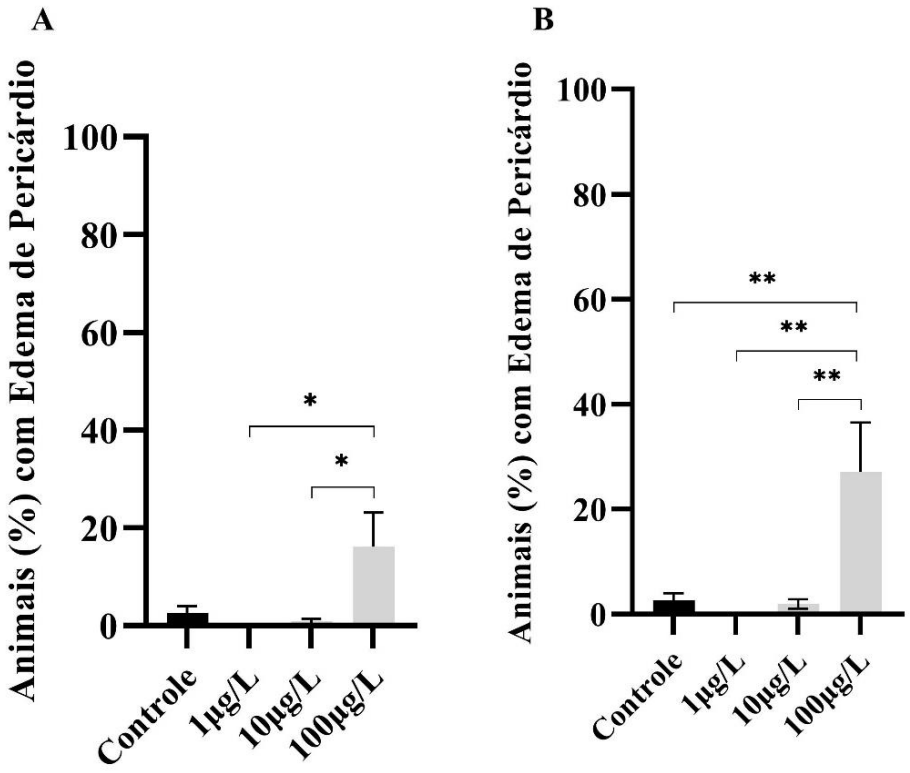
Neste trabalho constatou-se que, nos animais tratados com as maiores concentrações de chumbo, os animais apresentaram alterações morfológicas principalmente entre 72 horas e 96 horas. Algumas das alterações estudadas ocorreram em um valor não significativo, como edema de saco vitelino, delay (atraso no desenvolvimento), alteração na formação do olho, alteração na pigmentação, presença de coágulos, ausência de otólitos e eclosão incompleta do ovo, está última estando diretamente relacionada ao marcador de eclosão completa, que foi superior a

70 % nos grupos expostos, indicando que o chumbo não afetou significativamente este marcador morfológico.

Em torno de 25% dos animais tratados com 100 µg/L exibiram edema do pericárdio até o final do período de exposição (Fig. 9 A e Fig. 9 B), também foi observado curvatura de coluna entre os períodos de 72h (Fig. 10 A) e 96h (Fig. 10 B), e constatou-se que quanto maior a concentração e maior o tempo de exposição, mais alterações se apresentaram. Diferentes graus de curvatura foram compilados em uma única avaliação, como exibido no Apêndice B.

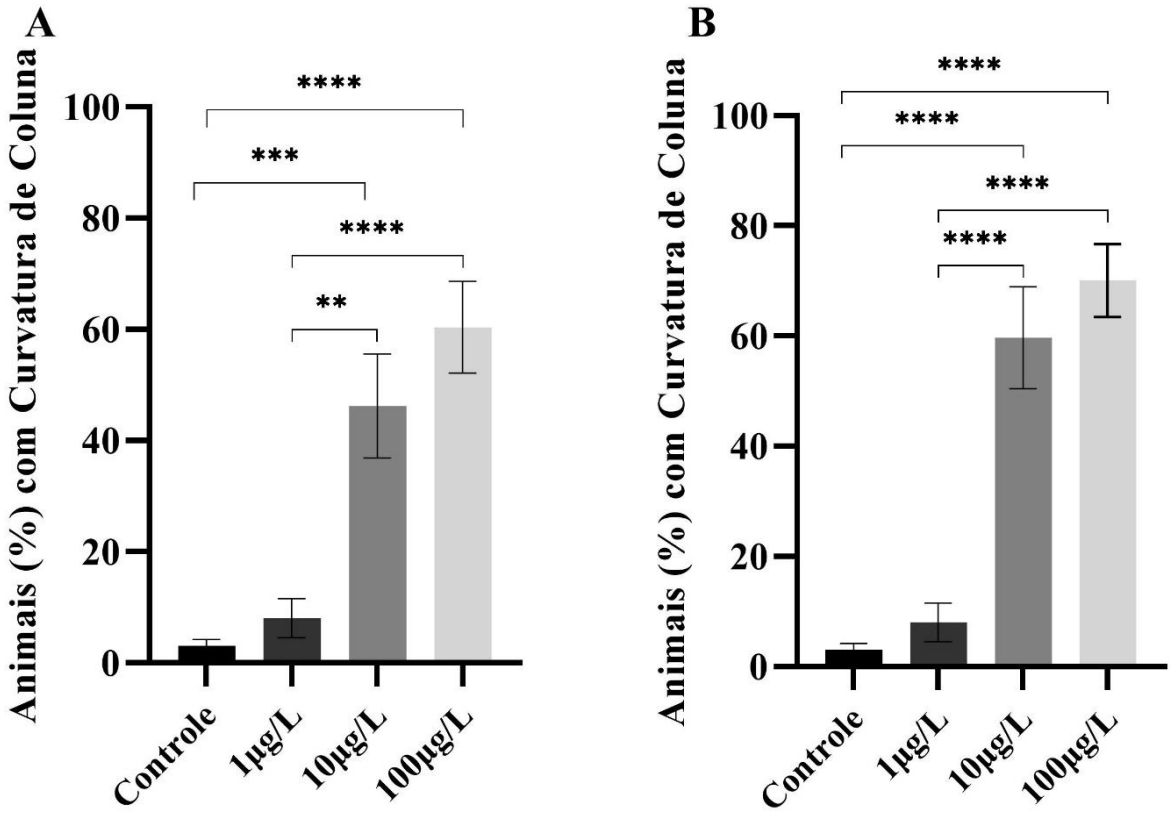
Alterações de crescimento como o nanismo também foram avaliadas neste trabalho (Fig. 11 A e Fig. 11 B) e notou-se que desde 72h houve um número significante visto na concentração de 100 µg/L e de10 µg/L quando comparados as alterações observadas nos grupos de Controle (0 µg/L de chumbo) e 1 µg/L.

Fig. 9- Avaliação da taxa de edema de pericárdio em larvas expostas ao chumbo.



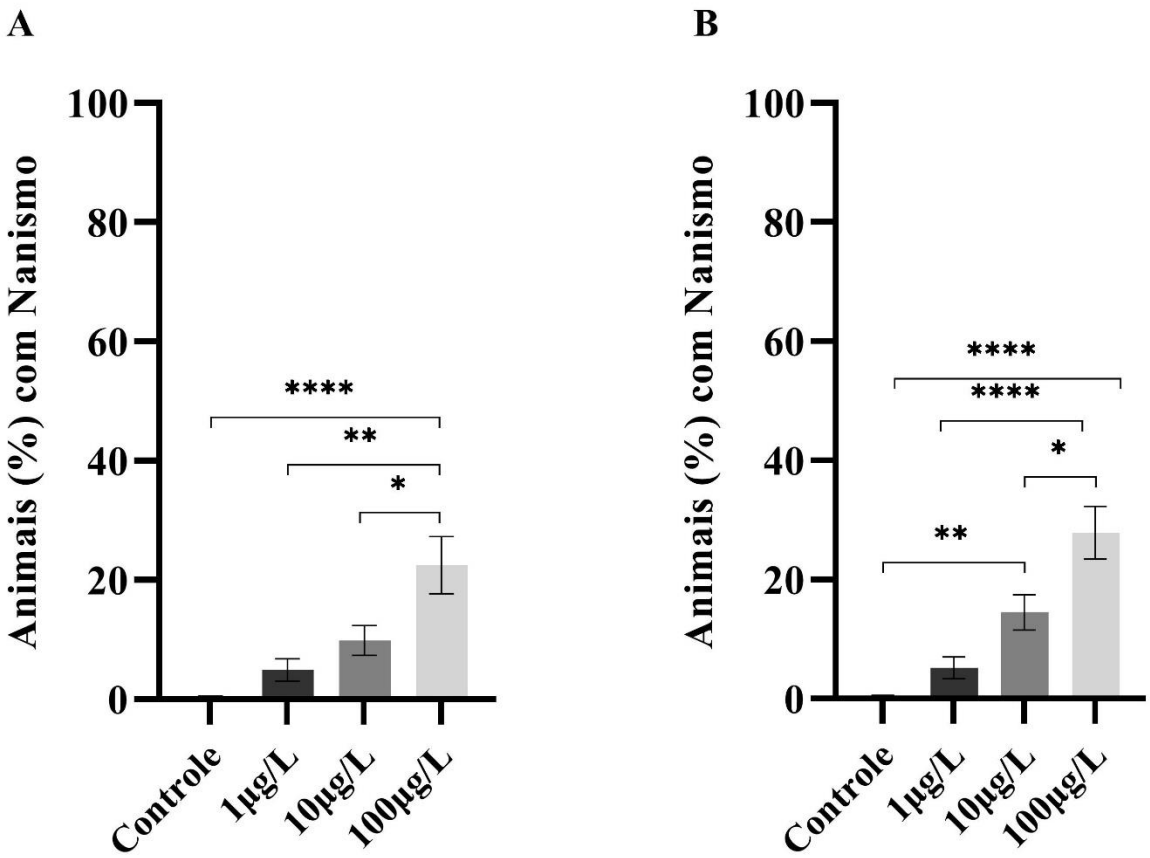
A porcentagem de larvas com edema de pericárdio foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/L. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=7). A significância foi definida como *P < 0,05 e **P < 0,01 quando comparado com o controle, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Fig. 10- Avaliação da taxa de curvatura de coluna em larvas expostas ao chumbo.



A porcentagem de larvas com curvatura de coluna foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/L. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=7). A significância foi definida como **P < 0,01; ***P < 0,001 e ****P < 0,0001 quando comparado com o controle, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Fig. 11- Avaliação da taxa de nanismo em larvas expostas ao chumbo.



A porcentagem de larvas com nanismo foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/L. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=7). A significância foi definida como *P < 0,05; **P < 0,01 e ****P < 0,0001 quando comparado com o controle, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Esses resultados corroboram com outros estudos que testaram concentrações de chumbo maiores do que as utilizadas neste estudo. Chen *et al*. (2012), que avaliaram a toxicidade embrionária do acetato de chumbo, em concentrações de 0,1-1mg/L observaram um amplo número de alterações morfológicas em concentrações entre 0,2 mg/L e 0,5 mg/L. Como também em Dou & Zhang (2011), onde a exposição de embriões de peixe-zebra a concentrações variáveis de chumbo (0,05-0,7 mM) mostrou alterações e em 0,3 mM houve um aumento significativo da curvatura de coluna.

Já Zhu *et al*. (2016), que testaram chumbo em concentrações menores (5-20 µg/L) constataram que, com a maior das concentrações, as larvas apresentaram um aumento de eventos de malformação (curvatura de coluna, nanismo e edema de pericárdio e saco vitelino),

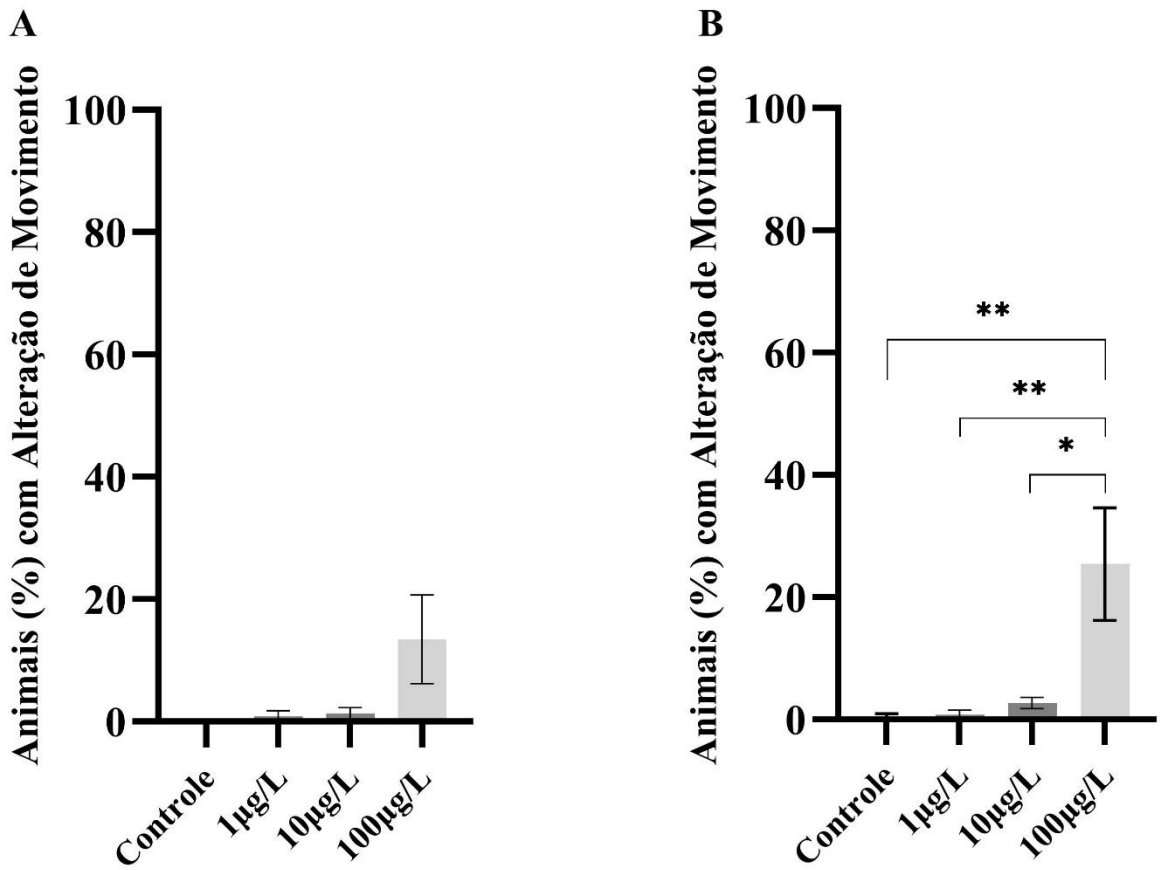
embora não estatisticamente significativo. Zhao *et al*. (2020) identificaram alterações morfológicas semelhantes em uma exposição com uma concentração de 20 µg/L de chumbo.

O chumbo pode levar a formação de edemas, como o de pericárdio ao desregular o metabolismo (como a bomba iônica de sódio/potássio), que leva ao comprometimento do equilíbrio osmótico e função cardíaca, causando extravasamento de fluídos. O metal pode ainda ocasionar cardiotoxicidade direta por meio da apoptose de células cardíacas e alteração de genes referentes ao desenvolvimento e funcionamento do coração, ou ainda diminuindo a frequência cardíaca. (JEFFRIES, M. K. S. *et al.* 2015; INCARDONA, J. P., SCHOLZ, N. L. 2016).

A exposição ao chumbo induz a alterações morfológicas em peixes como a curvatura da espinha durante o desenvolvimento de um embrião por vários meios, como através da apoptose, que deforma a musculatura, ou por meio da estimulação da via Hedgehog durante a ossificação endocondral, com consequente curvatura descendente da coluna vertebral. O chumbo pode ainda afetar a expressão de genes diretamente ligados ao desenvolvimento muscular e ósseo, o que afeta a formação dos ossos e nódulos musculares, ao ocasionar perda de cálcio pela competição de chumbo e cálcio nos sítios de ligação. O desenvolvimento comprometido pela apoptose e os genes relacionados com o desenvolvimento muscular e ósseo são dois dos fatores que podem contribuir pelo crescimento limitado do embrião, levando a outras alterações de crescimento, como o nanismo. (ROY, N. M., DEWOLF, S., & CARNEIRO, B. 2015; WANGA, Z. *et al.* 2022; LI, X., *et al*. 2022).

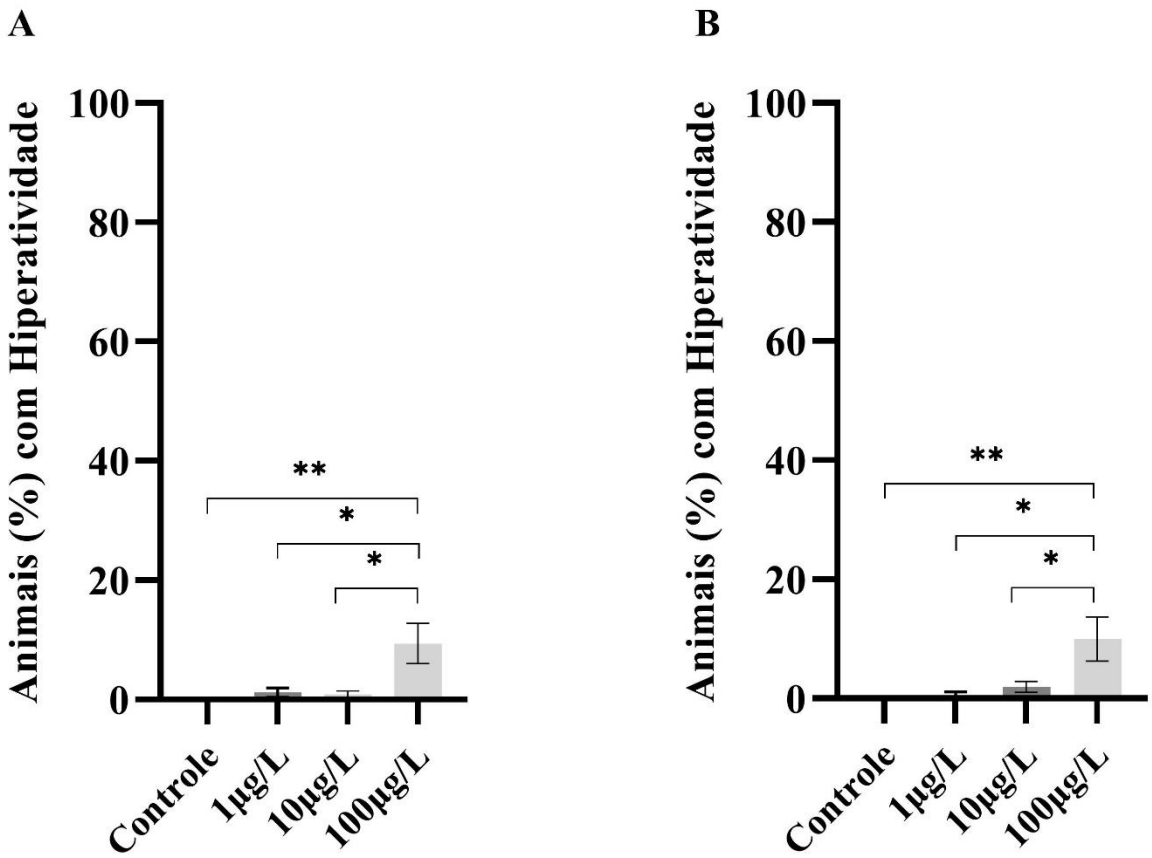
Neste estudo o chumbo também induziu alterações comportamentais, como a hiperatividade e alterações de movimento, descritos no item **4.4** como reação atrasada ou não reação após estímulo. Esses efeitos foram observados majoritariamente em 72 e 96 horas após a exposição, nas duas maiores concentrações de chumbo. Apenas nas 96h foi constatado alteração de movimento em uma taxa superior a 20% na concentração de 100 µg/L (Fig. 12). A presença de hiperatividade, por outro lado, se apresentou em aproximadamente 15% dos animais entre 72 e 96 horas, também na concentração de 100 µg/L (Fig. 13).

Fig. 12- Avaliação da taxa de alterações de movimento em larvas expostas ao chumbo.



A porcentagem de larvas com alterações na movimentação foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/L. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=7). A significância foi definida como *P < 0,05 e **P < 0,001 quando comparado com o controle, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Fig. 13- Avaliação da taxa de hiperatividade em larvas expostas ao chumbo.



A porcentagem de larvas com hiperatividade foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/L. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=7). A significância foi definida como *P < 0,05 e **P < 0,01 quando comparado com o controle, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

A presença de alterações de movimento nos peixes como o que foi observado neste trabalho é algo visto de forma semelhante em outros estudos. Zhao *et al.*(2020) em seu estudo expôs embriões de peixe-zebra a concentrações de 5 µg/L a 20 µg/L de chumbo e observaram comprometimento neurocomportamental na forma de hipoatividade e comportamentos de rotação. Dou & Zhang (2011), que expuseram embriões de peixe-zebra a concentrações de chumbo de 0,05-0,7 mM, avaliaram a ação de fuga após estímulo tátil e os embriões tratados com chumbo tiveram a resposta de fuga menor que aqueles analisados do grupo controle. Kataba *et al.* (2022) expôs embriões de peixe-zebra a concentrações de 1, 10 e 100 µg/L de chumbo, e mostrou uma menor atividade locomotora dos embriões expostos ao chumbo às 24 hpf em comparação com o controle, sugerindo que durante uma exposição inicial o chumbo pode induzir a uma diminuição da atividade locomotora.

Por outro lado, neste estudo pode-se constatar presença de hiperatividade também, semelhante a um estudo de Kataba *et al.* (2020), apresentou larvas de peixe-zebra com 120 hpf ao chumbo nas concentrações de 3, 91 e 250 µg/L, todavia, este trabalho realizou a exposição por 96 horas, enquanto que o estudo de Kataba *et al.* (2020) expôs por 30 minutos apenas, caracterizando-se como em exposição aguda, avaliando o comportamento locomotor, e observaram que a distância total média percorrida e a velocidade média de nado nos grupos tratados foram maiores que aquelas vistas no grupo controle. Outras avaliações em relação a velocidade percorrida também mostraram que grupos expostos às concentrações de chumbo se moviam significativamente mais que aqueles do grupo controle, indicando presença de hiperatividade durante um maior tempo de exposição. Zhao *et al.* (2020) também observaram hiperatividade em comportamentos sociais nas concentrações de 10 µg/L e 20 µg/L de chumbo.

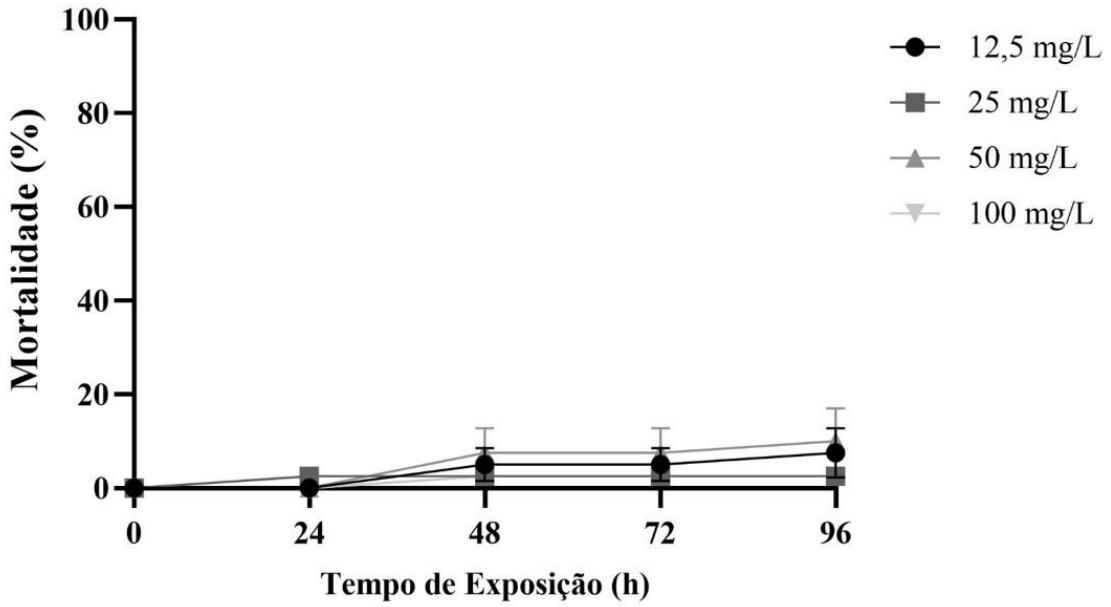
As alterações locomotoras que se associam com a diminuição dos reflexos e da natação estão relacionadas com o comprometimento do sistema nervoso causado pela exposição ao chumbo, que apresenta como sinais a perda de neurônios motores, alteração gênica, deficiência estrutural e na vascularidade cerebral, bem como um aumento de áreas que sofrem de apoptose. Pode-se inferir pela metodologia utilizada neste trabalho que o chumbo afetou as larvas de *D. rerio* através de um destes mecanismos, uma vez que quanto maior o tempo de exposição nas fases iniciais após a fertilização, maior a presença de danos duradouros. A competição com íons de cálcio, bem como o comprometimento do metabolismo (o chumbo em si e o estresse oxidativo causado por ele pode afetar as vias MAPK e receptores NMDA e GABA, por exemplo) pode levar ainda a uma resposta excitatória rápida, levando os animais a apresentarem sinais de alteração locomotora associados a hiperatividade. (ROY, N. M. *et al.* 2014; ROY, N. M., DEWOLF, S., & CARNEIRO, B. 2015; WANGA, Z. *et al.* 2022).

5.2. Avaliação da toxicidade do extrato

O experimento realizado visou encontrar a máxima concentração do extrato dos frutos de *E. involucrata* que não induz efeito adverso (NOAEL). A Figura 14 demonstra os resultados de mortalidade obtidos após a exposição dos embriões a concentrações crescentes do extrato. Pode-se verificar que o extrato até a máxima concentração testada (200mg/L) não induziu mortalidade nos embriões. Atualmente, não há estudos na literatura que tenham testado extratos de *E. involucrata* em embriões e larvas de peixe-zebra. Trabalhos que avaliaram a toxicidade de outros extratos vegetais em embriões e larvas mostram resultados diversos que demonstram

toxicidade em concentrações variando na faixa de 1,25 µg/mL até 40 g/L. (CHEN, L. *et al.*, 2018; ALAFIATAYO, A. A. *et al.*, 2019; THIAGARAJAN, S. K. *et al.*, 2019; RAJESHKUMAR, S. *et al.*, 2019; OH, J-Y. *et al.*, 2020; VEEREN, B. *et al.*, 2020; YUMNAMCHA, T. *et al.*, 2020; KIM, S. *et al.*, 2021; NGUYEN, T. H. *et al.*, 2021; TOMAZI, R. *et al.*, 2021; CASTRO, T. F. D. *et al.*, 2022; ARIANI, A. *et al.*, 2023; DESHMUKH, D. *et al.*, 2023).

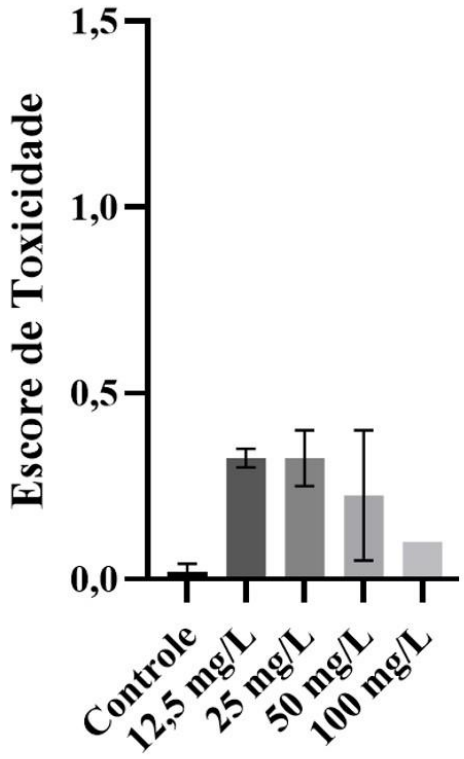
Fig. 14– Mortalidade observada em larvas de *Danio rerio* expostas a diferentes concentrações de extrato de *E. involucrata.*



As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações crescentes de extrato e a mortalidade avaliada a cada 24h. Cada ponto representa a média ± EPM dos experimentos realizados. (N=2). Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Considerando que era procurado uma concentração de extrato que além de não ser tóxica, também não induzisse efeitos adversos, avaliou-se a morfologia dos embriões expostos ao extrato. Ao analisar o escore de toxicidade, observa-se que houve menos de 0,5 alterações morfológicas por animal e que não ocorreram diferenças significativas entre as concentrações de extrato testadas. Optou-se por dar seguimento aos estudos com a concentração de 100mg/L de extrato vegetal (Fig. 15).

Fig. 15 – Escore de toxicidade induzido por extrato de *E. involucrata* após 96 horas de exposição.



As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações crescentes de extrato e a toxicidade foi avaliada de acordo com parâmetros morfológicos. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Diversas pesquisas têm evidenciado as propriedades *in vitro* dos extratos da *E. involucrata* como efeitos de ação anti inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante. (NICÁCIO, A. N. *et al.*, 2017; TOLEDO, A. P. *et al.*, 2018; GIRARDELO, J. R. *et al.*, 2020; MANNINO, G. *et al.*, 2022). Apesar da presença de diversos trabalhos mostrando a sua atividade biológica, apenas um trabalho avaliou a sua toxicidade *in vivo*. Sardi *et al.* (2017) utilizaram macrófagos para avaliar a toxicidade *in vitro* de extratos de plantas do gênero *Eugenia*, e larvas de *Galleria mellonella* para avaliar sua toxicidade *in vivo*. As concentrações avaliadas para a toxicidade *in vitro* foram de 0 a 400 μg/mL, enquanto que a toxicidade *in vivo* foi avaliada nas concentrações de 0 a 2500 mg/kg. Os autores mostraram que os extratos das sementes de *E. leitonii* e das sementes e folhas de *E. brasiliensis* não afetaram a viabilidade celular em concentrações de até 400 μg/mL. Nos ensaios *in vivo*, as concentrações letais para as larvas foram estimadas em 1.500 mg/kg para *E. leitoniii* (sementes); 2.500 mg/kg para *E. brasiliensis* (sementes); e 1.250 mg/kg para *E. brasiliensis* (folha).

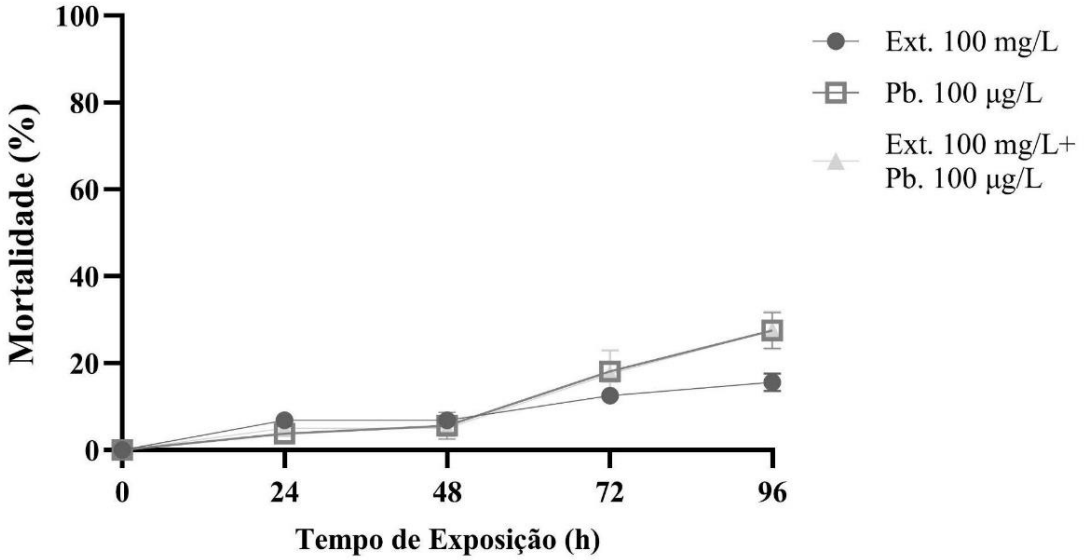
Pode-se observar que nas concentrações utilizadas no presente estudo o extrato de *E. involucrata* não se mostrou tóxico, o contrário do que os extratos de outras plantas testados por Chen *et al.* (2018), Yumnamcha *et al.* (2020) e Nguyen *et al.* (2021) mostraram, considerando que a toxicidade só foi constatada em altas concentrações do extrato de outras plantas de mesmo gênero (SARDI, *et al.* 2017), tal condição explicaria a falta de efeitos letais e toxicológicos observados neste estudo.

5.3.Avaliação do efeito protetor do extrato de E. involucrata frente a exposição ao chumbo

Este estudo demonstrou o efeito tóxico do chumbo principalmente na máxima concentração de 100 µg/L. Além disso foi determinada uma concentração de extrato vegetal que não induziu efeitos adversos significativos (100 mg/L). Dando seguimento aos objetivos deste estudo, seguiu-se com a avaliação do possível efeito protetor do extrato vegetal contra os danos induzidos pelo chumbo.

A avaliação da mortalidade e das alterações morfológicas foram realizadas como anteriormente descritos. Conforme demonstrado na Figura 16, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, ou seja, o extrato de *E. involucrata* não protegeu contra a mortalidade induzida pelo chumbo.

Fig. 16 – Mortalidade observada em larvas de *Danio rerio* expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata.*



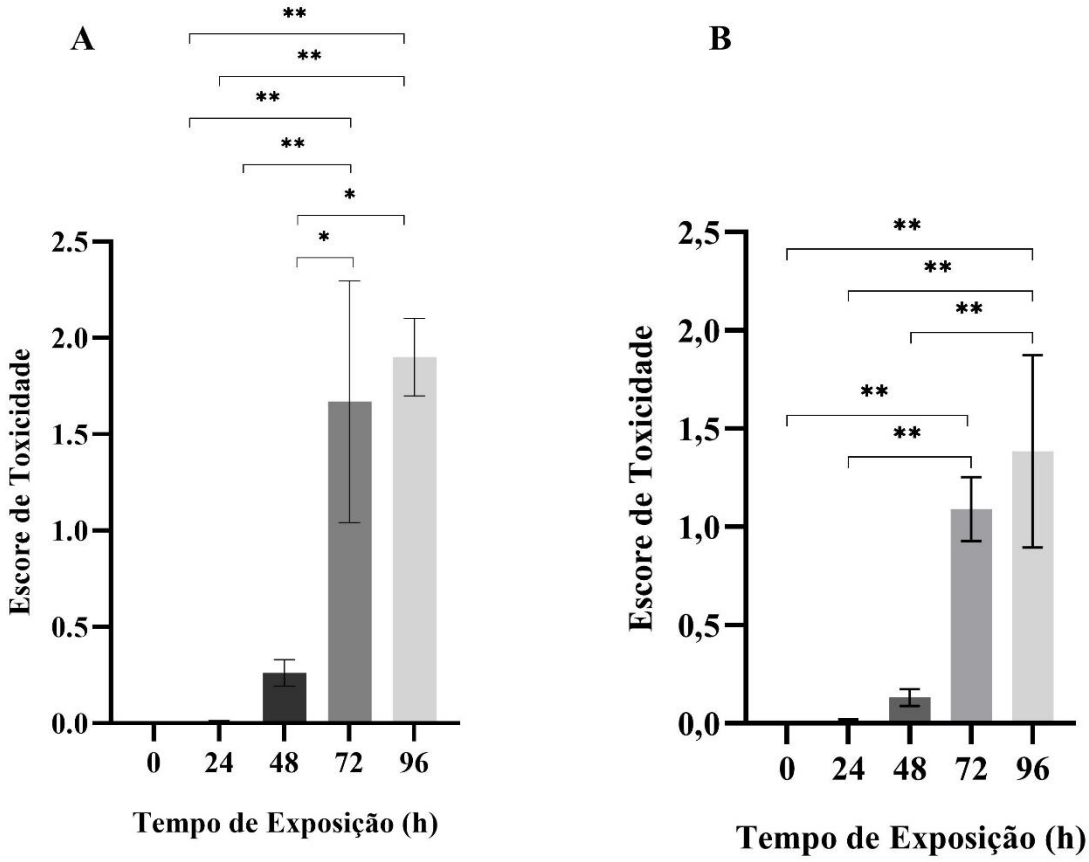
As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações pré-determinadas de extrato de *E. involucrata,* chumbo e extrato de *E. involucrata* com chumbo, e a mortalidade avaliada a cada 24h. Cada ponto representa a média ± EPM dos experimentos realizados. (N=7). Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Em literatura encontra-se estudos que avaliaram o efeito de outros extratos vegetais associados ao chumbo que mostraram resultados diferentes dos vistos neste estudo, por exemplo, um estudo feito em 2019 por Yogeswari *et al.* observou o efeito do acetato de chumbo (concentrações de 0,1; 0,5 e 1 ppm) na viabilidade de embriões e larvas de peixe-zebra associados a um extrato aquoso de alho (na concentração de 1 µg/ml). A exposição ocorreu de 5 hpf até 8 dpf, e mostrou que tanto os efeitos nocivos do chumbo quanto os efeitos protetores do extrato de alho com chumbo foram concentração-dependentes.

Considerando estudos *in vitro* a respeito da citotoxicidade de plantas do gênero *Eugenia*, pode-se inferir que seria necessária uma concentração diferente para observar possíveis efeitos em um organismo complexo, visto que em um estudo de 2025 testes em macrófagos murinos RAW 264.7 mostraram viabilidade de 80% em concentrações acima de 500 µg/mL de extrato de *Eugenia involucrata,* com ação antioxidante significativa em estudos *in vitro* nas concentrações de 2701,67 µM e 1490,79 µM (TEÓFILO, M. N. G. *et al.*, 2025). No estudo de Sardi, *et al.* (2017) observa-se que a parte da planta utilizada para a preparação do extrato influencia a atividade biológica das espécies testadas. Sardi, *et al*. (2017) também tesou a concentração inibitória mínima de extratos de plantas do mesmo gênero na ação antifúngica,

constatando que extratos de outras plantas do gênero (*E. leitonii* e *E. brasiliensis*) mostraram uma maior atividade que o extrato de *E. involucrata*, em concentrações menores. Isto sugere que para efeitos antioxidantes significativos se apresentarem novos testes deveriam ser feitos com concentrações diferentes, principalmente considerando que o extrato do fruto da *E. involucrata* tem uma atividade antioxidante menor que a da semente, por exemplo. (GIRARDELO, J. R., *et al*. 2020). Dando continuidade ao estudo do possível efeito protetor do extrato vegetal, avaliamos os parâmetros morfológicos e de movimento dos animais quando expostos ao chumbo em associação ao extrato. Algumas das alterações estudadas ocorreram em um valor não significativo, como edema de saco vitelino, delay (atraso no desenvolvimento), alteração na formação do olho, alteração na pigmentação, presença de coágulos, ausência de otólitos e eclosão incompleta do ovo. No grupo tratado apenas com chumbo (Fig.17A), o escore de toxicidade se encontra entre 1,5 e 2 nos tempos de exposição de 72h e 96h, e quando associado ao extrato (Fig.17B) o escore sugeriu uma diminuição, porém, essa diferença entre os grupos não é estatisticamente significativa considerando estes dois grupos de exposição em específico, como visto na figura 18.

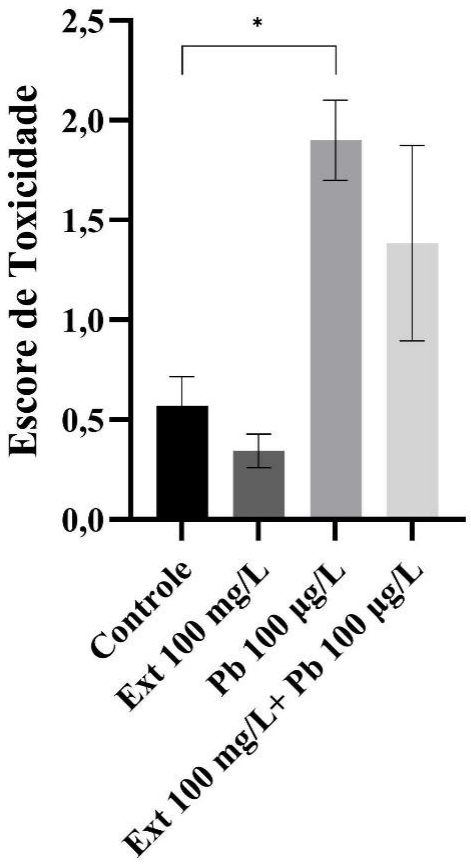
Fig. 17 –Avaliação da toxicidade do chumbo e do extrato de *E.involucrata* em relação ao tempo de exposição.



As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações crescentes de chumbo e a toxicidade foi avaliada de acordo com parâmetros morfológicos e de movimento. (A) chumbo 100 µg/L, (B) Extrato 100 mg/L e chumbo 100 µg/L. Cada ponto representa a média ± EPM dos experimentos realizados. (N=4). A significância foi definida como *P< 0,05 e **P <0,01 quando comparado com o tempo 0h, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Quando comparado o escore de toxicidade em 96 horas entre os grupos de exposição, observou-se que houve um escore maior no grupo exposto apenas ao chumbo em relação ao controle. Essa diferença estatística não foi observada entre controle e o tratamento de chumbo + extrato vegetal. Também não houve diferença estatística entre os grupos tratados com chumbo e chumbo + extrato vegetal. (Fig. 18).

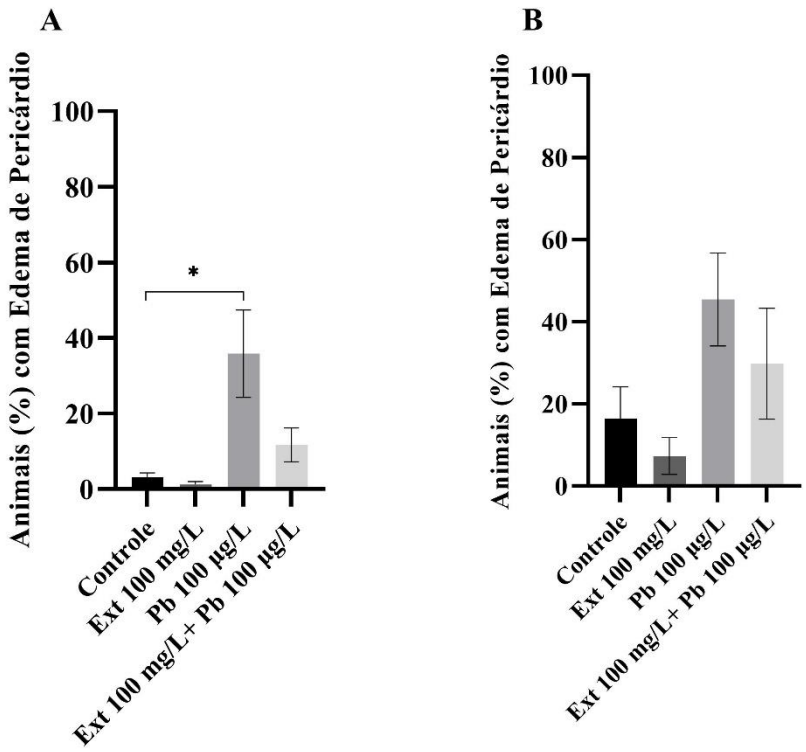
Fig. 18– Escore de toxicidade na exposição ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata* após 96 horas de exposição.



As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações pré-determinadas de extrato, chumbo e extrato com chumbo e a toxicidade foi avaliada de acordo com parâmetros morfológicos e de movimento. Cada ponto representa a média ± EPM dos experimentos realizados. (N=4). A significância foi definida como *P< 0,05 quando comparado os grupos, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

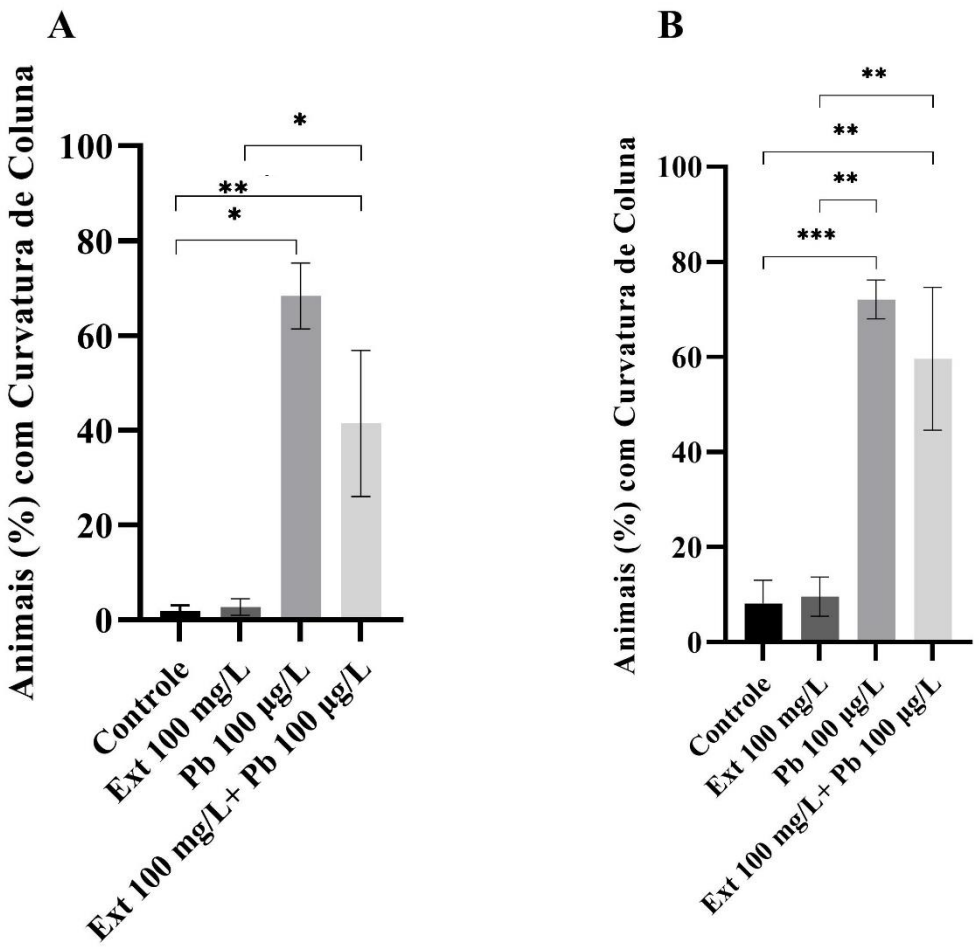
Dando continuidade à avaliação do possível efeito protetor do extrato, avaliou-se as alterações morfológicas nos embriões, isoladamente. Não houve diferença estatística em todos os parâmetros morfológicos e comportamentais avaliados, entre os grupos tratados com chumbo e chumbo + extrato vegetal (Fig. 19, 20, 21, 22 e 23). Estes resultados sugerem que o extrato não ofereceu proteção em relação aos efeitos tóxicos do chumbo.

Fig. 19- Avaliação da taxa de edema de pericárdio em larvas expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata.*



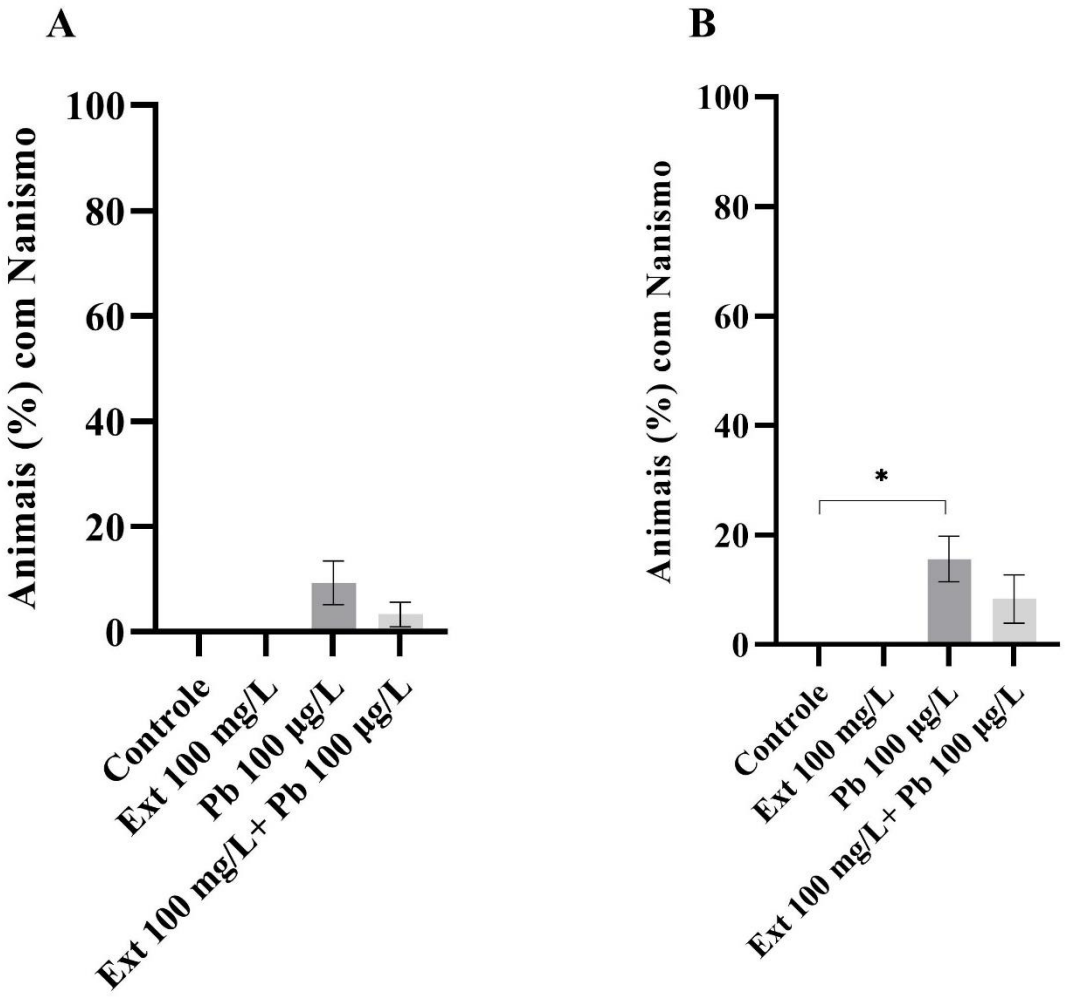
A porcentagem de larvas com edema de pericárdio foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo e ao extrato em concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* chumbo na concentração de 100 µg/L e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=4). A significância foi definida como *P < 0,05 quando comparado os grupos, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Fig. 20- Avaliação da taxa de curvatura de coluna em larvas expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata*



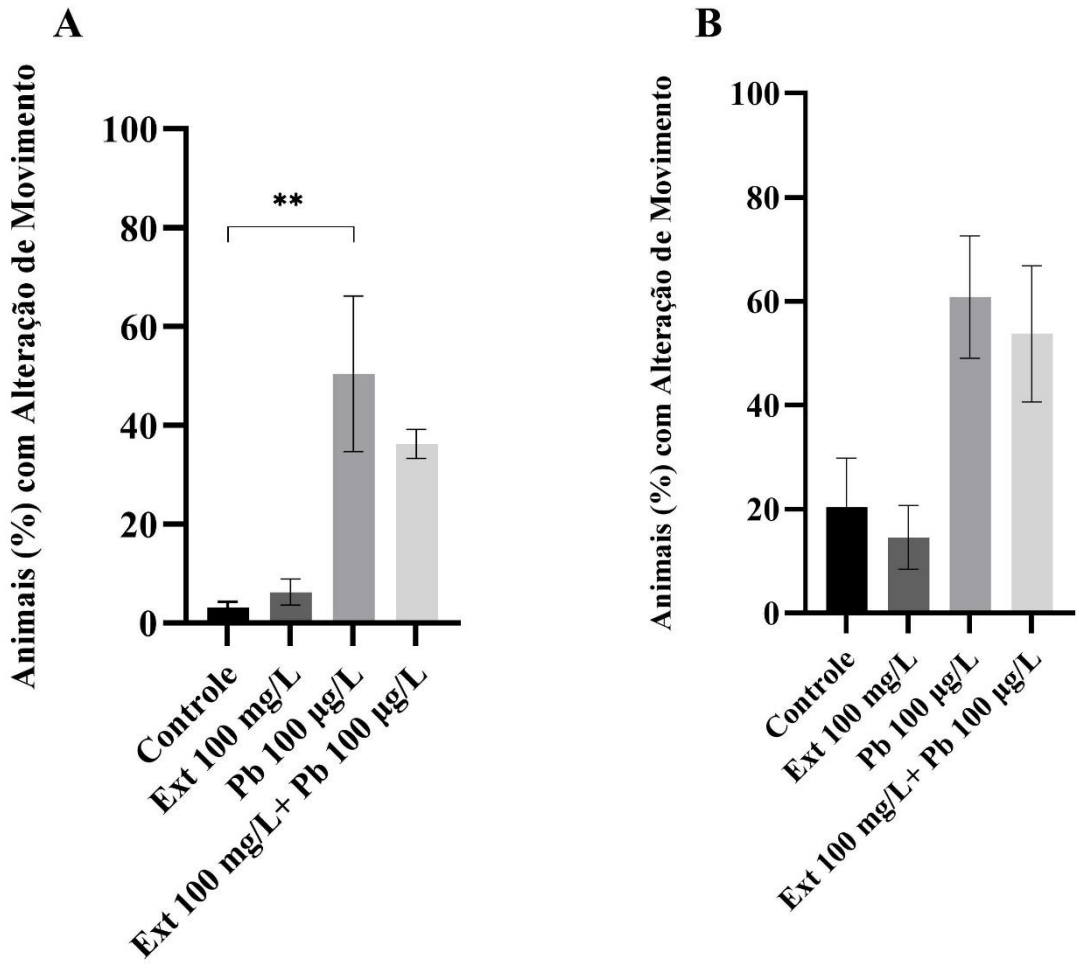
A porcentagem de larvas com curvatura de coluna foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo e ao extrato em concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* chumbo na concentração de 100 µg/L e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=4). A significância foi definida como *P < 0,05; **P < 0,01 e ***P < 0,001 quando comparado os grupos, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024),

Fig. 21- Avaliação da taxa de nanismo em larvas expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata.*



A porcentagem de larvas com nanismo foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo e ao extrato em concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* chumbo na concentração de 100 µg/L e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=4). A significância foi definida como *P < 0,05 quando comparado os grupos, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Fig. 22- Avaliação da taxa de alterações de movimento em larvas expostas ao chumbo e ao extrato de *E.involucrata.*



A porcentagem de larvas com alteração de movimento foi avaliada após 72 e 96 horas de exposição ao chumbo e ao extrato em concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* chumbo na concentração de 100 µg/L e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (A) 72 horas de exposição, (B) 96 horas de exposição. Cada coluna representa a média ± EPM dos experimentos realizados (N=4). A significância foi definida como **P < 0,01 quando comparado os grupos, usando ANOVA com pós-teste de Tukey. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Uma pesquisa realizada por Nabil-Adam & Shreadah, (2021), avaliou a ação benéfica do extrato polifenólico de *Ulva lactuca* contra a ação de metais pesados incluindo chumbo, em ratos com sete dias de exposição e constataram múltiplos danos histopatológicos ao fim do período de exposição aos metais pesados, o que não foi observado no grupo exposto ao extrato, indicando sua capacidade protetora. Estes resultados e aqueles como dos outros dois artigos citados são diferentes do que foi observado neste estudo em sua expectativa da atuação do extrato em relação a exposição de contaminantes.

No estudo de Tamagno *et al.*(2022), realizado em peixes-zebra adultos, foi constatado alterações comportamentais nos grupos expostos a cobre, e mostraram uma redução dessas alterações nos grupos expostos a concentrações crescentes do extrato de *Hylocereus undatus* (pitaya).

DeiviArunachalam *et al.* (2021) expuseram adultos de *P. sutchi* (bagre de água doce) a cádmio (5,75 mg/L) e ao extrato metanólico da folha de *Morinda tinctoria* na concentração de 200 mg/kg. Eles observaram alterações histopatológicas nas brânquias, músculos, fígado e rim no grupo exposto ao metal e quando foi associado o extrato, houve uma recuperação dessas alterações bem como, uma redução do acúmulo de cádmio no organismo.

Devido as propriedades antioxidantes e antinflamatórias reconhecidas em plantas do gênero *Eugenia* pode-se supor que com uma concentração diferente de extrato houvesse a proteção contra os danos causados pelo chumbo. Um estudo utilizando espécies vegetais (*L. sativa*) expostas a mercúrio e em seguida tratadas com extrato de *E. jambolana* sugeriu que o extrato tenha um efeito citoprotetor devido a um alto potencial de complexação com metais e como agente antioxidante pela presença de flavonoides em sua composição, que tem uma alta capacidade redox.

Outros estudos, como visto em Goldoni, *et al*. (2019), que expuseram camundongos Swiss machos a carregenina e observaram que o extrato da folha de *Eugenia umbelliflora* teve um efeito significativo na prevenção da hipersensibilidade nas concentrações de 0,3, 1 ou 3 mg/kg. Ávila, *et al.* (2016) também utilizou camundongos Swiss como modelo de pesquisa, expondo os animais a um pré-tratamento com concentrações de 50 a 500 mg/kg de extrato de folhas de *E. dysenterica* durante 10 dias e em seguida expondo-os a 30 mg/kg de Cr(VI), com o extrato aumentando a taxa de sobrevivência e prevenindo danos patológicos ao organismo, semelhante a Victoria, *et al*. (2013), que observaram o efeito hepatoprotetor do extrato de *E. uniflora* na concentração de 200 mg/kg em camundongos albinos suíços que foram expostos a 300 mg/kg de paracetamol.

Com base nessa literatura, pode-se dizer que há potencial semelhante na *E. involucrata*, por pertencer ao mesmo gênero e já ter confirmado sua potencialidade como antioxidante, antinflamatório e antitumoral em outros estudos *in vitro* anteriormente citados.

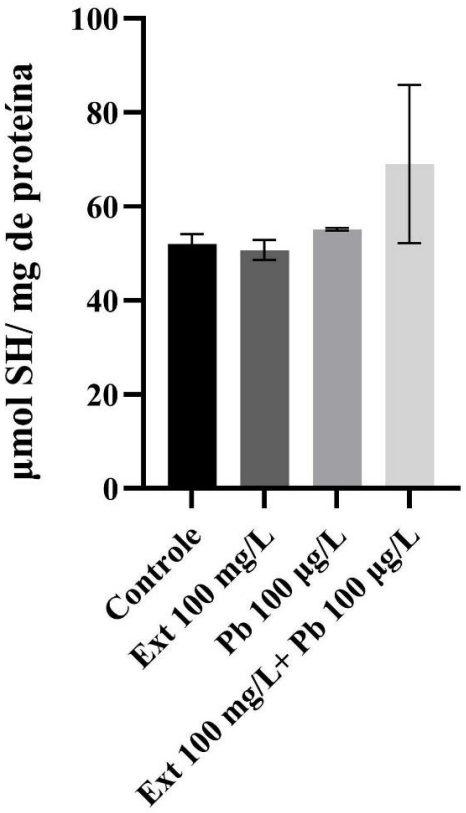
5.4. Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo

O possível efeito protetor do extrato de *E.involucrata* foi também avaliado através de biomarcadores de estresse oxidativo como dosagem de tióis não proteicos e peroxidação lipídica.

5.4.1 Dosagem de tióis totais não proteicos

Este estudo avaliou o efeito do chumbo (100 µg/L) associado ou não ao extrato, na concentração de tióis não proteicos (SHNP). Não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos de exposição com chumbo, extrato e extrato com chumbo em comparação com o controle (Fig. 23).

Fig. 23 –Níveis de SNHP em larvas de *Danio rerio* expostas ao chumbo e ao Extrato de *E.involucrata.*



As larvas foram incubadas por 96 horas em concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* chumbo na concentração de 100 µg/L e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. Cada coluna representa a média ± EPM (N=3). Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Os tióis não proteicos atuam na ação antioxidante, em específico com compostos não-proteícos, como a glutationa, por exemplo, e também atuam no metabolismo redox, auxiliando a diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo, são moléculas que em sua composição possuem o grupo sulfidrila (-SH). Neste estudo em questão, não houve alteração significativa na dosagem de tióis não proteicos como o esperado, considerando que devido a exposição ao chumbo a dosagem de tióis não proteicos possa mostrar um aumento compensatório por meio de uma resposta adaptativa temporária, como pela ativação de enzimas de síntese de glutationa e metabolismo da cisteína, ou uma queda da dosagem devido a competição direta do chumbo com os grupos Sulfidrila (-SH), consumo da glutationa na neutralização do estresse oxidativo ou intervenção da regeneração de glutationa ao inibir enzimas como a glutationa redutase. (KACZOR, M. *et al*., 2013; DEY, K. K. *et al.*,2024; DEY, K. K. *et al.*,2025). O resultado deste estudo diferiu quanto a expectativa de observar um aumento significativo na dosagem de tióis não proteicos como o observado no estudo de Kharoubi *et al*. (2008), por exemplo, que realizou a exposição de grupos de ratos a 750 mg/kg de acetato de chumbo e a 200 mg/kg de extrato aquoso de *A. absinthium.* Em sua avaliação de níveis de SHNP nos glóbulos vermelhos notaram um aumento significativo no grupo exposto ao chumbo, em comparação com o grupo controle e com o grupo exposto ao chumbo e ao extrato.

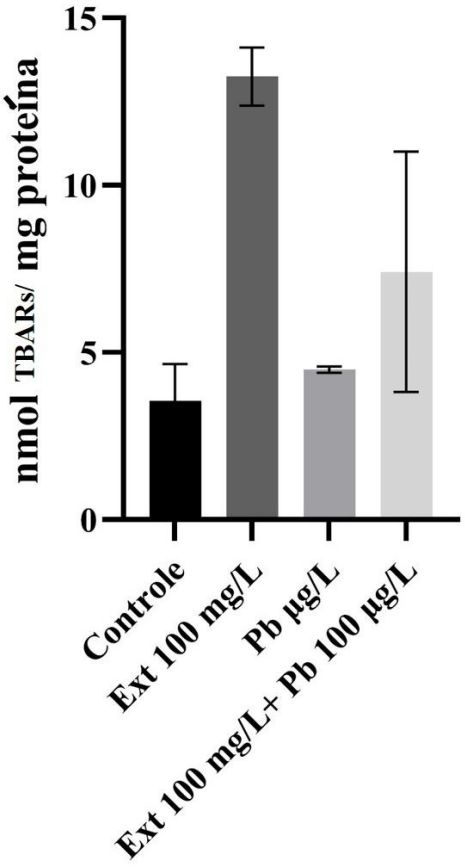
Estudos com outros modelos de pesquisa como o peixe-zebra também avaliam a toxicidade de uma substância e a resposta do organismo a ela, um dos métodos de avaliação seria para a dosagem de SHNP nas amostras. Devido a variações anatomo-fisiológicas entre os modelos de pesquisa, os resultados esperados podem ser diferentes de acordo com diversos fatores, por exemplo, segundo Kataba *et al*. (2020) a variabilidade que pode haver em resultados de experimentos envolvendo toxicidade, como a exposição ao chumbo, pode se dar devido a fatores como concentração do tratamento, tempo de exposição, tamanho da amostra e estágio do desenvolvimento do peixe-zebra em que ocorre o experimento. Há possibilidade de que os resultados obtidos neste estudo sejam devido ao curto tempo de exposição.

5.4.2. Avaliação da Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é um dos meios pelo qual o estresse oxidativo pode ser mensurado e permite a avaliação de danos aos lipídeos e a eficácia de terapias antioxidantes. (RANI, V. *et al*., 2016). A peroxidação lipídica foi avaliada pelo método do TBARS em larvas

de peixe-zebra expostas a diferentes concentrações de chumbo. Este estudo avaliou o efeito do chumbo associado ou não ao extrato e não houve variação significativa entre os grupos quando comparadas ao controle (Fig. 24).

Fig. 24 – Peroxidação Lipídica em larvas de *Danio rerio* expostas ao chumbo e ao Extrato de *E.involucrata.*



Avaliação da peroxidação lipídica através do método TBARS após 96h exposição das larvas a concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* chumbo na concentração de 100 µg/L e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. Os dados são expressos como média ± EPM. N=2. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Não foram encontrados estudos na literatura que tenham avaliado a peroxidação lipídica em embriões de peixe-zebra expostos ao chumbo e ao extrato de plantas do gênero *Eugenia*. No entanto, Liu *et al.* (2025) expos embriões de peixe-zebra de 6hpf a tálio e chumbo por 96 horas, testando em ambas as concentrações de 25 µg/L e 100 µg/L para avaliar os mecanismos da neurotixicidade induzida por estes metais e observou um aumento de marcadores de resposta ao estresse oxidativo e na peroxidação lipídica. Há ainda um estudo que avaliou o chumbo em

peixe-zebra adulto e observou aumento a peroxidação lipídica após 30 dias de exposição a 5 ppm de chumbo. Uma das possíveis justificativas para não termos observado esse dano lipídico em nos ensaios deste trabalho é a baixa concentração relacionada ao curto tempo de exposição. (DEY, K. K. *et al.*,2024).

Outros estudos avaliaram a peroxidação lipídica em outras espécies e com outros metais. Noureen *et al.* (2022), por exemplo, avaliou a peroxidação lipídica em carpas comuns (*Cyprinus carpio*) expostas a nanopartículas de óxido de cobre e os efeitos do extrato metanólico de *Trigonella foenum-graecum* (concentrações de 100, 125 ou 150 mg/L). Seu estudo constatou que o nível de lipoperoxidação lipídica aumentou nas amostras de fígado e guelras expostas ao metal em comparação com o controle e que houve uma redução concentração-dependente desse nível nas amostras expostas ao cobre e ao extrato.

DeiviArunachalam *et al.* (2021) realizou um estudo para observar o potencial antioxidante e antigenotóxico do extrato metanólico de *Morinda tinctoria* na concentração de 200 mg/L em bagres asiáticos (*Pangasius sutchi) ex*postos ao cádmio (5,75 mg/L). Eles constataram aumento significativo do nível de peroxidação lipídica em músculo, fígado, guelras e rim dos animais expostos ao cádmio em comparação com os outros grupos, e uma diminuição desse valor quando os animais obtiveram suplementação alimentar com o extrato.

Outros trabalhos avaliaram a peroxidação lipídica induzida por estresse oxidativo em outras espécies (roedores como ratos e camundongos) expostas a substâncias nocivas, como Rotenona, ácido 3-nitropropiônico e outros metais como chumbo, suas análises mostraram um aumento da peroxidação lipídica quando em comparação com o controle em todos eles. Esses trabalhos também avaliaram a eficácia antioxidante de extratos de plantas quando expostos junto a estas substâncias (extrato etanólico de *Bacopa monnieri,* extrato aquoso de *Artemisia absinthium* e extrato etanólico de *Smilax glabra*, respectivamente) (KHAROUBI, O. *et al*., 2008; XIA, D. *et al*., 2010; SHINOMOL, G. K. *et al*., 2012; SHINOMOL, G. K., BHARATH, M. M. S. & MURALHIDARA, 2012).

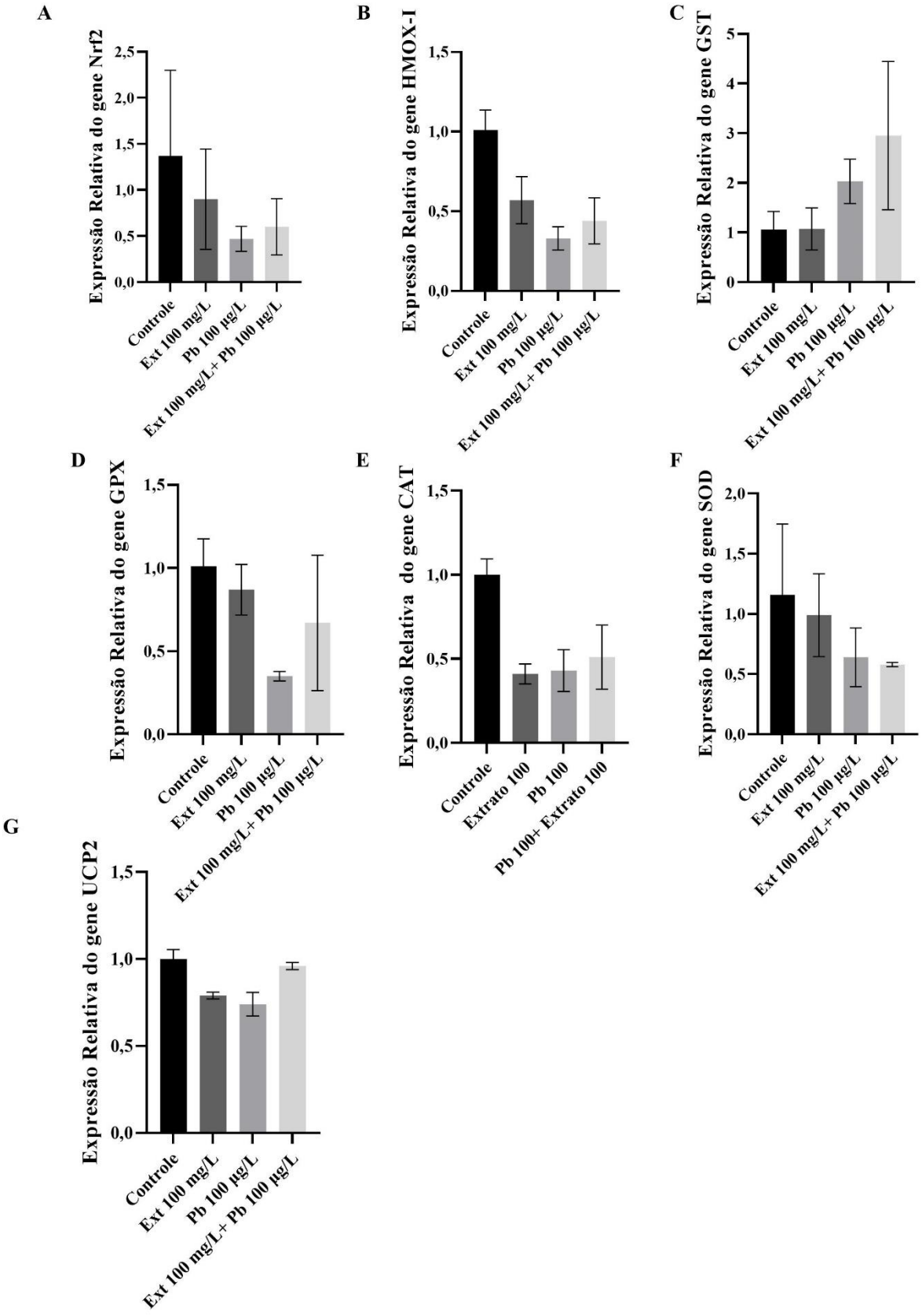
Neste estudo não foi observado um efeito protetor no extrato vegetal em relação ao chumbo. Percebe-se inclusive que o extrato vegetal induziu um aumento da peroxidação lipídica, ainda que não estatisticamente significativo, e que estudos com maior tempo de exposição precisam ser realizados a fim de verificar uma possível ação protetora do extrato isolado sobre o estresse oxidativo.

5.5. Avaliação da expressão gênica em resposta ao chumbo e ao extrato vegetal

A fim de caracterizar melhor o efeito do chumbo e do chumbo associado ao extrato de *E.involucrata* selecionou-se diversos genes que atuam na defesa antioxidante (Nrf2, HMOX-I, GST, GPX, CAT, SOD e UCP2), como também na respiração celular (COX1) e na morte celular (P53, NOXA, PUMA, BAX, BCL2). Os resultados da expressão relativa destes genes estão representados nas figuras abaixo.

Os genes Nrf2, HMOX-I, GST, GPX, CAT, SOD e UCP2 foram analisados neste estudo e constatou-se que não houve alteração em relação à diminuição da expressão dos genes, possivelmente em decorrência do alto S.E.M, logo, não há diferença estatística entre os grupos de tratamento. (Fig 25).

Fig. 25 – Efeito do chumbo associado ou não ao extrato de *E.involucrata* na expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante.



Avaliação da expressão relativa dos genes após 96h exposição das larvas a concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* 100 µg/L de chumbo e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (A) Gene Nrf2; (B) Gene HMOX-I; (C) Gene GST; (D) Gene GPX; (E) Gene CAT; (F) Gene SOD, (G) Gene UCP2. Os dados são expressos como média ± EPM. N=2. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

O fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) é um importante fator de transcrição que regula a expressão de alguns genes antioxidantes e relacionados a proteção celular é comumente ativado durante o estresse oxidativo e também atua nas vias de sinalização relacionadas a apoptose e metabolismo celular, deixando este gene direta ou indiretamente associado aos genes observados neste estudo. Em condições normais a proteína codificada por este gene permanece inativa no citoplasma, ligada a proteína Keap1, contudo, em resposta ao estresse oxidativo a proteína se dissocia de Keap1, translocando para o núcleo e se ligando a regiões promotoras de genes relacionados a expressão de proteínas antioxidantes e de resposta ao estresse oxidativo. (YIN, J. *et al.,* 2017; XU, Y. *et al.,* 2023; DEY, K. K. *et al.,* 2024).

O fator de transcrição Nrf2 regula a expressão do gene GST, estimulando a síntese de seu RNAm em resposta ao estresse oxidativo. A proteína GST, codificada pelo gene de mesmo nome, atua no equilíbrio redox ao catalisar a conjugar a glutationa (GSH) com xenobióticos. Os genes CAT e SOD também são afetados pelo gene Nrf2, mas indiretamente, visto que o fator de transcrição Nrf2, ao atuar nas vias de resposta antioxidante em decorrência do estresse oxidativo promove a ativação da expressão de genes que codificam proteínas como CAT, SOD e GPX. SOD converte o ânion superóxido (O^2-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que passa a ser neutralizado por CAT ao converter H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2), além da ação da proteína GPX, que age com glutationa como co-fator. (SOLEIMANZADEH, A. *et al*., 2020; XU, Y. *et al*., 2023; DEY, K. K. *et al.,* 2024).

O gene HMOX-I codifica a enzima Heme Oxigenase, catalisando a degradação do Heme em biliverdina, monóxido de carbono e ferro livre, levando a uma resposta adaptativa celular com subprodutos com propriedades anti inflamatória e antioxidante. (XU, J. *et al.,* 2008; YIN, J. *et al.,* 2017; SOLEIMANZADEH, A. *et al*., 2020; XU, Y. *et al*., 2023; DEY, K. K. *et al.,* 2024).

Comumente é visto em literatura um efeito pró-oxidante na exposição ao chumbo, com um aumento de Nrf2 e das defesas antioxidantes (YIN, J. *et al.,* 2017; PARK, K. *et al*., 2020; KATABA, A. *et al.,* 2020, 2022; SOLEIMANZADEH, A. *et al*., 2020). Neste trabalho não foi observado esse efeito pró-oxidante, fato que pode estar relacionado ao baixo número de repetições (n=2) mas também pode estar relacionado a um estímulo insuficiente para o

organismo ativar a resposta ao estresse oxidativo, uma vez que a análises de biomarcadores como SHNP e peroxidação lipídica também não mostraram alterações significativas que tendem a estar presentes em caso de uma reação oxidante relevante no organismo.

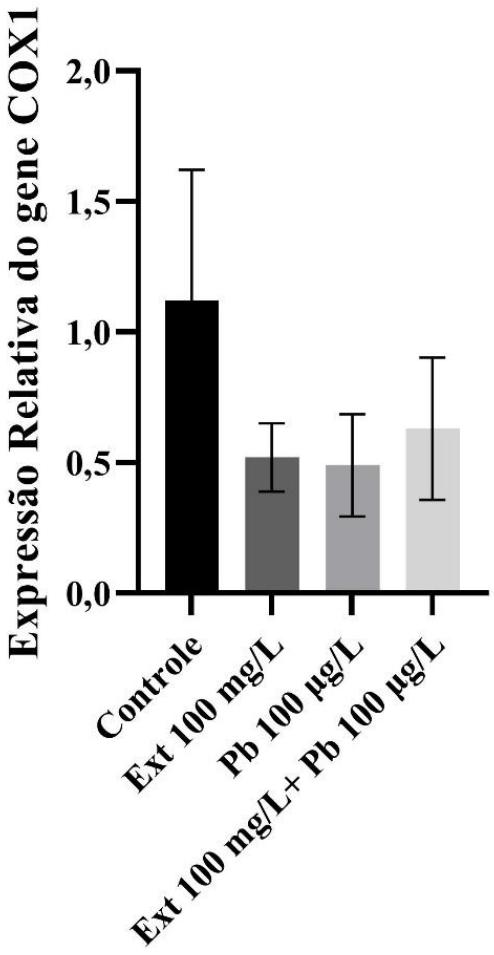
O gene UCP2 (proteína desacopladora 2) integra uma via de regulação do metabolismo energético no organismo. A proteína codificada por esse gene localiza-se na mitocôndria, mais especificamente na membrana mitocondrial interna, onde atua desacoplando a cadeia transportadora de elétrons. Esse mecanismo reduz a síntese de ATP sem alterar significativamente o consumo de O_2, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que minimiza danos oxidativos e protege a célula contra a apoptose induzida pelo estresse oxidativo. (YIN, J. *et al.*, 2017).

O gene COX1 codifica uma das principais subunidades da enzima citocromo c oxidase (também conhecida como Complexo IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial). A enzima citocromo c oxidase se localiza na membrana interna mitocondrial e é composta por 13 subunidades, sendo que três destas subunidades (COX1, COX2 e COX3) são codificadas pelo DNA mitocondrial e desempenham funções essenciais envolvidas na respiração celular, atuando na transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular (O_2), reduzindo-o a água (H_2O). A citocromo c oxidase desempenha um papel essencial na formação do gradiente de prótons, que leva a fosforilação oxidativa, contribuindo para a produção de ATP. (BADEN, K. N. *et al*., 2007; RAK, M. *et al*., 2016).

Quando a função do citocromo c oxidase (complexo IV) é comprometida pode implicar de forma negativa a cadeia de transporte de elétrons que, por sua vez, pode gerar acúmulo de elétrons desemparelhados anormal no organismo, resultando na geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando um desequilíbrio que induz ao estresse oxidativo e danos a proteínas, lipídeos e ao DNA. (RAMZAN, R., KADENBACH, B., VOGT, S. 2021).

Neste estudo, foi observada que não houve variação estatística significativa entre os tratamentos, comparando entre si ou com o controle na expressão do gene COX1 (Fig. 26). Estes resultados contrastam com outros estudos que relataram nas amostras compostas por larvas um aumento da expressão do gene COX1 em resposta ao chumbo (KATABA, A. *et al*., 2020, 2022).

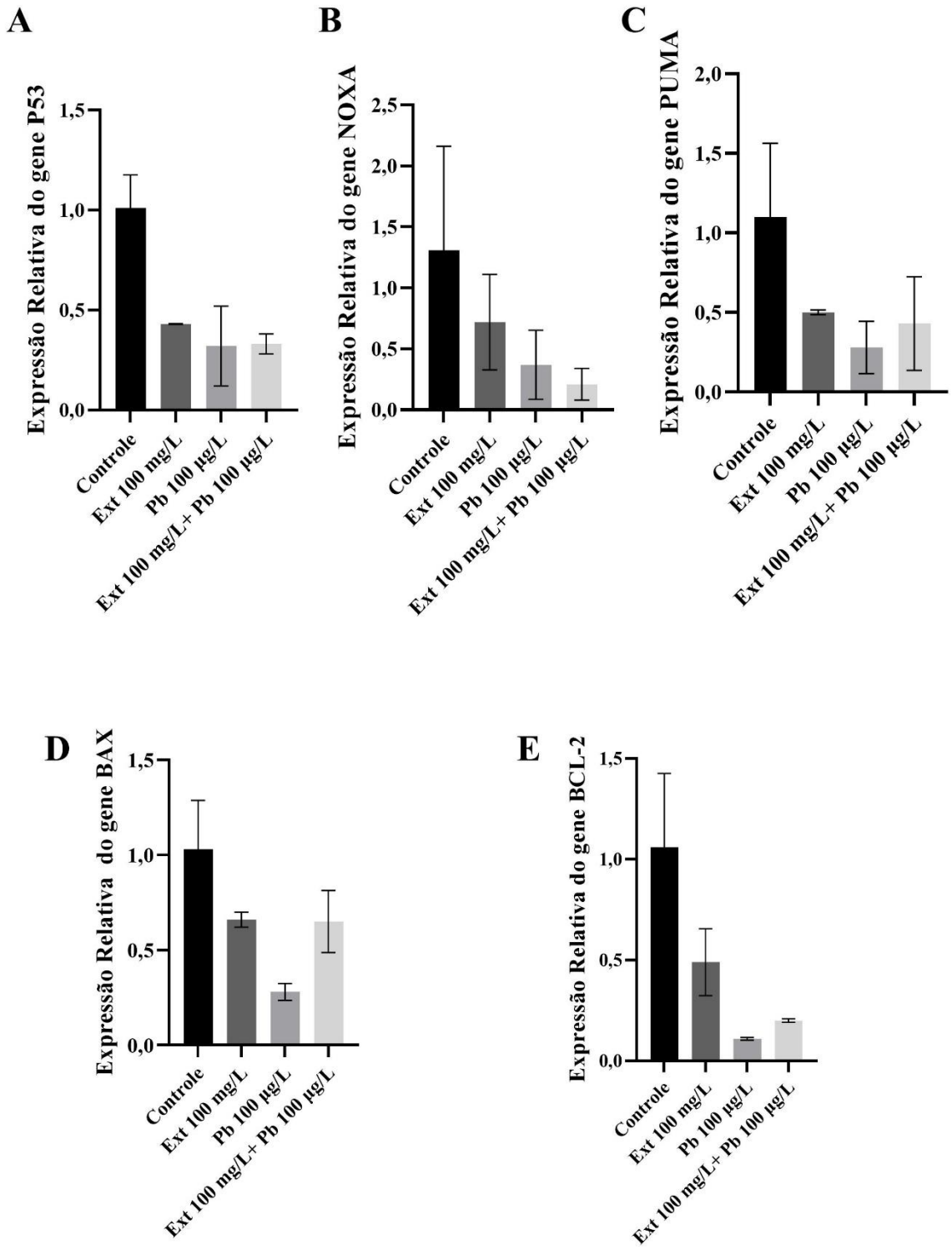
Fig. 26 – Efeito do chumbo associado ou não ao extrato de *E.involucrata* na expressão de COX1.



Avaliação da expressão relativa do gene COX1 após 96h exposição das larvas a concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* 100 µg/L de chumbo e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. Os dados são expressos como média ± EPM. N=2. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

Em relação à morte celular, os genes P53, NOXA, PUMA, BAX e BCL2 foram analisados e constatou-se ausência de alteração dos grupos quando comparados com o controle. Entre os grupos de tratamento com chumbo e chumbo + extrato vegetal também não foi observada diferença de expressão dos genes (Fig 27).

Fig. 27 – Efeito do chumbo associado ou não ao Extrato de *E.involucrata.* na expressão dos genes envolvidos na morte celular.



Avaliação da expressão relativa dos genes após 96h exposição das larvas a concentrações de 100 mg/L de extrato de *E. involucrata;* 100 µg/L de chumbo e 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (A) Gene P53, (B) Gene NOXA, (C) Gene PUMA, (D) Gene BAX, (E) Gene BCL2. Os dados são expressos como média ± EPM. N=2. Fonte: Arquivo Pessoal (2024).

O gene P53 codifica a proteína p53, que atua como um supressor tumoral, além de desempenhar um papel fundamental como fator de transcrição, regulando a expressão de genes envolvidos na apoptose. Entre esses genes, destacam-se NOXA e PUMA, cujos produtos proteicos inibem a ação da proteína antiapoptótica BCL2 (Célula B de Linfoma 2), responsável pelo controle da permeabilidade da membrana mitocondrial. A inibição da BCL2 permite a ativação de proteínas pró-apoptóticas, como BAX, por exemplo, que promovem o aumento da permeabilidade mitocondrial e a liberação do citocromo c no citosol. Esse processo desencadeia a ativação da cascata de caspases, culminando na morte celular programada. (VALVERDE-LOPEZ, J. A. *et al*., 2024). Considerando os estudos de Kataba *et al.* (2020 e 2022) e Park *et al.* (2020), esperava-se encontrar um aumento dos genes pró apoptóticos em resposta ao chumbo. Park *et al.* (2020) observaram o efeito do chumbo em embriões de *D.rerio* e mostrou um aumento da expressão P53 e BAX. Kataba *et al.* (2020) observaram um aumento na expressão do gene P53 e no gene BCL2, enquanto que Kataba *et al*. (2022) observaram uma queda na expressão do gene P53 e um aumento na expressão de BCL2. Ambos os estudos foram realizados em larvas de peixe-zebra.

Analisando todos os resultados de expressão gênica, sugere-se que o chumbo causou um impacto sutil no equilíbrio celular, sem ativar as vias apoptóticas, oxidativas e/ou inflamatórias. Esses resultados precisam ser confirmados com um maior número de repetições em trabalhos futuros.

6.Conclusão

Os resultados deste trabalho indicam que o chumbo, mesmo em baixas concentrações, pode ter um efeito tóxico como evidenciado nas alterações morfológicas observadas. O extrato do fruto da *E. involucrata* não foi capaz de proteger contra os danos induzidos pelo chumbo nas concentrações testadas em peixe-zebra. Este foi o primeiro estudo com este modelo de pesquisa avaliando os efeitos da *E. involucrata* sobre os danos induzidos por chumbo *in vivo*. O potencial antioxidante *in vitro* da *E. involucrata*, já demonstrado por diferentes estudos prévios, necessita ainda ser corroborado através de estudos futuros para elucidar os seus potenciais efeitos benéficos em condições relacionadas ao estresse oxidativo.

7.Referência

ALAFIATAYO, A. A. *et al*. Phytochemical Evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic Effects of *Curcuma longa* Extract on Zebrafish *(Danio rerio)*. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2019. Mar 5. V.2019. doi: https://doi.org/10.1155/2019/3807207

ALI, H., E. KHAN, & I. ILAHI. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. **Journal of Chemistry**. 2019. V. 2019: p. 6730305.

ALQAHTANI, W. S. & ALBASHER, G. *Moringa oleifera Lam.* extract rescues lead-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis in the rat cerebral cortex. **J Food Biochem**. 2021. V. 45:e13579. doi:https://doi.org/10.1111/jfbc.13579.

ARIANI, A. *et al*. *Centella* asiatica extract ameliorates deoxygenation-induced neurological dysfunction in zebrafish larvae. **Open Vet J**. 2024, May. V. 14(5): p.1154-1160. doi: https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i5.9.

ATSDR-AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Lead. Atlanta: ATSDR, Ago, 2020. Ch. 4, CHEMICAL AND PHYSICAL INFORMATION. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589540/>: 29 mar. 2025.

AUGUSTO, L. G. S. *et al*. O contexto global e nacional frente aos desafios do acesso adequado à água para consumo humano. **Rev. Ciênc & Saúde Coletiva**. Jun. 2012. V. 17 (6): p. 1511-1522.

ÁVILA, R. I. *et al. Eugenia disenterica* DC. (Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage in vitro and in vivo**. Pharmaceutical Biology**. 2016. V. 54 (11): p. 2652–2663. doi: https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1178306.

BADEN, K. N. *et al*. Early Developmental Pathology Due to Cytochrome *c* Oxidase Deficiency Is Revealed by a New Zebrafish Model**. Journal of Biological Chemistry**. 2007. V. 282(48):p. 34839 – 34849. doi: https://doi.org/10.1074/jbc.M703528200.

BARZOTTO, I. L. M. *et al*. Supercritical extraction of *Eugenia involucrata* leaves: Influence of operating conditions on yield and αtocopherol content. **J Supercrit Fluids**. 2019. V. 143: p. 55-63, 2019. doi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844618303887.

BLOCH, M. **A Sociedade Feudal**. Lisboa. Edição 70, 1940.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 1976. V. 72(1-2). doi: https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRADFORD, Y. M. *et al*. Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN. **Ilar Journal.** 2017. V. 58(1): p. 4-16.

BRASIL. MS-Ministério da Saúde. (2005). **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre e a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

BRANNEN, K. C. *et al*. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. **Developmental and Reproductive Toxicology**. 2010. doi: https://doi.org/10.1002/bdrb.202

CAMPOS, E. B. P., & YOSHIDA, W. B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento**. J Vasc Br**. 2004. V. 3 (4).

CASTRO, T. F. D. *et al*. The toxicological effects of *Eryngium foetidum* extracts on zebrafish embryos and larvae depend on the type of extract, dose, and exposure time. **Toxicol Res (Camb).** 2022, Oct, 3. V. 11(5): p. 891-899. doi: https://doi.org/10.1093/toxres/tfac067.

CDC-CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Childhood Lead Poisoning Prevention. Geórgia: CDC, 2023. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/nceh/lead/prevention/sources/water.htm?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fnceh%2Flead%2Fleadinwater%2Fdefault.htm>: 30 mar. 2024.

CEBRA, C. K.; CEBRA, M. L. Altered mentation caused by polioencephalomalacia, hypernatremia, and lead poisoning. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Ruminant Neurologic Diseases**, 2004. V. 20 (2): p. 287–302.

CHEN, J. *et al*. Developmental lead acetate exposure induces embryonic toxicity and memory deficit in adult zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**. 2012. V. 34 (6): p. 581-586. doi: https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.09.001.

CHEN, L. *et al*. Comparative cardio and developmental toxicity induced by the popular medicinal extract of *Sutherlandia frutescens (L.) R.Br.* detected using a zebrafish Tuebingen embryo model. **BMC Complement Altern Med**. 2018. V. 273. doi: https://doi.org/10.1186/s12906-018-2303-9.

CHOW, E. S. H. & CHENG, S. H. Cadmium Affects Muscle Type Development and Axon Growth in Zebrafish Embryonic Somitogenesis. **Toxicological Sciences. 1**. May. 2003. V. 73(1):p. 149–159. doi: https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg046.

CORY, S. & ADAMS, J. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**. 2002. V. 2. p: 647–656. doi: https://doi.org/10.1038/nrc883.

DAI, Y.-J. *et al*. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry.** 2014. V. 33(1): p. 11-17.

DAL, N-J, K. *et al*. The zebrafish embryo as an in vivo model for screening nanoparticle-formulated lipophilic anti-tuberculosis compounds. **Dis Model Mech 1**. January, 2022. V. 15 (1): dmm049147. doi: https://doi.org/10.1242/dmm.049147.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int**. 2019. V 43. p: 582-592. doi: https://doi.org/10.1002/cbin.11137.

DESHMUKH, D. *et al*. Antiangiogenic potential of *Lepista nuda* extract suppressing MAPK/p38 signaling-mediated developmental angiogenesis in zebrafish and HUVECs. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** 2023. V. 159. doi: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114219.

DE SILVA, D. *et al*. Determination of the Toxicity Cause by Trace Metals on Zebrafish *(Danio rerio)* Embryo. **Journal of Aquaculture and Fish Health**. 2021, June. V. 10(2):p.176-185.

DEY, K. K. *et al*. Lead induced genotoxicity and hepatotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant concentration: Nrf2-Keap1 regulated stress response and expression of biomarker genes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 2024. V. 107.:104396. doi: https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104396.

DEY, K. K. *et al.* Chronic Exposure to Lead Causes Neurotoxicity by Generating Oxidative Stress and Inducing DNA Damages in Zebrafish Brain: Involvement of Nrf2-Keap1 Regulation and DNA Repair Pathways. **Biol Trace Elem Res**. 2025. doi: https://doi.org/10.1007/s12011-025-04534-z.

DEIVIARUNACHALAM, K. *et al*. Antioxidant and antigenotoxic potential of *Morinda tinctoria Roxb.* leaf extract succeeding cadmium exposure in Asian catfish, *Pangasius sutchi*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. 2021.V. 249:109149. doi: https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109149.

DIAS, B.B; PARIZOTTO, B.A.D.M. & BONETTI, C. Agentes naturais e antrópicos modificadores da qualidade da água e dos sedimentos nas áreas marginais da lagoa da conceição, SC. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol**. 2014. V.18 (1): p. 33-43.

DRAPER, H. H., & HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**. 1990. V**. 43**:p. 421–431. doi: https://scihub.se/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/007668799086135I?via%3Dihub.

DRAPER, H. H. *et al*. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology and**

Medicine. 1993. V. 15(4):p.353–363. doi: https://sci-hub.se/https://sciencedirect.com/science/article/pii/089158499390035S?via%3Dihub.

DUARTE, E. B. *et al.* Trace metals in Rio Doce sediments before and after the collapse of the Fundão iron ore tailing dam, Southeastern Brazil. **Chemosphere.** 2021. V. 262: 127879.

DOU, C &, ZHANG, J. Effects of lead on neurogenesis during zebrafish embryonic brain development. **Journal of Hazardous Materials**. 2011. V .194: p.277-282. doi: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.106.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 1959. V. 82(1): p. 70-77.

EPA-UNITED STATES ENVIRONMENTAL PRTOTECTION AGENCY. Basic Information about Lead in Drinking Water. Whashington: EPA, 2024. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/basic-information-about-lead-drinking-water.> Acesso em:30 mar. 2024.

EUBIG, P.A., AGUIAR, A. & SCHANTZ, S. L. Lead and PCBs as Risk Factors for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. Environmental Health Perspectives. 2010. **118** (12):p. 1654 - 1667. doi: https://doi.org/10.1289/ehp.0901852

FERNIE, A. R., CARRARI, F. & SWEETLOVE, L, J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current Opinion in Plant Biology**. 2004. V. 7 (3). p: 254-261. doi: https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.007.

FERREIRA, A.L.A & MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil.** 1997. V. 43(1): p. 61-8.

FERREIRA, A. P.; HORTA, M. A. P. & CUNHA, C. L. N. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax*(Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil**. Revista da Gestão Costeira Integrada** 2010. V. 10(2): p. 229-241

FRAYSSE, B.; MONS, R. & GARRIC, J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2006. V. 63(2): p. 253-267. doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.015.

FRANCISCO, N. DE., RUIZ, J. D., TROYA, E.I. A. Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. **Avian Pathology.** 2003. V. 32(1), p.313. doi: 10.1080/0307945021000070660.

FU, Z., & XI, S. The effects of heavy metals on human metabolism. **Toxicology Mechanisms and Methods**. 2019. V. 30(3). p: 167–176. doi: https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594.

GABRIEL, F. A. *et al*. Ecological Risks of Metal and Metalloid Contamination in the Rio Doce Estuary. 2020. **16**(5): p. 655-660.

GIRARDELO, J.R. *et al*. Bioactive compounds, antioxidant capacity and antitumoral activity of ethanolic extracts from fruits and seeds of *Eugenia involucrata DC.* **Food Res Int**. 2020. V. 137: p. 109615

GOLDONI, F. C., *et al.* Effects of Eugenia umbelliflora O. Berg (Myrtaceae)-leaf extract on inflammation and hypersensitivity. **Journal of Ethnopharmacology**. 2019. V. 244. doi: https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112133.

GUO, S. *et al*. Development of a rapid zebrafish model for lead poisoning research and drugs screening. **Chemosphere.** 2023. V. 345. doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140561.

HAMMERSCHMIDT, M. *et al*. Mutations affecting morphogenesis during gastrulation and tail formation in the zebrafish, *Danio rerio*. **Development.** December, 1, 1996. V. 123 (1): p. 143–151. doi: https://doi.org/10.1242/dev.123.1.143.

HILL, J. A. *et al*. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences.** July, 2005. V.86 (1): p. 6–19, doi: https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110.

HOBBS, D., BIGOT, M. & SMITH, R. E. W. Rio Doce Acoustic Surveys of Fish Biomass and Aquatic Habitat. **Integr Environ Assess Manag. 2020.** V. 16(5):p. 615-621. doi: 10.1002/ieam.4285.

HORIE, Y. *et al*. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. **J Appl Toxicol**. 2017.V. **37**: p.1245–1253. doi: https://doi.org/10.1002/jat.3487.

HOU, J.L. *et al*. Morphological deformities and recovery, accumulation and elimination of lead in body tissues of Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, early life stages: a laboratory study. **Journal of Applied Ichthyology**. 2011. V. 27: p. 514-519. doi: https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01703.x.

HOWE, K. *et al*. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**. 2013. V. 496(7446): p. 498-503.

INCA. - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes de Siva. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 4 ed. 2018: Rio de Janeiro. Brasil. INCA

INCARDONA, J. P., SCHOLZ, N. L. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. **Aquatic Toxicology**. 2016. V. 177: p. 515-525. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.016.

INFANTE, J. *et al*. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits**. PLoS One**, 2016. V. 11(4): p. e0152974.

JEFFRIES, M.K.S. *et al*. The fish embryo toxicity test as a replacement for the larval growth and survival test: a comparison of test sensitivity and identification of alternative edndpoints in zebrafish and fathead minnows. **Environ Toxicol Chem**. 2015. V. 34: p.1369–1381. doi: https://doi.org/10.1002/etc.2932.

JOHNSEN, I. V; AANEBY, J. Soil intake in ruminants grazing on heavy-metal contaminated shooting ranges. **Science of The Total Environment**. 2019. V. 687: p. 41-49. doi: https://doi.org/10.1136/vr.i3071.

JONES, I., KILLE, P., & SWEENEY, G. Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development. **Journal of Fish Biology.** 2001. V. 59(4): p. 1015–1022. doi:https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00168.x.

KACZOR, M. *et al*. Exposure to lead in water and cysteine non-oxidative metabolism in *Pelophylax ridibundus* tissues. **Aquatic Toxicology**. 2013. V. 127: p. 72-77. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.014.

KATABA, A. *et al*. Acute exposure to environmentally relevant lead levels induces oxidative stress and neurobehavioral alterations in larval zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat. Toxicol**. 2020. V. 227 (2020), Article 105607, doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105607

KATABA, A. *et al*. Environmentally relevant lead (Pb) water concentration induce toxicity in zebrafish *(Danio rerio)* larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C:Toxicology & Pharmacology**. 2022. V. 252. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109215.

KENNEDY, C. J. TOXICOLOGY- The Toxicology of Metals in Fishes, Encyclopedia of Fish Physiology. **Academic Press**. 2011. p. 2061-2068.

KHAROUBI, O. *et al*. Role of wormwood *(Artemisia absinthium)* extract on oxidative stress in ameliorating lead induced haematotoxicity. **Afr J Tradit Complement Altern Med**. 2008. Apr, 10. V. 5(3): p. 263-70. doi: https://doi.org/10.4314/ajtcam.v5i3.31282.

KIM, S. *et al*. Antioxidant Effects of Turmeric Leaf Extract against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress In Vitro in Vero Cells and In Vivo in Zebrafish. **Antioxidants**. 2021. V. 10(1). doi: https://doi.org/10.3390/antiox10010112.

KO, S.-C. *et al*. Protective effect of *Ecklonia cava* on UVB-induced oxidative stress: in vitro and in vivo zebrafish model. **Journal of Applied Phycology**. 2011. V. 23(4): p. 697-708

KRAMETTER-FROETSCHER, R. *et al*. Toxic effects seen in a herd of beef cattle following exposure to ash residues contaminated by lead and mercury. **The Veterinary Journal**. 2007. V. 174 (1): p. 99-105.

KRATZ, E. *et al*. Functional characterization of the *BCL-2* gene family in the zebrafish. **Cell Death Differ.** 2006. V. 13: p. 1631–1640. doi: https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402016.

LAMMER, E. *et al*. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.** Mar, 2009. V. 149 (2): p. 196-209. doi: https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006.

LEANDRO, L.P. *et al*. Behavioral changes occur earlier than redox alterations in developing zebrafish exposed to Mancozeb. **Environmental Pollution**. 2021. V. 268(B). doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115783.

LEE, J., FREEMAN, J.F. Embryonic exposure to 10 μg L^{-1} lead results in female-specific expression changes in genes associated with nervous system development and function and Alzheimer's disease in aged adult zebrafish brain. **Metallomics**. 2016, June. V. 8 (6): p. 589–596. doi: https://doi.org/10.1039/c5mt00267b.

LELE, Z., & KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**. 1996. V. 14(1), 57–72. doi:10.1016/0734-9750(96)00004-3.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. **Marine Pollution Bulletin**. 2001. V. 42 (8). p: 656-666.

LI, X. *et al*. Zebrafish neurobehavioral phenomics applied as the behavioral warning methods for fingerprinting endocrine disrupting effect by lead exposure at environmentally relevant level. **Chemosphere.** 2019. V. 231: p. 315-325. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.174.

LI, X. *et al.* Lead Exposure Causes Spinal Curvature during Embryonic Development in Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022. V. 23(17):. 9571. doi:https://doi.org/10.3390/ijms23179571.

LIU, J. *et al*. Distinct neurotoxic mechanisms of thallium and lead: Calcium-mediated apoptosis and iron-induced ferroptosis in zebrafish at environmental concentrations. Journal of Hazardous Materials. 2025. V. 492. doi: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138288.

MALUF, C. B. *et al*. Laboratory profile after mining dam breach: Brumadinho Health Project results. **Rev Bras Epidemiol**. 2022. V. 25: e220013. doi: https://doi.org/10.1590/1980-549720220013.supl.2m:

MANNINO, G. *et al*. Bioactive Compounds and Antioxidant Properties with Involved Mechanisms of *Eugenia involucrata DC* Fruits. **Antioxidants.** 2022. V. 11. 1769. https://doi.org/10.3390/antiox11091769

NABIL-ADAM, A. & SHREADAH, M. A. Ameliorative role of *Ulva* extract against heavy metal mixture—induced cardiovascular through oxidative/antioxidant pathways and inflammatory biomarkers. **Environ Sci Pollut Res**. 2021. V.28: p. 27006–27024. doi: https://doi.org/10.1007/s11356-020-11994-4.

NGUYEN, T. H. *et al*. Developmental toxicity of *Clerodendrum cyrtophyllum turcz* ethanol extract in zebrafish embryo. **Journal of Ethnopharmacology**. 2021. V**.**267. doi: https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113538.

NOUREEN, A. *et al*. Ameliorative Hematological and Histomorphological Effects of Dietary *Trigonella foenum-graecum* Seeds in Common Carp *(Cyprinus carpio)* Exposed to Copper Oxide Nanoparticles. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** 2022. V. 19**.**13462. doi: https://doi.org/10.3390/ijerph192013462.

OECD- Organization for Economic Co-operation and Development. Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. 1998. OECD.

OECD- Organization for Economic Co-operation and Development. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. 2013. OECD.

OH, J-Y. *et al*. Protective Effects of Fucoidan Isolated from Celluclast-Assisted Extract of *Undaria pinnatifida Sporophylls* against AAPH-Induced Oxidative Stress In Vitro and In Vivo Zebrafish Model. **Molecules.** 2020. V. 25(10):2361. doi: https://doi.org/10.3390/molecules25102361.

OSMAN, A. G. M. *et al*. Lead induced malformations in embryos of the African catfish, *Clarias gariepinus (Burchell, 1822).* **Environmental Toxicology.** 2007. V. 22(4): p. 375–389. doi:https://doi.org/10.1002/tox.20272.

PAGLIOSA, P.R. *et al*. Urbanization impact on Subtropical Estuaries: a Comparative Study of Water Properties in Urban Areas and in Protected Areas. **Journal of Coastal Research**, 2006: p. 731-735.

PAITHANKAR, G. *et al*. Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. **Chemosphere**. 2021. V. 262.

PARK, K. *et al*. Effects of thermal stress-induced lead (Pb) toxicity on apoptotic cell death, inflammatory response, oxidative defense, and DNA methylation in zebrafish *(Danio rerio)* embryos. **Aquatic Toxicology**. 2020. V. 224. 05479. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105479.

PATRA, R. C., RAUTRAY, A. K. & SWARUP, D. *Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration*. Vet Med Int. 2011 Mar 20. 2011:457327. doi: https://doi.org/10.4061/2011/457327.

PETERSON, S. M. *et al*. Global gene expression analysis reveals dynamic and developmental stage-dependent enrichment of lead-induced neurological gene alterations. **Environ Health Perspect**. 2011, May**.** V. 119**(**5):615-21. doi: 10.1289/ehp.1002590.

PEIXOTO, S.V., FRÓES-ASMUS, C.I.R. Living and health conditions after a mining dam rupture: Brumadinho Health Project and Bruminha Project. **Rev Bras Epidemiol.** 2022. V. 25 :e220001. doi: https://doi.org/10.1590/1980-549720220001.supl.2.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. 2001 May 1. V. 29(9):e45. doi: https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45.

PISOSCHI, A. M. & POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2015. V. 97: p. 55-74, doi: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

RAISBECK, M. F. Water Quality for Cattle: Metalloid and Metal Contamination of Water. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. 2020. V. 36(3): p. 581-620.

RAJESHKUMAR, S. *et al*. Antibacterial and antioxidant potential of biosynthesized copper nanoparticles mediated through *Cissus arnotiana* plant extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 2019. V. 197. doi: https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111531.

RAK, M. *et al*. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency**. Clin Sci (Lond)**. 2016, mar. V. 130(6): p. 393-407. doi: 10.1042/CS20150707.

RAMZAN, R., KADENBACH, B., VOGT, S. Multiple Mechanisms Regulate Eukaryotic Cytochrome C Oxidase. **Cells.** 2021, Feb, 28. V. 10(3):p.514. doi: 10.3390/cells10030514.

RANI, V. *et al*. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**. 2016. V. 148: p. 183-193. doi: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002.

RICHETTI, S. K. *et al.* Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **NeuroToxicology**. 2011. V. 32 (2011): p. 116–122

RODRÍGUEZ-ESTIVAL, J; BARASONA, J. A & MATEO, R. Blood Pb and δ-ALAD inhibition in cattle and sheep from a Pb-polluted mining area. **Environmental Pollution.** 2012. V. 160: p. 118-124.

ROEGNER, A. *et al*. Public health implications of lead poisoning in backyard chickens and cattle: four cases. **Vet Med (Auckl).** 2013, Apr, 3. V. 4: p.11-20. doi: 10.2147/VMRR.S36083.

ROY, N.M., *et al.* Neural alterations from lead exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**. 2014. V. 46: p.40-48. doi: https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.08.008.

ROY, N. M., DEWOLF, S., & CARNEIRO, B. Evaluation of the developmental toxicity of lead in the Danio rerio body. **Aquatic Toxicology**. 2015. V. 158: p.138-148. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.026.

SACHETT, A. *et al*. Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method). 2020. doi: https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjp8kmrw.

SACHETT, A. *et al*. *Micronized Curcumin* Causes Hyperlocomotion in Zebrafish Larvae. Neurochem Res. 2022. V. 47: p. 2307–2316. doi: https://doi.org/10.1007/s11064-022-03618-9.

SACHETT, C. *et al.* Antidepressant-Like and Antioxidant Effects of Plinia trunciflora in Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015. V. 2015. Article ID 601503, 9 pages. doi: https://doi.org/10.1155/2015/601503.

SALMAN, M. *et al*. Assessment of Concentration of Lead, Cadmium, Chromium and Selenium in Blood Serum of Cancer and Diabetic Patients of Pakistan. 2011. **Journal- Chemical Society of Pakistan.** V. 33(6): p. 869-873.

SANTO, G. D. *et al*. Protective effect of *Uncaria tomentosa* extract against oxidative stress and genotoxicity induced by glyphosate-Roundup® using zebrafish *(Danio rerio)* as a model. **Environmental Science and Pollution Research**. 2018. V. **25**(12): p. 11703-11715. doi: https://doi.org/10.1007/s11356-018-1350-6.

SANTOS, A. de S. E. *et al*. Metal exposure and oxidative stress biomarkers in a Brazilian agricultural community. **Archives of Environmental & Occupational Health.** 2021. V. 77(8), 611–620. doi: https://doi.org/10.1080/19338244.2021.1980759

SARDI, J. C. O. *et al.* Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia spp.* **Microbial Pathogenesis**. 2017. V. 105: p. 280-287. doi: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.044.

SHINOMOL, G. K., BHARATH, M. M. S. & MURALIDHARA. Neuromodulatory Propensity of *Bacopa monnieri* Leaf Extract Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Oxidative Stress: In Vitro and In Vivo Evidences. **Neurotox Res.** 2012. V**.** 22: p. 102–114. doi: https://doi.org/10.1007/s12640-011-9303-6.

SHINOMOL, G. K. *et al. Bacopa monnieri* Extract Offsets Rotenone-Induced Cytotoxicity in Dopaminergic Cells and Oxidative Impairments in Mice Brain. **Cell Mol Neurobiol**. 2012. V. 32: p. 455–465. doi: https://doi.org/10.1007/s10571-011-9776-0.

SCHULZ, M. *et al*. Composition and potential health effects of dark-colored underutilized Brazilian fruits – A review. **Food Research International**. 2010. V. 137, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109744.

SIPPEL, A. J. A., GERACI, J. R. & HODSON, P. V. Histopathological and physiological responses of rainbow trout *(Salmo gairdneri richardson)* to sublethal levels of lead. **Water Research**. 1983. V. 17 (9): p. 1115-1118. doi:https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90051-9.

SOBRAL - SOUZA, C. E., *et al*. Phytotoxicity reduction of the mercury chloride effect by natural products from Eugenia jambolana Lam.: A new strategy against the toxic metal pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2019. V. 170. P: 461-467. doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.007.

SOLEIMANZADEH, A. *et al.* Carob (*Ceratonia siliqua L.*) fruit hydro-alcoholic extract alleviates reproductive toxicity of lead in male mice: Evidence on sperm parameters, sex hormones, oxidative stress biomarkers and expression of Nrf2 and iNOS. **Avicenna J**

Phytomed. 2020, Jan-Feb. V.10(1): p.35-49. Disponível em:<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6941692/#sec7>.

SPINOZA, H. S., GÓRNIAK, S. L. & PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada a Medicina Veterinária.** 1 ed. Manole: SP. 2008. 931p.

STICKNEY, H. L., BARRESI, M. J. F. & DEVOTO, S. H. Somite development in zebrafish. **Dev. Dyn.** 2000. V. 219**:** p. 287-303. doi: https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A.

STREISINGER, G. *et al*. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**. 1981. V. 291: p. 293–296. doi: https://doi.org/10.1038/291293a0

STROJAN, S.T., PHILLIPS, C.J.C. The Detection and Avoidance of Lead-Contaminated Herbage by Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. 2002. V. 85(11).

SZABÓ, E. R. *et al.* Radiobiological effects and proton RBE determined by wildtype zebrafish embryos. **PLoS ONE**. 2018. V. 13(11): doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206879.

TAI, J. K. A. C. & J.L. FREEMAN. Zebrafish as an integrative vertebrate model to identify miRNA mechanisms regulating toxicity. **Toxicology Reports**. 2020. V. **7**: p. 559-570.

TAMAGNO, W. *et al*. Neuroprotective and antioxidant effects of pitaya fruit on Cu-induced stress in adult zebrafish. **Journal of Food Biochemistry**. 2022. V.46:e14147. doi: https://doi.org/10.1111/jfbc.14147.

TEÓFILO, M. N. G., *et al*. Bioactive Compounds, Antioxidant, Cytotoxic, and Genotoxic Investigation of the Standardized Liquid Extract from *Eugenia involucrata* DC. Leaves. **Pharmaceuticals**. 2025. V.18(5):.764. doi: https://doi.org/10.3390/ph18050764.

TERAMOTO, E. H. *et al*. *Metal speciation of the Paraopeba river after the Brumadinho dam failure*. **Science of The Total Environment.** 2021. V. 757:. 143917.

THIAGARAJAN, S. K. *et al*. Evaluation of the Effect of *Aqueous Momordica charantia Linn.* Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2019. V**.** 2019. doi**:**. https://doi.org/10.1155/2019/9152757.

TOLEDO, A.P. *et al*. Prospecção fitoquímica, atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais de *Eugenia involucrata DC*, in Programa de Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais. 2018. **Universidade Estadual do Oeste do Paraná**.: Cascavel/PR.

TOMAZI, R. *et al*. Hypoglycemic Activity of Aqueous Extract *of Latex from Hancornia speciosa Gomes:* A Study in Zebrafish and In Silico. **Pharmaceuticals (Basel).** 2021, Aug, 26**.** V. 14(9): p.856. doi: https://doi.org/10.3390/ph14090856.

TU, H. *et al*. Effects of cadmium, manganese, and lead on locomotor activity and neurexin 2a expression in zebrafish. **Environ Toxicol Chem**. 2017. V. 36: p. 2147-2154. doi: https://doi.org/10.1002/etc.3748.

VALVERDE-LOPEZ, J. A. *et al*. P53 and BCL-2 family proteins PUMA and NOXA define competitive fitness in pluripotent cell competition. **PLoS Genet**. 2024. V. 20(3):. e1011193. doi: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011193.

VEEREN B. *et al*. Phenolic Profile of Herbal Infusion and Polyphenol-Rich Extract from Leaves of the Medicinal Plant *Antirhea borbonica:* Toxicity Assay Determination in Zebrafish Embryos and Larvae. **Molecules**. 2020. Sep 29. V. 25(19):p.4482. doi: https://doi.org/10.3390/molecules25194482.

VETERINARY RECORD. Misplaced batteries result in lead poisoning in suckler cows. **Veterinary Record**. 2016. V. 178(23): p. 577-580. doi:10.1136/vr.i3071

VETERINARY RECORD. Lead toxicity cases highlight a need to check pastures for possible sources of poisoning. **Veterinary Record**. 2020. V. 187(8) p. 307-311. doi: https://doi.org/10.1136/vr.m4012

VETERINARY RECORD. Lead poisoning in grazing beef cattle. **Veterinary Record**. 2022. V. 191(2) p.64-66. doi:https://doi.org/10.1002/vetr.2051

VICTORIA, F. N., *et al.* Essential oils of E. uniflora leaves protect liver injury induced by acetaminophen. **Food Bioscience**. 2013. V. 4.: p. 50-57. doi: https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.09.001.

VILLENEUVE, D. L. *et al.* Environmental Stresses and Skeletal Deformities in Fish from the Willamette River, Oregon. **Environmental Science & Technology**. 2005. V. 39 (10): p. 3495-3506. doi: https://doi.org/10.1021/es048570c.

VON HELLFELD, R. *et al.* Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environ Sci Eur**. 2020. V. 32 (122). doi: https://doi.org/10.1186/s12302-020-00398-3.

WANGA, Z., *et al.* Early-life lead exposure induces long-term toxicity in the central nervous system: From zebrafish larvae to juveniles and adults. **Science of The Total Environment**. 2022. V. 804:.150185. doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150185.

WANI, A. L., ARA, A & USMANI, J. A. Lead toxicity: a review. **Interdiscip Toxicol**. 2015, Jun. V. 8(2): p. 55-64. doi: 10.1515/intox-2015-0009.

WEI, M. C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science.** 2001, Apr, 27. V. 292(5517). p: 727-30. doi: 10.1126/science.1059108.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish *(Danio rerio)***. 4th ed. 2000, Eugene: Univ. of Oregon Press.

WHO- World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, 4, Editor. 2011: Geneva. p. 564.

WILD, M. *et al.* Using spatiotemporal ratio analyses to quantitatively estimate water quality recovery of the Rio Doce. **Integrated Environmental Assessment and Management**. 2023. V.20 (1):p. 74-86.

XIA, D. *et al.* Protective effect of *Smilax glabra* extract against lead-induced oxidative stress in rats, **Journal of Ethnopharmacology,** V. 130(2): p. 414-420. doi: https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.025.

XU, Y. *et al.* Evaluation of the oxidative toxicity induced by lead, manganese, and cadmium using genetically modified Nrf2a-mutant zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 2023. v. 266. doi: https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109550.

YIN, J. *et al*. Sensitive biomarkers identification for differentiating Cd and Pb induced toxicity on zebrafish embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology.**2017. V. 56**:** p. 340-349. doi: https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.10.010.

YOGESWARI, R. *et al*. Effect of lead acetate on livability of zebrafish embryo/larvae and amelioration by garlic aqueous extract (GAE). **J Pharmacogn Phytochem.** 2019. V. 8 (6): p. 189-193. Disponível em: < https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue6/PartC/8-5-468-116.pdf.>.

YUMNAMCHA, T. *et al*. Evaluation of developmental toxicity and genotoxicity of aqueous seed extract of *Croton tiglium L.* using zebrafish. **Drug and Chemical Toxicology.** 2020**.** V. 45(1): p. 398–406. doi: https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1708094.

ZHANG, F. *et al.* Antibiotic Toxicity and Absorption in Zebrafish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **PLoS ONE**. 2015. V. 10(5): doi: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124805.

ZHANG, H. *et al*. The toxicity of cadmium (Cd2+) towards embryos and pro-larva of soldatov's catfish *(Silurus soldatovi).* **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2012. V**.** 80: p. 258-265. doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.03.013.

ZHAO, J. *et al*. Developmental exposure to lead at environmentally relevant concentrations impaired neurobehavior and NMDAR-dependent BDNF signaling in zebrafish larvae. **Environmental Pollution**. 2020. V. 257. doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113627.

ZHU, B. *et al*. Single and joint action toxicity of heavy metals on early developmental stages of Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2011. V. 74(8):p.2193-2202. doi: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.033.

ZHU, B. *et al*. Effect of combined exposure to lead and decabromodiphenyl ether on neurodevelopment of zebrafish larvae. **Chemosphere**. 2016. v.144:p.1646-1654.doi: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.056.

8. Apêndices

APÊNDICE A– Alterações morfológicas em 72 horas e 96 horas pós fertilização com exposição ao chumbo (Pb) e ao extrato vegetal

A exposição ao chumbo (Pb) em embriões de *D. rerio* apresentou alterações morfológicas em todas as concentrações, embora quanto maior as concentrações, maior a incidência de alterações. Ocorrência semelhante foi vista na exposição ao chumbo e ao extrato.

Fig. 28- Alterações morfológicas vistas durante as exposições.

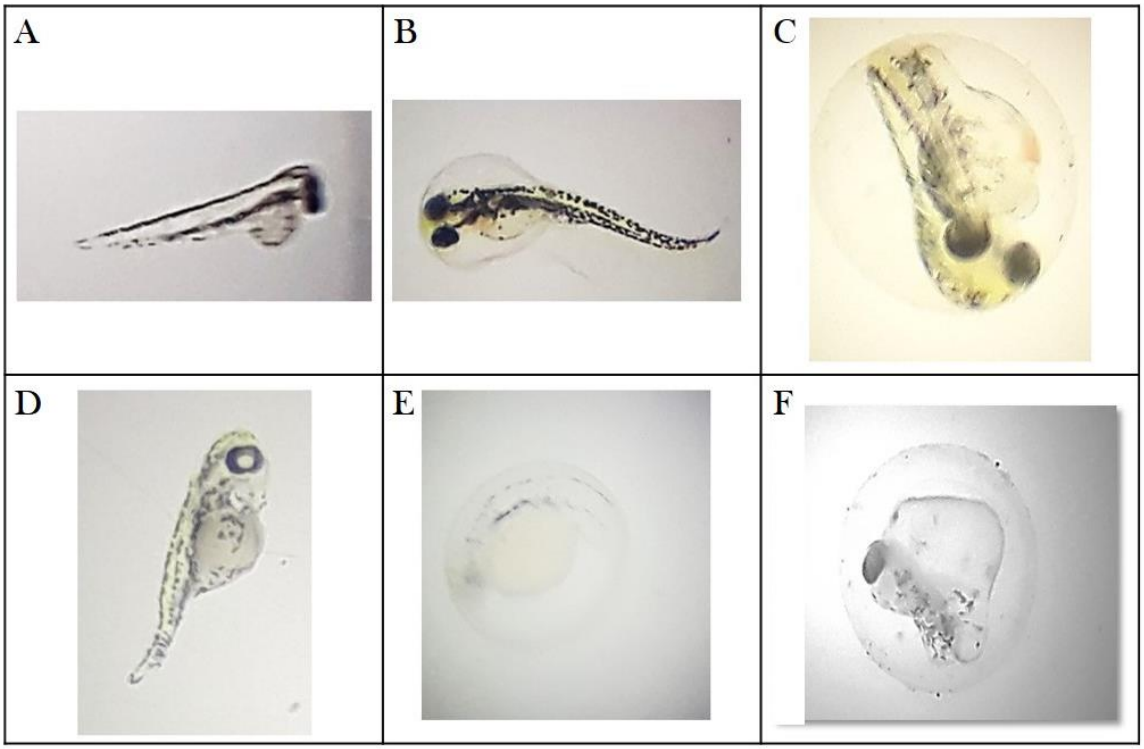


Imagem e identificação de alterações morfológicas após 72h e 96h de exposição (chumbo e extrato com chumbo). (A) Nanismo em larva exposta à 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (B) Coluna torta e eclosão incompleta em larva exposta à 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (C) Congestão em embrião exposto à 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (D) Nanismo, coluna torta, edema de pericárdio, edema de saco vitelino e má formação ocular em larva exposta à 100 µg/L de chumbo. (E) Alteração na pigmentação em embrião exposto à 100 µg/L de chumbo. (F) Delay (Atraso no desenvolvimento, apresentando má conformação de saco vitelino, não formação da cauda, edema de pericárdio e má formação ocular em embrião exposto à 100 µg/L de chumbo. Fonte: Arquivo pessoal (2023-2024).

APÊNDICE B– Alterações morfológicas: Curvatura de Coluna em 72 horas e 96 horas pós fertilização com exposição ao chumbo (Pb) e ao extrato vegetal

A exposição ao chumbo (Pb) em embriões de *D. rerio* apresentou curvatura de coluna em diferentes níveis de gravidade, mesmo quando exposta em conjunto com o extrato.

Fig. 29 - Curvatura de coluna em larva de peixe-zebra exposta ao chumbo e ao chumbo com extrato.

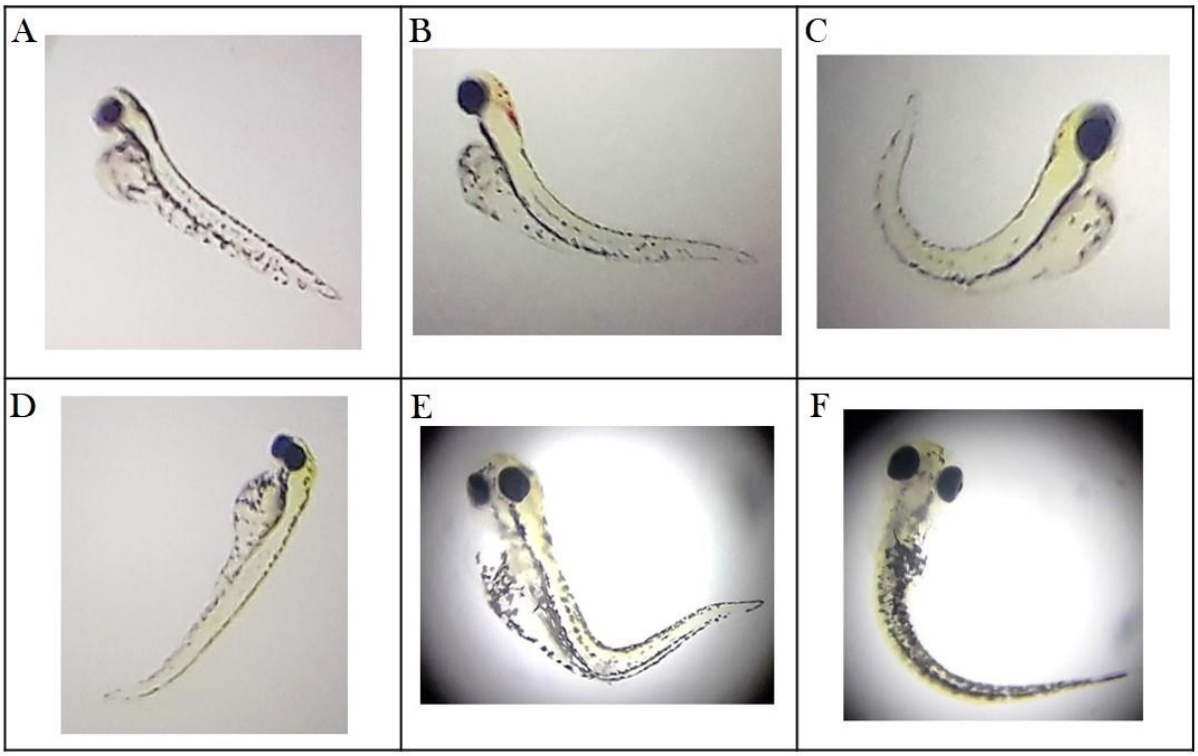


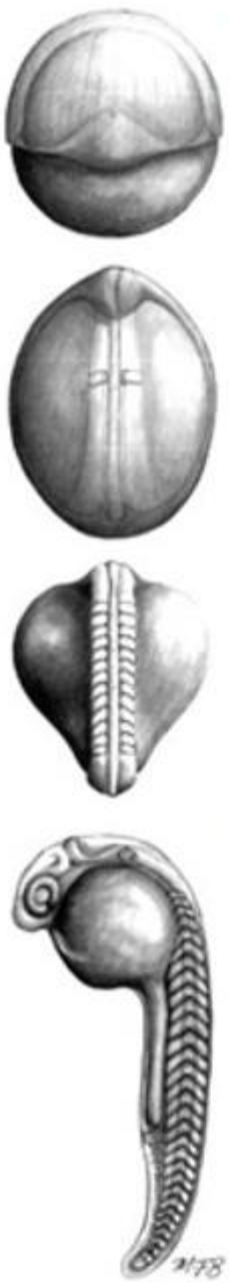
Imagem e identificação de curvatura de coluna após 72h e 96h de exposição (chumbo e extrato com chumbo). (A) Coluna torta em larva exposta à 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (B) Coluna torta em larva exposta à 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (C) Coluna torta em larva exposta à 100 mg/L de extrato com 100 µg/L de chumbo. (D) Coluna torta em larva exposta à 100 µg/L de chumbo. (E) Coluna torta em larva exposta à 100 µg/L de chumbo. (F) Coluna torta em larva exposta à 100 µg/L de chumbo. Fonte: Arquivo pessoal (2023-2024).

9. Anexos

Anexo I- Desenvolvimento embrionário de peixe-zebra

Anexo retirado a partir do artigo "Somite Development in Zebrafish", de Stickney, Barresi & Devoto (2000) exemplificando a formação de somitos.

Fig. 30- Desenvolvimento de somitos de embrião e larva de peixe-zebra saudáveis



6 h, estágio de escudo:
Padronização do Mesoderma.
A involução e a extensão convergente criam o mesoderma axial e o paraxial.
O mesoderma axial modela o mesoderma paraxial.

10.5 h, 1 estágio de somito:
Início da Segmentação.
Os precursores musculares lentos na placa segmentar foram especificados por sinais derivados da notocorda.

15.5 h, estágio de 13 somitos:
A segmentação continua.
Pares de somitos se formam a cada 30 minutos (à 28.5 ºC).

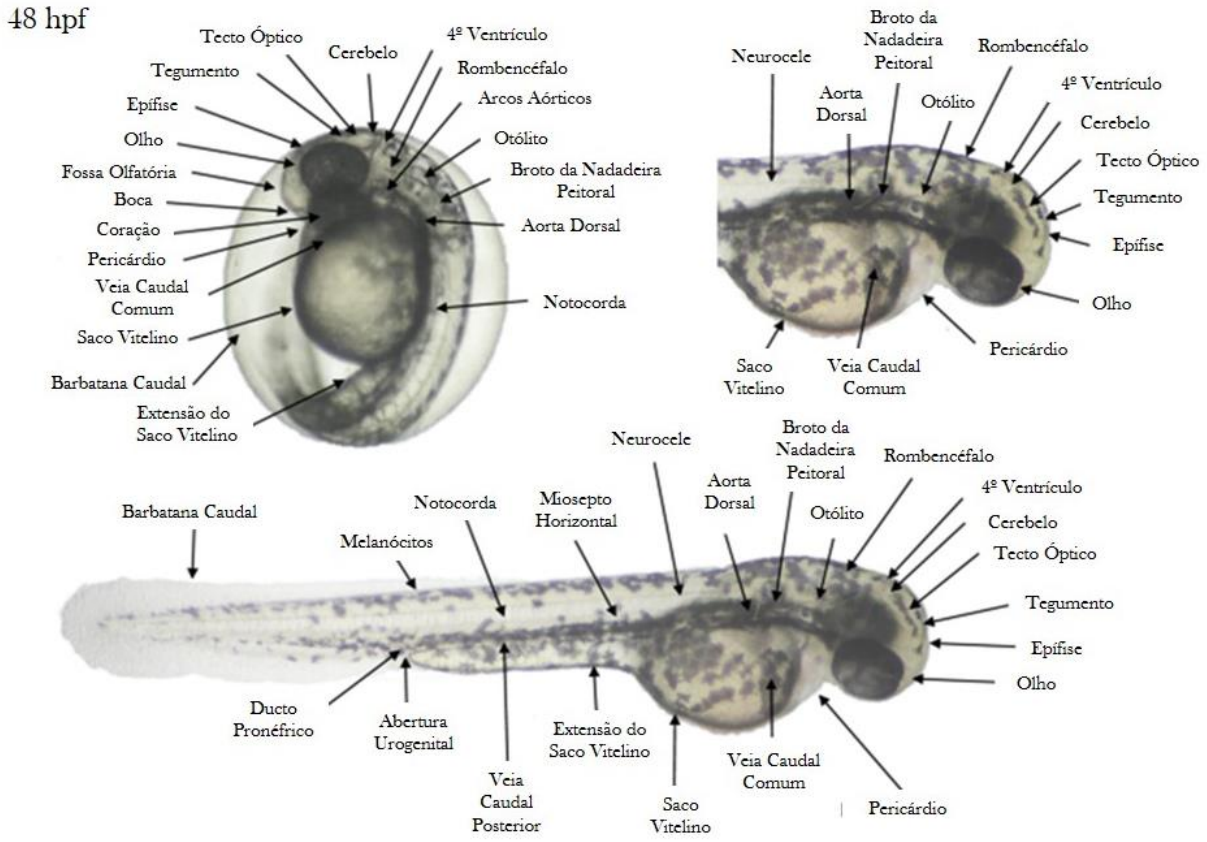
24h, estágio de 30 somitos:
Segmentação concluída.
Os somitos são divididos em esclerótomos. Músculos lentos e rápidos.
O músculo é inervado e funcional.

Anexo com imagem e identificação de estruturas normais observadas no decorrer das horas. Fonte: Stickney, Barresi & Devoto (2000).

Anexo II- Anatomorfologia normal de peixe-zebra

Anexo retirado a partir do artigo "Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos", de Hellfeld *et al.* (2020).

Fig. 31 - Anatomia normal de um embrião e larva de peixe-zebra saudáveis.



Anexo com imagem e identificação de estruturas normais da fase inicial do desenvolvimento do peixe-zebra.

Fonte: Hellfeld *et al.* (2020).