



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

LAYZA COSTA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ICTIOTÓXICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DA RAÍZ DE *SPILANTHES ACMELLA* (JAMBÚ) EM
ZEBRAFISH ATRAVÉS DA ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA E
COMPORTAMENTAL.**

BELÉM- PA
2013

LAYZA COSTA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ICTIOTÓXICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DA RAÍZ DE *SPILANTHES ACMELLA* (JAMBÚ) EM
ZEBRAFISH ATRAVÉS DA ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA E
COMPORTAMENTAL.**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Neurociências Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará.

Área de concentração: Neurociências

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Allan
de Farias Rocha.**

BELÉM – PA
2013

LAYZA COSTA RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ICTIOTÓXICO DO EXTRATO
ETANÓLICO DA RAÍZ DE *SPILANTHES ACMELLA* (JAMBÚ) EM
ZEBRAFISH ATRAVÉS DA ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA E
COMPORTAMENTAL.**

BANCA EXAMINADORA:

BELÉM

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Ribeiro, Layza Costa, 1988-

Investigação do efeito ictiotóxico do extrato etanólico da raiz de *Spilanthes acmella* (jambú) em zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental / Layza Costa Ribeiro. - 2013.

Orientador: Fernando Allan de Farias Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2013.

1. Neurociências. 2. Fisiologia. 3. Zebrafish. I. Título.

CDD 23. ed. 612.8

RESUMO

Dentre as várias espécies de plantas medicinais, encontra-se a espécie *Spilanthes acmella*, conhecida popularmente como jambú que se destaca por apresentar inúmeras aplicações na área da medicina popular. A medicina tradicional recomenda suas folhas e flores na elaboração de infusões no tratamento de anemia, dispepsia, malária, afecções da boca (dor de dente) e da garganta, contra escorbuto e também como antibiótico e anestésico. Sendo seus principais efeitos atribuídos ao espilantol, que é um representante importante das substâncias presentes nessas plantas. Alguns estudos já foram realizados utilizando o espilantol, possibilitando algumas informações da ação dessa substância, como seu efeito e imunomodulador devido sua interação funcional com monócitos, granulócitos e células killers. Porém, ainda não existem estudos eletrofisiológicos acerca de sua ação ictiotóxica, utilizando, por exemplo, o eletroencefalograma para demonstrar sua ação ao nível de Sistema Nervoso Central ou eletromiograma para verificar a ocorrência de sua ação a nível muscular no Zebrafish, evocando a necessidade dessa pesquisa a respeito do assunto. Com base nisso, o presente trabalho objetivou investigar a ação ictiotóxica do extrato etanólico da raiz de *Spilanthes acmella* em Zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* é um potente indutor de excitabilidade central no zebrafish, sendo isso constatado a partir das mudanças de padrões de atividade elétrica vistas no eletroencefalograma do animal submetido à droga e através do aumento da atividade encefálica visto no espectograma. O extrato também causou alterações, em menor escala, nos traçados eletromiográficos do zebrafish submetido à mesma concentração da droga, com aparecimento de contrações musculares esparsas e de mioclonias breves. Eos achados comportamentais, a partir da delimitação de três estágios de comportamentos, os quais se iniciaram com o aumento da excitabilidade do animal e culminam com a convulsão e morte do peixe, serviram para corroborar com os achados eletrofisiológicos de que o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* atua como potente droga com ação no sistema nervoso do zebrafish, com atividade convulsivante.

Palavras chaves: *Spilanthes acmella*; zebrafish; ictiotoxicidade; eletroencefalograma, estágios comportamentais.

ABSTRACT

Among the various species of medicinal plants, we can find the *Spilanthes acmella* species, popularly known as Jambu that stands out due to its numerous applications in the folk medicine field. Traditional medicine recommends the use of its leaves and flowers in the preparation of infusions to treat anemia, dyspepsia, malaria, mouth diseases (tooth pain) and throat diseases, against scurvy and also as antibiotic and anesthetic, being its main effects attributed to espilantol, which is an important representative of the substances present in these plants. Some studies have been performed using the espilantol, providing some information of the effect of this substance, as its immunomodulatory effect and because of its functional interaction with monocytes, granulocytes and killer cells. However, there are still no electrophysiological studies about its ictiotoxic action using, for example, the EEG to demonstrate its action at the central nervous system level or electromyogram to verify the occurrence of their effects in the Zebrafish muscles, evoking the need for this research. Based on this, the present study aimed to investigate the ictiotoxic action of the ethanol extract of the *Spilanthes acmella* root in Zebrafish by electrophysiological and behavioral analysis. The results showed that the ethanol extract of *Spilanthes acmella* is a potent inducer of central excitability in zebrafish, this being evidenced by changes in electrical activity patterns seen in the EEG of the animals subjected to the extract and by increasing brain activity seen in the spectrogram. The extract also caused changes, in a lesser extent, on the electromyographic tracings of zebrafish subjected to the same concentration of the extract, with the appearance of scattered muscle contractions and brief myoclonus. And the behavioral findings from the delimitation of three stages of behavior, which began with the increased excitability of the animal and resulted in the seizure and death of the fish, served to corroborate the electrophysiological findings that the ethanol extract of *Spilanthesacmella* acts as a potent substance acting on the nervous system of zebrafish, with convulsant activity.

Keywords: *Spilanthes acmella*; zebrafish; ictiotoxicity, electroencephalogram, behavioral stages.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DL50 – Dose letal mediana

dB - Decibel

DL50 – Dose letal mediana

EEG- Eletroencefalograma

EMG- Eletromiograma

Hz- Hertz

mV- Milivolt

OMS- Organização Mundial da Saúde

PSD- Densidade Espectral de potência

PTZ- Pentilenotetrazol

UMs- Unidades Motoras

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Número e porcentagem de animais mortos em diferentes concentrações do extrato etanólico de *Spilanthes acmella*_____32

Tabela 2– Latência da ação do extrato etanólico de *Spilanthes acmella* no zebrafish sob diferentes concentrações_____34

Tabela 3 – Demonstra a latência em segundos para cada estágio comportamental, assim como as características desse, em zebrafish (n=30) imerso no extrato etanólico da raiz de jambú na concentração de 0,17 mg/ml._____47

Tabela 4-Representação do intervalo médio de duração de cada fase do EEG (A1, A2, A3, A4 e A5), do EMG (P1, P2 e P) e dos estágios comportamentais (C1, C2 e C3)_____49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Spilanthes acmella</i> (Jambú)	14
Figura 2- Estrutura química do Espilantol	15
Figura 3- <i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	18
Figura 4- Eletrodo conjugado.	27
Figura 5- Mesencéfalo (MB).	28
Figura 6- Demonstração do giro em torno do próprio eixo	30
Figura 7- Porcentagem de animais mortos em diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>Spilanthes acmella</i> .	33
Figura 8- Gráfico do número de animais mortos em função da concentração do extrato etanólico de <i>Spilanthes acmella</i> (mg/ml) e equação gerada por regressão linear.	35
Figura 9- Traçados eletroencefalográficos representados por (A) traçado basal e (B) traçado do animal submetido ao contato com o extrato etanólico da raiz de jambú	37
Figura 10- Traçado eletroencefalográfico basal: (A) Sinal de registro obtido do peixe sem contato com o extrato etanólico de <i>Spilanthes acmella</i> em maior amplitude. (B) Gráfico frequência x amplitude	37
Figura 11- Espectograma relacionando os níveis de distribuição de energia até 50Hz correspondentes aos traçados eletroencefalográficos basal (A) e do animal tratado com o extrato etanólico da raiz de jambú (B)	39
Figura 12- Demonstra a amplitude (Potência em dB), quantificando o nível da força entre os traçados eletroencefalográficos basais e tratados (n=9)	40
Figura 13- Padrões de traçados encontrados no eletroencefalograma de animais tratados de acordo com a ordem de aparecimento	42
Figura 14- Traçados eletromiográficos representados por (A) traçado Basal e (B) traçado do animal submetido ao contato com o extrato etanólico da raiz do jambú. E os padrões encontrados no eletromiograma do animal tratado	45
Figura 15- Demonstra a amplitude (Potência em dB), quantificando o nível da força entre os traçados eletromiográficos basais e tratados (n=5)	46
Figura 16 - Escala temporal de surgimento das fases nos registros do EEG e EMG e dos estágios do comportamento no zebrafish, em segundos. A escala acima é representativa do	

surgimento temporal das cinco fases do EEG (A1, A2, A3, A4 e A5). A escala do meio é representativa do surgimento das três fases do EMG (P1, P2 e P3). E a escala abaixo é representativa do surgimento dos três estágios comportamentais (C1, C2 e C3)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. <i>Spilanthes acmella</i>	13
3. Ictiotoxicidade.....	16
4. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	17
5. Eletroencefalograma (EEG).....	19
6. Eletromiograma (EMG).....	21
7. Análise experimental do comportamento.....	22
8. OBJETIVOS.....	24
8.1 GERAL.....	24
8.2 ESPECÍFICOS.....	24
9. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
9.1 Obtenção do extrato etanólico da raiz do <i>Spilanthes acmella</i>	25
9.2 Animais (<i>Zebrafish</i>).....	26
9.3 Concentração letal mediana (CE50).....	26
9.4 Eletroencefalograma.....	27
9.5 Eletromiograma.....	29
9.6 Equipamento usado para gravação e aquisição de dados.....	29
9.7 Análise Comportamental.....	29
9.8 Análise de dados.....	31
9.9 Comparação dos valores de coerência.....	31
10 RESULTADOS.....	32
10.1 ICTIOTOXICIDADE.....	32
10.2 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA (DL50).....	35
10.3 ELETROENCEFALOGRAMA.....	36
10.4 ELETROMIOGRAMA.....	44
10.5 AVALIAÇÃO DOS ESTÁGIOS COMPORTAMENTAIS.....	47
10.6 CORRELAÇÕES ENTRE ACHADOS ELETROFIOLÓGICOS E ESTÁGIOS COMPORTAMENTAIS.....	48
11 DISCUSSÃO.....	50
12 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	54

1. INTRODUÇÃO

A curiosidade moveu o homem a explorar o poder medicinal dos elementos da natureza, dessa forma o uso de fitoterápicos remonta milênios. No período antes de Cristo, civilizações como China, Índia e Japão já utilizavam extratos retirados de vegetais com finalidade terapêutica. E registros que remontam ao século XV mostram o uso de extratos vegetais por populações da Europa Medieval. Ao final do século XIX, foram criados órgãos públicos responsáveis pela regulamentação da comercialização desses produtos naturais, pois houve um grande número de relatos de intoxicações provocadas pelos mesmos (SCHENKEL et al., 2001).

Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários ou produtos naturais, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON; ANDERSON, 1998)

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002) mostram que cerca de 25% de medicações tidas como essenciais têm sua origem a partir de produtos naturais e que 11% destas são originados a partir somente de plantas. E, segundo Elisabetsky (2000), a maioria dos medicamentos que se têm hoje derivados de plantas foram descobertos a partir de pesquisas que utilizaram plantas da medicina tradicional.

Em 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a reconhecer o uso de plantas medicinais para diversas finalidades no âmbito da saúde, como: para fins paliativos, curativos, profiláticos e diagnósticos. Com isso, o Brasil, como país detentor de uma imensa e variada flora, a qual abriga uma excepcional quantidade de plantas que podem ser usadas com objetivos medicinais, tornou-se possuidor de um grande potencial voltado para a pesquisa e descoberta de plantas com novas propriedades terapêuticas (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

A colossal biodiversidade brasileira contribui para que tenhamos um acervo incomensurável de plantas com componentes ativos de potencial farmacológico, em especial na maior floresta tropical do mundo, a Amazônia. O país é possuidor de um total de 20 – 22% de todas as plantas e microorganismos que existem no mundo. Porém, somente um número aproximado de 25.000 espécies de plantas são objeto de algum tipo de investigação científica

(CALIXTO, 2005). Por isso, a realização de um maior número de pesquisas acerca desse assunto é necessária para investigar a relação entre os compostos e seus efeitos biológicos.

Além disso, há uma grande preocupação, ainda hoje, quanto ao consumo de fitoterápicos no Brasil, pois grande parte deles é usada com pouca ou nenhuma constatação científica de seus efeitos farmacológicos e adotados como “medicamentos” seguros por sua origem natural. Porém, são frequentes os efeitos colaterais gerados pelos componentes ativos destes produtos, tais como a toxidez, o que alerta para a necessidade de estudos mais incisivos acerca de sua atuação (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) é uma pequena amostra da importância e uso dessas plantas. Dentre as várias espécies de plantas medicinais, encontra-se a espécie *Spilanthes acmella*, conhecida popularmente como jambú, que se destaca por apresentar inúmeras aplicações na área da medicina popular (SANTOS, 2010).

A medicina popular recomenda o seu uso na elaboração de infusões no tratamento de anemia, dispepsia, malária, afecções da boca (dor de dente) e da garganta, contra escorbuto e também como antibiótico e anestésico (BORGES, 2009).

2. *Spilanthes acmella*

A *Spilanthes acmella* (Jambú) é uma planta herbácea perene, alcança uma altura de 20 a 30 centímetros, possui folhas opostas, agudas, longo-pecioladas, ovadas, membranosas, com flores pequenas de coloração verde-clara ou amarela, que ocupam seus ramos terminais ou auxiliares. Reproduz-se facilmente de forma assexuada e pode ser propagada por sementes ou por hastes enraizadas (RATNASOORIYA, 2004; RANI, MURTI, 2006; CAVALCANTI, 2008).



Figura 1-*Spilanthes acmella* (Jambú)

Fonte: <http://tucupicomjambu.blogspot.com.br/>

É uma planta nativa da América do Sul, típica da Amazônia, onde é conhecida popularmente como jambú, este sendo muito utilizado na culinária local no preparo de comidas típicas como o tacacá e o pato no tucupí. Além disso, possui extensa aplicação na medicina popular com sua utilização em diversas afecções, como em casos de estomatite, dor de dente, inflamações de garganta, aftas, herpes, potente diurético, entre outras diversas, o que lhe confere características anti-inflamatórias, analgésica, antibacteriana, antiviral, cicatrizante, antisséptica e até antirrugas, o que vem ampliando sua aplicação mais recente na área de cosméticos.

Várias investigações fitoquímicas sobre a *Spilanthes acmella* já foram previamente descritas (NAGASHIMA e NAKATANI, 1992). Ela é constituída por um grupo diverso de compostos. Os principais isolados foram as alquilamidas lipofílicas, como o espilantol. Sendo seus principais efeitos atribuídos a esse composto, que é um representante importante das substâncias presentes nessas plantas. (BORGES, 2009). Tal substância é extraída das flores, folhas, raiz e caule da planta (NAYAK e CHAND, 2002).

O espilantol é uma substância classificada no grupo das N-alquilamidas, que é um grupo composto por um ácido graxo de cadeia média a longa ligado a carbonos e uma amina, de cadeia aberta, possui fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$ e é apenas uma dentre várias encontradas em plantas dos gêneros *Echinacea*, *Zanthoxylum* e *Spilanthes* (BOONEN et al., 2010). É o maior constituinte encontrado nas espécies de *Spilanthes*; classifica-se, especificamente, como uma isobutilamida. Na sua forma isolada é um óleo viscoso ardente,

de coloração amarelo pálido a amarelo claro (SANTOS, 2010). É produtor de uma sensação de formigamento e dormência na língua (CAVALCANTI, 2008).

(2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida

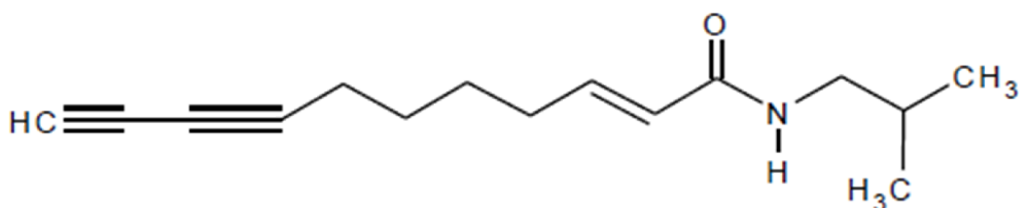


Figura 2-Estrutura química do Espilantol

O espilantol utilizado em experimentos tem sido acrescido de uma porcentagem de álcool etílico, sendo dessa forma, um extrato alcóolico de espilantol. Em um estudo realizado por Boonenet al(2010) a porcentagem final de etanol foi de 65% .

Trabalhos foram realizados demonstrando a atividade desse extrato em larvas de *Aedes aegyptii* neonatos de *Helicoverpazea* (lagarta parasita do milho) por Ramsewak e Erickson (1999) e também em fungos como o *Asperigillusflavus*, *A. paraciticu*, *Fusariumoxysporium* *F. moniliformis* por Rani e Murty (2006) ampliando a utilização do espilantol e sua importância para pesquisa.

Outros estudos abordaram o efeito analgésico (Ratnasooriya and Pieris, 2005; Rios et al., 2007) e imunomodulador devido sua interação funcional com monócitos, granulócitos e células killers (Matthias et al., 2008).

Moreira et al (1989) realizou um trabalho com base nos efeitos de diferentes extratos da *Spilanthes acmella*, no qual camundongos foram tratados por via intraperitoneal com esses diferentes extratos com o objetivo de caracterizar os efeitos convulsivantes dessa espécie vegetal. Os resultados dessa pesquisa mostraram que os diferentes extratos foram capazes de desencadear alterações comportamentais características de atividade convulsiva de maneira dose-dependente, concluindo-se então que a *Spilanthes acmella* contém princípio ativo que pode induzir crises epileptiformes.

Porém, ainda não existem estudos eletrofisiológicos acerca de sua ação ictiotóxica, utilizando, por exemplo, o eletroencefalograma para demonstrar sua ação no sistema nervoso central ou eletromiograma para verificar a ocorrência de sua ação ao nível muscular no Zebrafish, evocando a necessidade dessa pesquisa a respeito do assunto.

3. Ictiotoxicidade

A toxicidade de uma substância pode ser considerada como a capacidade de ser prejudicial, causando dano grave ao organismo. Os efeitos tóxicos só se manifestam se o agente tóxico alcançar locais específicos do organismo em concentrações e tempo suficiente para produzir algum tipo de efeito (BARROS; DAVINO, 2008).

Os testes de toxicidade aguda são realizados em curtos períodos de tempo (geralmente entre 48 horas a 96 horas) e têm um plano experimental relativamente simples, onde os efeitos críticos analisados são normalmente a mortalidade ou a imobilização dos organismos. O objetivo desses testes consiste na determinação da concentração de uma substância ou a intensidade de um agente, como temperatura e pH, que produz um efeito prejudicial num grupo de organismos durante uma exposição curta, efetuada em condições controladas (WARD et al, 1982).

A toxicidade é expressa pelo valor da dose letal a 50% (DL50). Este parâmetro indica a concentração de tóxico no meio que provoca a morte de metade dos indivíduos da população considerada nas condições experimentais utilizadas (ASTM, 1998).

Atualmente são conhecidas inúmeras espécies de plantas que possuem comprovada toxicidade aguda para peixes. Muitas espécies das famílias Sapindaceae, Leguminosae e Compositae têm sido usadas pelos índios e caboclos brasileiros na pesca que, por ser predatória, vem sendo combatida devido ao envenenamento das águas dos rios, levando à morte e captura dos peixes de todas as idades. É interessantes assinalar o fato dos peixes envenenados pelos princípios ativos dessas plantas se prestarem ao consumo, sem que sua carne ofereça risco algum de intoxicação alimentar ao consumidor (MASCARO et al, 1998).

Dentre os gêneros mais citados como ictiotóxicos se destacam os Timbós, que são um grupo de plantas conhecidas por seu uso na pesca por ameríndios desde a época pré-colombiana na região amazônica, cujo poder ictiotóxico é devido principalmente à presença de rotenona (CARVALHO et al., 2012).

A rotenona é o mais estudado dos princípios ativos e também o mais potente, causa a morte dos animais principalmente através da inibição da cadeia respiratória mitocondrial (MASCARO et al., 1998), bloqueando a fosforilação do ADP a ATP, sendo peixes e insetos altamente sensíveis.

Esse grupo de plantas quando esmagadas e lançadas na água, produzem a morte de peixes pela ação de substâncias tóxicas. Por este fato acaba existindo uma grande quantidade de espécies de diferentes gêneros e famílias com esta nomenclatura (TIMBÓ, 2012).

Os gêneros mais conhecidos são o “timbó vermelho” [*Degueliarufescens* var. *urucu* (Lonchocarpus *urucu*/ *Derris urucu*)] e “timbó branco” [*Deguelia utilis* (Lonchocarpus *utilis* / *Derris nicou*)] (LÔBO et al., 2010). Essas espécies são conhecidas popularmente como “timbós-verdadeiros”, são fontes de substâncias com comprovada atividade inseticida e, portanto, vêm sendo utilizadas como biopesticidas em todo o mundo. São as plantas de maior uso ictiotóxico na Amazônia (TOZZI, 1998).

Embora não se tenham estudos comprovando a atividade ictiotóxica da *Spilanthes acmella*, esta se mostrou altamente tóxica quando em contato com o Zebrafish em estudos preliminares realizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais na UFPA, no qual os peixes da espécie Zebrafish foram submetidos a diferentes concentrações de extrato etanólico de jambú, o qual mostrou ser, de forma dose-dependente, tóxico ocasionando a morte dos peixes. Isso então deu margem para o aprofundamento da pesquisa em questão.

4. Zebrafish (*Daniorerio*)

O *Danio rerio*, mundialmente conhecido como zebrafish, foi descrito inicialmente por Francis Hamilton em 1822 e introduzido como modelo animal nas pesquisas científicas por George Streisinger em 1981. É um peixe teleósteo (3 – 4 cm) de água doce, pertence à família Cyprinidae, apresenta dimorfismo sexual, é ovíparo, de hábito alimentar onívoro e originário do sul e sudeste da Ásia (SCHNEIDER et al., 2009).

É um animal de fácil manutenção e reprodução, pois possui grande adaptabilidade, podendo sobreviver em diferentes condições ambientais. A fêmea pode produzir cerca de 200 ovos por desova, sendo que os filhotes atingem a maturidade sexual dentro de 2 a 3 meses (GERLAI et al., 2000).



Figura 3-*Danio rerio* (Zebrafish).

FONTE: <http://www.sciencedaily.com>

O zebrafish tem sido considerado um modelo de vertebrado ideal para o estudo em diversos campos do conhecimento. Essa espécie, em particular, possui características que a tornam propícia ao estudo da biologia comportamental, pois possui um metabolismo rápido, o que a torna um bom modelo para rastreio de drogas, e é uma espécie com grande sensibilidade a mudanças ambientais e efeitos tóxicos, os quais provocam mudanças significativas em seu comportamento ou em sua aparência externa, que podem ser facilmente identificadas (GERLAI, 2003; VAN DYK, 2005).

Diversos outros fatores, como: pequeno porte, permitindo o armazenado de uma maior quantidade de animais em um ambiente de tamanho reduzido; ovos translúcidos com fertilização e desenvolvimento externos, que facilitam o acompanhamento do desenvolvimento do embrião; embrião de fácil manipulação, o que permite uma investigação mais aprofundada; grande prole e seu rápido desenvolvimento; fazem com que ele seja considerado um modelo consagrado no estudo de doenças humanas, o que lhe possibilitou ser, atualmente, excelente modelo experimental para estudos genéticos e toxicológicos (LIESCHKE, 2007).

Logo, a espécie vem sendo largamente utilizada como animal de experimentação para o estudo de numerosas doenças humanas e para a descoberta de novas drogas devido sua complexidade típica de vertebrado, de tal modo que os estudos consigam manter a

complexidade dos sistemas aliando a isso a redução dos custos de tais pesquisas (RICO et al, 2011).

Além dessas vantagens, essa espécie dispõe também de grande quantidade de estudos quanto sua anatomia e desenvolvimento embriológico presentes na literatura e também apresenta tamanho relativamente pequeno o que possibilita seu uso em larga escala enquanto o uso da quantidade de reagentes é significativamente menor, o que facilita o rastreio de drogas (RICO et al, 2011).

O genoma do zebrafish foi sequenciado, o que mostrou grande similaridade entre seus genes e os genes de humanos e camundongos. Além do que, as características de sua embriogênese são bastante conhecidas, assim como o destino celular durante seu desenvolvimento. Isso possibilitou minuciosos estudos acerca de seu sistema nervoso, que mostraram similaridade no seu desenvolvimento quando comparado com os de outros vertebrados, o que facilita o estudo de diversos tipos de desordens, como a epilepsia, doenças cardíacas e genéticas (FLEMING, 2010; BARBAZUK et al., 2000; LIESCHKE e CURRIE, 2007; KIMMEL e WARGA, 1988; KIMMEL, 1989).

Essas homologias genéticas e neurais, entre outras, permitiram seu uso na pesquisa de novas drogas e também em pesquisas de cunho comportamental (LIMA et al., 2009).

No que se refere à pesquisa de novas drogas, além de características já mencionadas, como: tamanho, reprodução, características morfológicas e fisiológicas e suas similaridades com mamíferos, o fato de absorver rapidamente as substâncias que são colocadas na água e a capacidade de armazená-las em diversas partes de seu organismo, amplia cada vez mais seu uso na área da toxicologia (GROSELL e WOOD, 2002).

Pesquisas que investigam o efeito de determinadas substâncias no organismo dessa espécie de peixe foram publicadas, como o estudo feito por Bilotta et al (2004), que investigou as alterações provocadas pela exposição ao etanol no organismo do zebrafish e o realizado por Pineda, Beattie, Hall (2011) que avaliou ação do pentilenotetrazol no sistema nervoso central do zebrafish através de exame de eletroencefalograma.

5. Eletroencefalograma (EEG)

Os organismos na terra adquiriram, ao longo da evolução, a capacidade de enviar e processar informações com uma alta taxa de velocidade de transmissão, a qual não era

possível até então com o uso apenas do fluxo sanguíneo e de moléculas sinalizadoras como os hormônios. Dessa forma, surgiu o sistema nervoso, altamente especializado na rápida e eficiente transmissão de impulsos nervosos através de potenciais elétricos gerados em suas membranas celulares.

Potenciais são criados a partir da movimentação de íons através das membranas dos neurônios, que surgiram como células excitáveis e componentes fundamentais dos tecidos nervosos, glandulares e musculares. Tudo isso, graças à presença de canais iônicos na membrana celular que se abrem toda vez que a célula muda seu potencial de repouso, invertendo sua polaridade momentaneamente e levando ao surgimento de um potencial de ação que pode se propagar por longas distâncias e transmitir o estímulo para células vizinhas que sejam capazes de se excitar na presença desse tipo de estímulo.

Estes sinais elétricos são gerados, então, por células especializadas em diversos órgãos do corpo humano, como no cérebro e músculos. A variação desses potenciais pode ser medida, avaliada e, dessa forma, usada para diagnosticar possíveis alterações fisiológicas. O registro das variações de potencial elétrico produzidas pelos neurônios do cérebro é chamado de eletroencefalograma (EEG), termo que foi introduzido pelo psiquiatra alemão Hans Berger, pesquisador que fez os primeiros registros elétricos de EEG humano em 1929.

A atividade elétrica cerebral é espontânea e contínua, podendo ser evidenciada durante a vigília, o sono, a anestesia e o coma, cessando apenas nos estados extremos de anóxia cerebral (PINTO, 2006). Essa atividade pode ser captada sobre o couro cabeludo, base do crânio, sobre o cérebro exposto ou na profundidade do mesmo, ela consiste em um conjunto de muitos traçados irregulares simultâneos, indicando alterações de voltagem entre pares de eletrodos e é caracterizada por amplitudes extremamente pequenas (da ordem de microvolts).

Os ritmos do eletroencefalograma variam consideravelmente e correlacionam-se frequentemente com determinados estados do comportamento (com os níveis de atenção, sono e vigília) e com patologias (como crises epiléticas ou coma).

Os ritmos são categorizados pela sua faixa de frequência, e cada faixa é denominada utilizando-se uma letra grega. O EEG pode apresentar, então, os seguintes ritmos: Gama, são os mais rápidos, maiores que 30 Hz; Beta, ritmos rápidos de 14 a 30 Hz, e sinalizam um córtex ativado; Alfa, entre 8 e 13 Hz e estão associados a estados de vigília, em calmo

repouso; Teta, entre 4 e 7 Hz e ocorrem durante alguns estados do sono; Delta, menores que 4 Hz, são muito lentos, grandes em amplitude e indicam sono profundo (BEAR, 2008).

Atividades encefálicas anormais podem ser vistas nos registros de EEG durante crises epiléticas. No momento em que ocorre a crise, o registro passa a apresentar uma atividade extremamente sincrônica, usualmente acompanhada por padrões de EEG de grande amplitude e frequência, que nunca ocorre durante um comportamento normal (BEAR, 2008).

Os estudos eletroencefalográficos em peixes ainda são escassos, embora exista uma vasta gama de estudos com o Zebrafish. Entre os poucos trabalhos publicados nessa área, tem-se em 2005 a pesquisa de Baraban et al que induziu mudanças no comportamento em larvas de zebrafish com o pentilenotetrazol (PTZ) e realizou gravações extracelular no tectoóptico do peixe que revelou descargas eletrográficas ictal e interictal após aplicação de PTZ, o que pode ser bloqueado por antagonistas do receptor de glutamato ou tetrodoxina. Essas crises epiléticas foram suprimidas por antiepiléticos como o valproato e o diazepam, de uma forma dependente da concentração.

Além desse estudo, Baraban et al (2007) realizou ainda registros encefalográficos com o uso de um microelétrodo de vidro, colocando-o no tecto óptico do peixe. Tais registros foram filtrados a 1 kHz, passa-baixa de 0,1-0,2 Hz, passa-alta de 5-10 kHz, digitalizados usando um Digidata 1300 A/ interface D, as sessões de gravação foram realizadas entre 30 e 90 min.

Porém, ainda não existem trabalhos que demonstrem registro eletroencefalográfico no zebrafish exposto ao *Spilanthus acmella* e analisando a ação dessa substância a partir desses registros.

6. Eletromiograma (EMG)

Eletromiografia é o estudo da detecção, análise e uso do sinal elétrico (EMG) proveniente da contração muscular (WEBSTER, 1988). Essa técnica pode ser dividida em dois procedimentos, a eletromiografia de superfície e a de profundidade. A eletromiografia de superfície compreende a captação do sinal mioelétrico utilizando eletrodos dispostos na superfície da pele, enquanto a eletromiografia de profundidade constitui uma técnica invasiva, na qual eletrodos, do tipo agulha ou fio, são introduzidos diretamente em um determinado músculo (WEBSTER, 1978).

A eletromiografia de superfície é a mais utilizada, por se tratar de uma técnica simples, sem a necessidade de treinamento por parte do executor na colocação dos eletrodos, que são dispostos na superfície da pele. Apesar de sua simplicidade, o sinal coletado compreende a atividade de diferentes UMs (Unidades Motoras), não sendo possível a observação da atividade de uma única unidade motora. Já a eletromiografia de profundidade permite que se observe apenas uma única UM, por meio da introdução de eletrodos diretamente nas fibras musculares, porém esta introdução requer treinamento na sua colocação. Mesmo com a correta introdução dos eletrodos, esta técnica apresenta um incômodo constante ao paciente. Neste sentido, assim como parece ser a tendência das técnicas de auxílio a diagnósticos de uma forma geral, a prática não invasiva é preferida nas aplicações em que esta é possível (ROSA, 2005).

7. Análise experimental do comportamento

O termo “comportamento” (behavior) deve ser compreendido pelo binômio estímulo-resposta. O estímulo provém do ambiente, ao passo que a resposta é de caráter ontológico. É por isso que o estudo comportamental não se limita à verificação do ato motor do animal, mas a um todo de interação entre o ser vivo e o seu respectivo ambiente.

O estudo comportamental facilita a percepção do efeito neurobiológico de uma droga em determinado organismo vivo. As drogas possuem a capacidade de induzir comportamentos, desencadeando a construção de modelos comportamentais. Tais modelos edificam-se na mescla entre o saber naturalístico e laboratorial, sendo a avaliação de seus resultados imprescindível para o desenvolvimento de tecnologias no segmento médico, industrial e de pesquisa (GOUVEIA, MAXIMINO & BRITO, 2006).

Camundongos e ratos são amplamente utilizados em neurociência, uma vez que ajudam na determinação de quais regiões cerebrais e quais sistemas neurotransmissores estão envolvidos em uma série de comportamentos, constituindo-se em modelos comportamentais clássicos. Nas últimas décadas, entretanto, tem sido ainda empregado nas pesquisas em neurociências, o *Danio rerio* (zebrafish), um peixe ornamental bastante difundido nos estudos de neurodesenvolvimento.

A classe dos peixes demonstra direta ou indiretamente grande parte do comportamento visto em animais terrestres, uma vez que evolutivamente é considerada ancestral dos tetrápodes. Os estudos comportamentais com peixes se iniciaram, a partir de

psicólogos e etólogos, para o tratamento de temas como a cognição, o desenvolvimento do aprendizado e as funções cerebrais.

A descoberta do potencial científico do zebrafish é atribuída a George Streisinger e devido ao custo relativamente baixo do peixe e sua acessibilidade para análise genética, tem se estabelecido como um bom modelo para estudar as bases moleculares do neurodesenvolvimento e do neurocomportamento em vertebrados. Além disso, na literatura científica, verifica-se a utilização do zebrafish em análises sobre a cognição, memória, aprendizagem, ansiedade e medo. (LEVIN & CERUTTI, 2009).

O Zebrafish surgiu como um excelente modelo para o estudo dos mecanismos de comportamento alterado e para o rastreio de agentes terapêuticos potenciais. (STEWART et al., 2012). Seu comportamento usual é caracterizado por uma geral falta de movimento, mantendo-se preferencialmente em um local específico do ambiente e apresenta preferência pelo ambiente escuro.

Baraban et al. (2005) induziu alterações comportamentais em Zebrafish utilizando pentilenotetrazol (PTZ), a exposição a este agente convulsivante comum induziram uma sequência estereotipado e dependente da concentração de alterações comportamentais que culminaram com clônus, como convulsões.

Cabe ressaltar, que os efeitos do fármaco não seguem um padrão em todas as espécies animais. Os resultados comportamentais obtidos dependem do organismo-modelo utilizado, o que sem embargo não significa o impedimento da produção de analogias e homologias com outras espécies, uma vez que a neurociência e a fisiologia dão suporte a essas comparações.

A descrição dos resultados comportamentais fomentados por esse modelo se faz relevante, entre outros fatores, na medida em que possibilita o entendimento mais detalhado dos fenômenos neurofarmacológicos advindos da exposição do peixe à droga, além de permitir a detecção rápida de um agente tóxico em potencial pouco elucidado pela literatura: o extrato etanólico da raiz de *Spilanthes acmella*.

8. OBJETIVOS

8.1 GERAL

- Investigar a ação ictiotóxica do extrato etanólico da raiz de *Spilanthes acmella* em Zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental.

8.2 ESPECÍFICOS

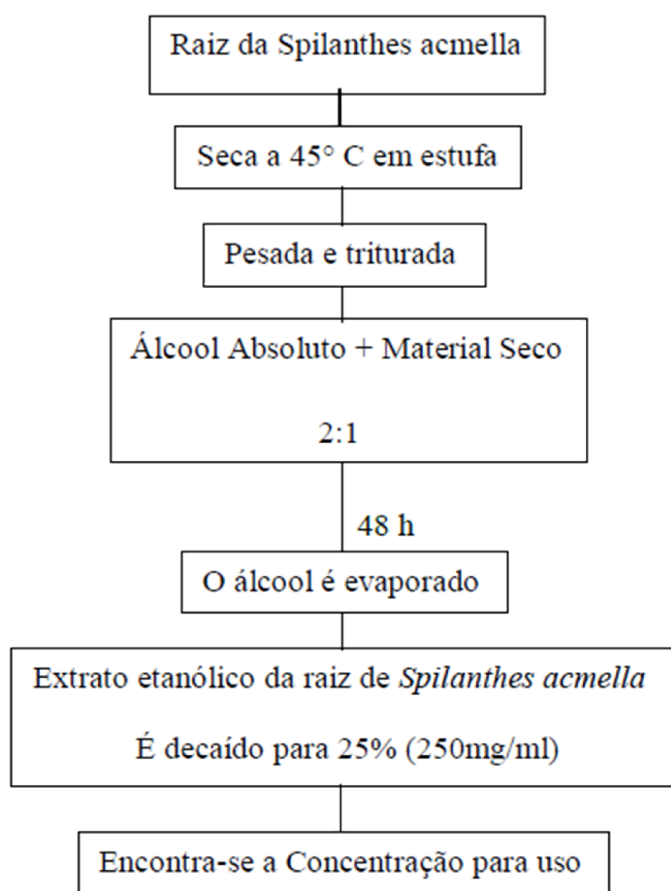
- Encontrar a concentração letal mediana da droga para a obtenção do efeito ictiotóxico no Zebrafish;
- Descrever os efeitos comportamentais do peixe submetido à concentração letal mediana do extrato;
- Verificar alterações eletroencefalográficas e eletromiográficas no Zebrafish após o contato com o extrato;
- Correlacionar os achados eletroencefalográficos e eletromiográficos com os estágios comportamentais.
- Investigar possível efeito convulsivante do extrato etanólico de *Spilanthes acmella* sobre o zebrafish.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Obtenção do extrato etanólico da raiz do *Spilanthes acmella*

As folhas foram coletadas na cidade de Belém (PA – Brasil). A identificação botânica foi feita pela Profa. Dra. Silvane Tavares Rodrigues, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental. Uma exsicata foi depositada no herbário IAN, na mesma instituição, sob o registro de número 185611.

A raiz foi seca em estufa por 24 horas a 45°C, a massa seca foi pesada e posteriormente triturada. E então foi utilizado álcool absoluto como solvente extrator na proporção 2:1, e a amostra foi deixada em contato com o solvente por 48 horas em recipiente fechado. Por fim, o álcool foi evaporado e obteve-se uma pasta negro-esverdeada, que foi decaída para 25% (250mg/ml), e, através desta, foi calculada a concentração para uso.



Fluxograma 1: Obtenção do extrato etanólico da raiz da *Spilanthes acmella*.

Para o estudo foi utilizado o extrato etanólico da raiz *Spilanthes acmella* na concentração de 250 mg/ml (a 25%). O extrato foi diluído em várias concentrações de 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml e 0,75 mg/ml para determinação da dose letal mediana (DL50).

9.2 Animais (*Zebrafish*)

Para realizar o trabalho, foram utilizados 60 animais para análise comportamental, 15 para o eletroencefalograma e 15 para eletromiograma, totalizando 90 animais. Todos os estudos utilizaram animais adultos (12-14 meses). Os peixes foram comprados em lojas especializadas de Belém do Pará e passaram por um processo de aclimação durante 72 horas. Os zebrafish foram mantidos no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, em um aquário contendo água decantada com $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$, sendo alimentados 2 vezes ao dia com *BASIC*®, como também à temperatura ambiente constante e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados mais de 2 h após a alimentação da manhã nos dias úteis. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Experimentação Animal da Universidade Federal do Pará (UFPA) sob registro: BIO010112.

9.3 Concentração letal mediana (CL50)

Em um béquer de 250 ml VIDROLABOR® o extrato etanólico da raiz da *Spilanthes acmella* a 25% foi diluído em diferentes concentrações (0,1mg/ml, 0,25mg/ml, 0,5mg/ml, 0,75mg/ml) para obter a concentração letal mediana (CL50). Foram utilizados 15 animais para cada concentração e os peixes entraram em contato com a solução por um período de dez minutos. Nesse período, todos os animais foram observados para saber quantos sofreram o efeito ictiotóxico devido à exposição ao extrato e tais dados foram então anotados para análise e cálculo da concentração letal mediana (CL50) que foi usada nesta pesquisa.

9.4 Eletroencefalograma

A atividade eletroencefalográfica foi monitorada utilizando um eletrodo conjugado confeccionado no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. O mesmo foi confeccionado com fios de aço-inox que apresentam um raio de 0,1 mm (da ponta) e comprimento de 1,0 cm. Possuindo duas extremidades: uma de registro e outra de referência.

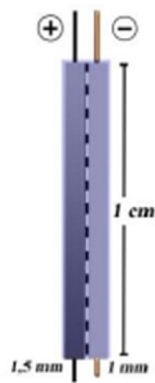


Figura 4- Eletrodo conjugado.

FONTE: Autores.

Para os eletroencefalogramas, o eletrodo foi inserido na região do mesencéfalo do Zebrafish, tendo, para isso, como referência a linha sagital mediana (longitudinal) e a borda caudal do olho (transversal). O local de intercessão entre as linhas corresponde ao ponto exato de introdução do eletrodo de registro, e na posição de 0,5 mm à frente representa o local de introdução do eletrodo de referência.

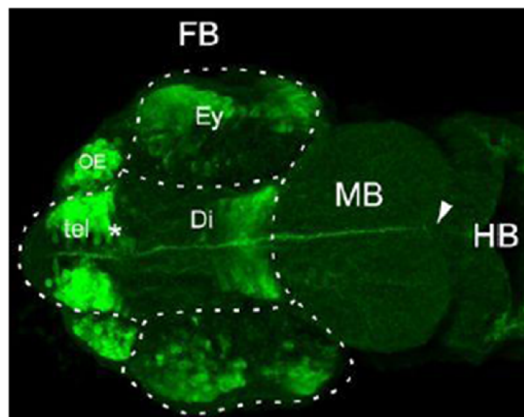


Figura 5-Mesencéfalo (MB).

FONTE: ZebrafishBrain Atlas.

Para a colocação do eletrodo, os peixes foram individualmente contidos dentro de uma esponja que estava inicialmente submersa em água e, posteriormente, banhada pela solução com a dose letal mediana (DL50) do extratetanólico de *Spilanthes acmella*, com temperatura em torno de 26 °C e pH de 7,2.

Após a colocação do eletrodo, a preparação foi colocada em uma gaiola de Faraday para a realização dos registros de modo a evitar interferência de ruídos externos.

Após a experiência de gravação do eletroencefalograma e eletromiograma, os animais foram mantidos em água contendo lidocaína (cloridrato de lidocaína 2%, Lab. Hipolabor Farmacêutica Ltda, de Sabará-MG, Brasil) 1mg/ml até paralisia total do animal.

Para a caracterização dos aspectos de ictiotoxicidade neuronal ocasionadas pelo extrato, foram utilizados os programas Signal® 3.0 e Python® 2.7, que possibilitou a análise no domínio da frequência das ondas cerebrais, além da inspeção visual dos padrões ondulatórios. A análise espectral de potência dos componentes de frequência proporcionou correlacionar os estágios de excitabilidade neuronal.

9.5 Eletromiograma

Para a captação das alterações a nível periférico foi utilizada a eletromiografia, pois esta detecta o sinal elétrico proveniente da contração muscular. O estudo utilizou para isso a eletromiografia de profundidade que se constitui de uma técnica invasiva, na qual eletrodos, do tipo agulha ou fio, são introduzidos diretamente em um determinado músculo.

Os sinais eletromiográficos foram coletados durante cinco minutos, tanto o basal quanto o de registro com o animal em contato com o extrato. O eletrodo usado foi do tipo fio, igual ao eletrodo confeccionado para o eletroencefalograma. Ele foi introduzido no músculo axial na porção epiaxial do peixe.

Para captura e análise dos dados, respectivamente, foram utilizados os programas Signal® 3.0 e Python® 2.7, que possibilitou a análise no domínio da frequência das ondas das atividades musculares e suas alterações em contato com o extrato, além da inspeção visual dos padrões ondulatórios.

9.6 Equipamento usado para gravação e aquisição de dados

Os eletrodos de registros foram conectados a um amplificador de alta impedância (Tecnologias Grass, P511) com amplificação de 2.000x. Os registros foram filtrados com ajuste de 300 Hz no filtro passa-baixa e 0,3 Hz no filtro passa-alta e monitorados por um osciloscópio (Protek, 6510). Os dados foram continuamente digitalizadas e armazenamento em 1kHz resolução de amostragem em um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX) armazenados em um disco rígido de computador para off-line análise por um software (LabVIEW Express).

9.7 Análise Comportamental

A análise comportamental foi realizada através da colocação individual de um total de 30zebrafish em um béquer contendo o extrato etanólico de jambú em sua dose letal mediana (DL50) para o peixe por um período de 10 minutos. E, nesse período, foi observado o comportamento do peixe mediante o efeito do extrato. Para a caracterização das alterações

comportamentais do animal, determinados comportamentos foram levados em consideração devido a pouca frequência com que ocorrem durante o comportamento usual do peixe sem o efeito de qualquer substância, tais como:

Excitabilidade: movimentos mais rápidos que os usuais.

Movimento rápido da cauda ou Tremores caudais: as nadadeiras caudais apresentam movimentos ligeiramente mais rápidos, com maior frequência de batimentos na extremidade caudal.

Diminuição transitória da motilidade: o peixe cessa seu movimento temporariamente.

Perda transitória do reflexo de postura: O animal não consegue manter seu padrão global de atividade motora (dorso-ventral, de cima para baixo), assumindo, por vezes, uma postura lateral ou ventral-dorsal.

Giro em torno do próprio eixo: Consiste no movimento giratório em volta do eixo do próprio corpo do animal. Pode se suceder tanto no sentido horário, quanto anti-horário. O esquema a seguir ilustra um GE no sentido horário:

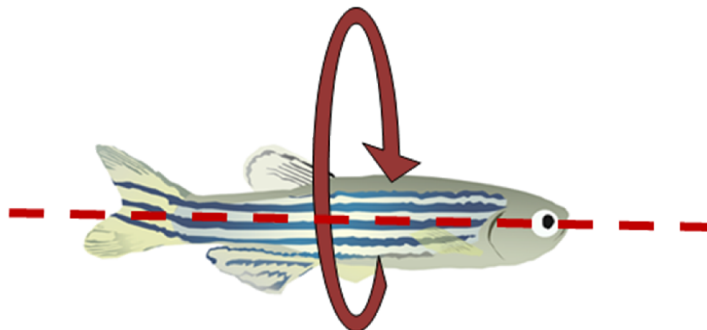


Figura 6- Demonstração do giro em torno do próprio eixo

Adaptada de <http://www.egosumdaniel.se/illustrations/>

Movimentos descoordenados: Peixe apresenta movimentação descoordenada, dirigindo-se para o fundo do béquer, apresentando nado circular ou impulsionando-se para frente e para trás.

Perda do reflexo de postura: Há a perda total do reflexo de postura.

Perda da motilidade: O animal cessa o movimento e não retorna.

Efeito Ictiotóxico: Efeito do fármaco administrado, levando à morte do animal. Cessam-se os movimentos das nadadeiras. O animal pode ou não depositar-se no fundo do

recipiente. Estabeleceu-se, nesse estudo, como efeito ictiotóxico o ocorrido a partir da perda da motilidade.

9.8 Análise de dados

Para as análises dos sinais adquiridos, a ferramenta foi desenvolvida utilizando a linguagem de programação Python versão 2.7. As bibliotecas numpy e scipy foram utilizadas para o processamento matemático da biblioteca e matplotlib para os gráficos. A interface gráfica foi desenvolvida usando a biblioteca PyQt4.

Os gráficos de amplitude são a intenção de mostrar a diferença de potencial entre os eletrodos de referência e de registro. Foram observados no sinal de 1000 amostras por segundo.

Os espectrogramas foram calculados utilizando uma janela de Hamming (com 256 pontos de 256/1000 segundos), cada quadro foi gerado com uma sobreposição de 128 pontos por janela. Para cada quadro da densidade espectral de potência (PSD) foi calculada pelo método de Welch periodograma média.

Os histogramas de frequência foram gerados calculando a PSD do sinal usando a janela de Hamming com 256 pontos, sem sobreposição. Com o PSD resultante foi montado um histograma com caixas de 1 Hz. Para analisar a diferença entre as experiências, um gráfico com o desvio médio e padrão de PSD de várias experiências foram montadas, cada onda do gráfico foi gerado a partir de um conjunto de experiências, em que o indivíduo foi calculado PSD e do desvio médio e padrão de cada grupo está representado, para o cálculo da PSD janela de Hamming de 256 pontos foi usada sem sobreposição.

9.9 Comparação dos valores de coerência

Para a comparação dos valores foram feitos média e desvio padrão e foi utilizado teste - t não pareado. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as proporções, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

10. RESULTADOS

10.1 ICTIOTOXICIDADE

A Tabela 1 e a Figura 7 mostram o percentual de animais mortos sob diferentes concentrações do extrato etanólico de *Spilanthes acmella*. Tais resultados mostram a susceptibilidade crescente do zebrafish a diferentes concentrações desse extrato, sendo que na concentração de 0,75 mg/ml a letalidade do extrato chegou a 100%.

Foi observado ainda que a exposição do peixe a concentrações menores (0,01 mg/ml) não produziu efeitos visíveis sobre o animal. O que aponta para uma proximidade entre a dose terapêutica e a dose tóxica do extrato.

Tabela 1– Número e porcentagem de animais mortos em diferentes concentrações do extrato etanólico de *Spilanthes acmella*

Número e porcentagem de animais mortos em diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>Spilanthes acmella</i>				
Concentração	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	0,75 mg/ml
Número de Mortos	6	9	12	15
%	40	60	80	100

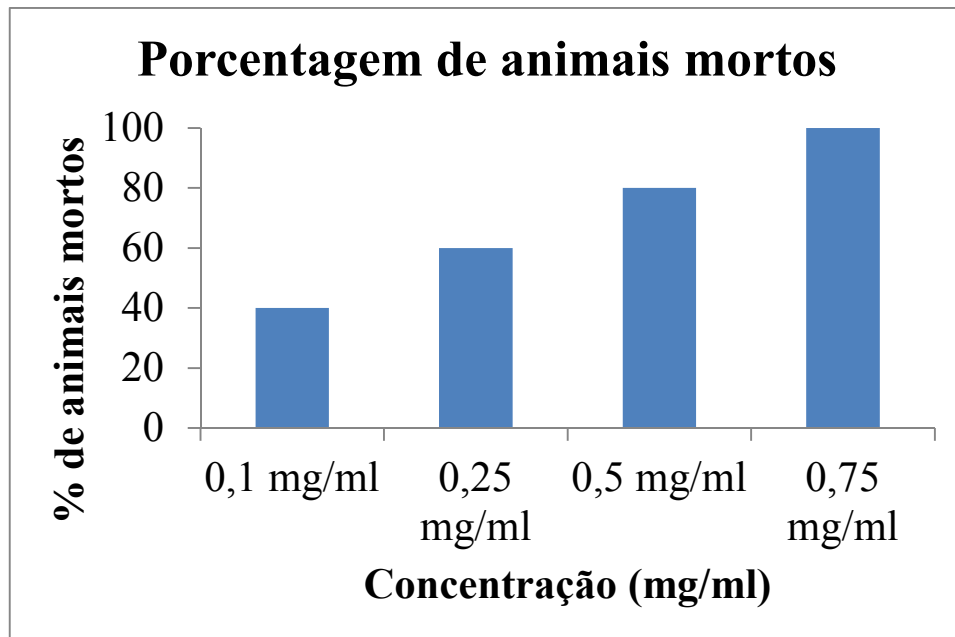


Figura 7– Porcentagem de animais mortos em diferentes concentrações do extrato etanólico de *Spilanthes acmella*.

A Tabela 2 mostra o período de latência, em segundos, para o aparecimento das primeiras alterações comportamentais no peixe em virtude da exposição ao extrato sob diferentes concentrações, a qual mostra um tempo médio de 202.3 segundos de latência na concentração de 0,1 mg/ml e vai diminuindo a medida que a concentração do extrato vai sendo aumentada, e, na concentração de 0,75 mg/ml a latência da ação do extrato é de apenas 69.6 segundos. Tais resultados mostram que, além de tóxico, o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* também mostrou ter ação rápida no organismo do zebrafish.

Tabela 2– Latência da ação do extrato etanólico de *Spilanthes acmella* no zebrafish sob diferentes concentrações

Latência da ação do Extrato Etanólico da raiz de <i>Spilanthes acmella</i> (jambú) no comportamento do zebrafish (em segundos)				
[] mg/ml	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	0,75 mg/ml
	124	86	114	86
	140	87	195	101
	262	87	215	118
	274	76	150	177
	207	76	240	29
	207	76	95	106
	--	300	118	36
	--	78	50	46
	--	126	60	56
	--	--	120	38
	--	--	194	53
	--	--	219	78
	--	--	--	33
	--	--	--	33
	--	--	--	54
Média	202.3	110.2	147.5	69.6
DP	61.3	72.9	64.2	41.6

10.2 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA (DL50)

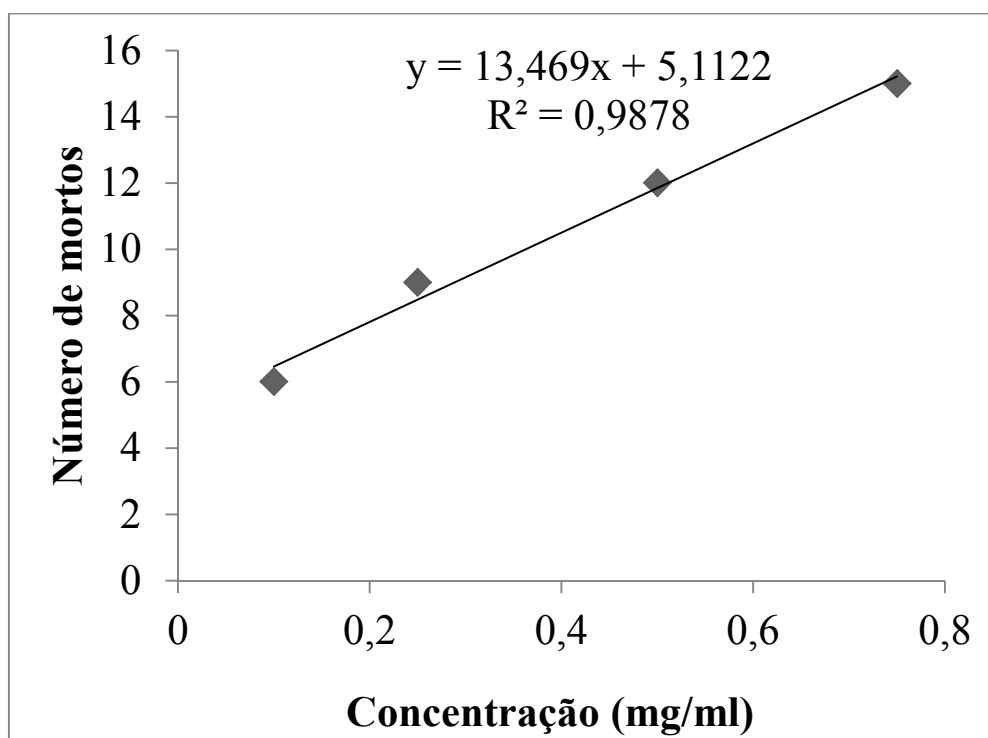


Figura 8– Gráfico do número de animais mortos em função da concentração do extrato etanólico de *Spilanthes acmella* (mg/ml) e equação gerada por regressão linear.

Para a determinação da dose letal mediana (DL50) foram projetados no gráfico da Figura 8 os dados de animais mortos para cada uma das concentrações (0,1 , 0,25 , 0,5 e 0,75 mg/ml) do extrato etanólico de *Spilanthes acmella*. E, através desses dados, foi feita uma regressão linear para a determinação da DL50, que foi de 0,17 mg/ml, como mostra a equação abaixo:

$$y = 13,46x + 5,11$$

$$y = 7,5$$

$$7,5 = 13,46x + 5,11$$

$$7,5 - 5,11 = 13,46x$$

$$2,39 = 13,46x$$

$$x = 2,39/13,46$$

$$x = 0,17\text{mg/ml}$$

10.3 ELETROENCEFALOGRAMA

Como pode ser observado na Figura 9, que representa os traçados eletroencefalográficos basal e do animal submetido ao contato com o extrato etanólico de *Spilanthes acmella*, a utilização do extrato promoveu uma alteração no padrão do traçado do eletroencefalograma do zebrafish.

Pode ser observado que o traçado basal, retirado da região mesencefálica do zebrafish, demonstra oscilações de baixa amplitude. Sendo a atividade eletroencefalográfica basal marcada por amplitude de 0,05 mV, como visto na figura 10A, que mostra o sinal de registro obtido do peixe sem contato com o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* em maior amplitude. A figura 10B apresenta uma análise das frequências em função da amplitude de resposta do EEG, que é marcada por frequências abaixo de 5 Hz.

E o traçado do animal tratado (figura 9) com o extrato na concentração de 0,17 mg/ml se caracteriza pelo aumento da amplitude de disparos, chegando a 1 mV com a presença de salvas de potenciais e de disparos isolados durante o quadro apresentado após exposição, ocorrendo diminuição gradativa da amplitude de disparos com redução da frequência em um tempo, aproximado, de 300 segundos de contato e o desaparecimento da atividade encefálica em 400 segundos de contato. Tais resultados, então, apontam para uma alta toxicidade do extrato para os peixes.

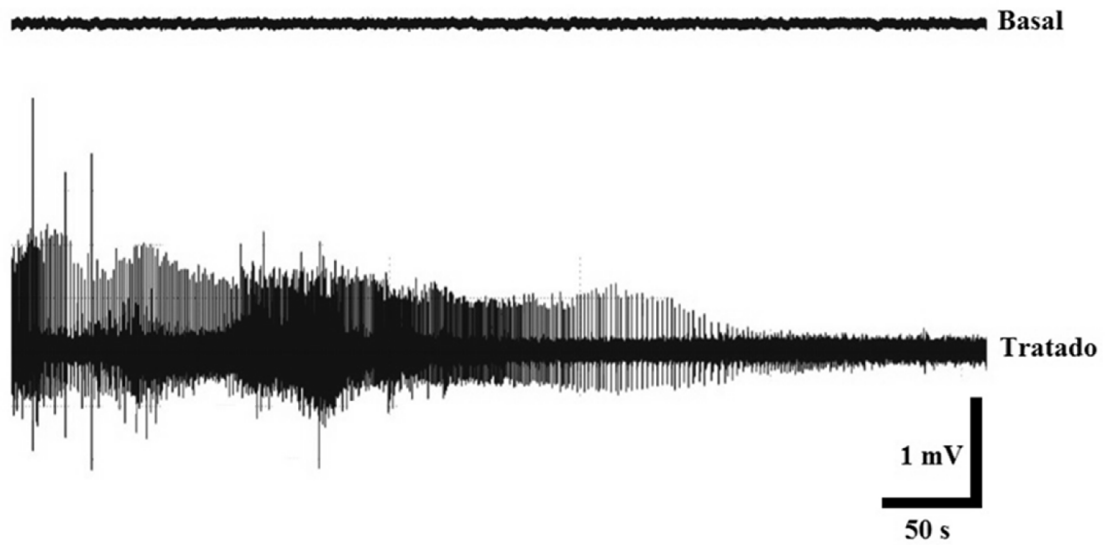


Figura 9-Traçados eletroencefalográficos representados por (A) traçado basal e (B) traçado do animal submetido ao contato com o extrato etanólico da raiz de jambú.

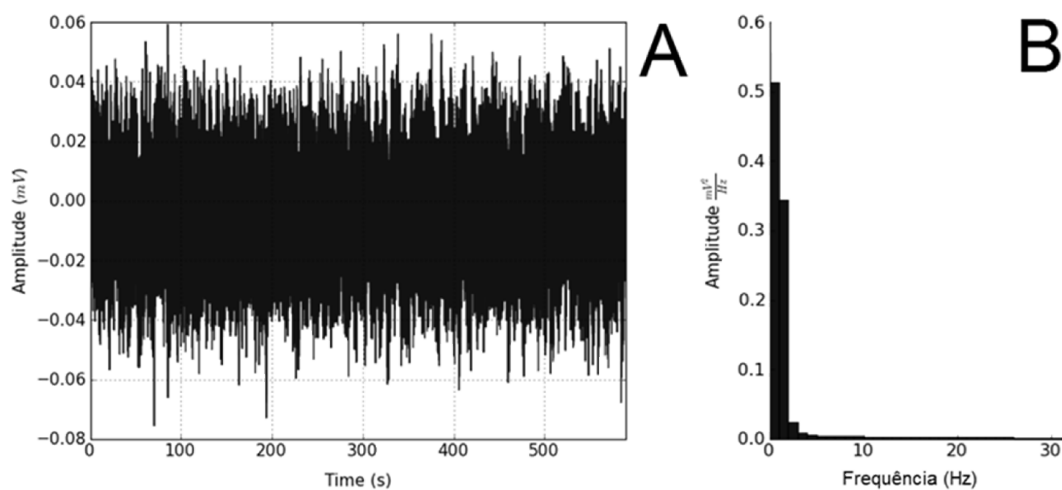


Figura 10-Traçado eletroencefalográfico basal: (A) Sinal de registro obtido do peixe sem contato com o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* em maior amplitude. (B) Gráfico frequência x amplitude.

No espectograma referente às distribuições de energia (Figura 11), o espectograma referente ao eletroencefalograma basal (11A) demonstra prevalência de frequências em torno de 4 Hz. Nessas frequências se têm ondas do tipo teta, as quais sinalizam baixa atividade cerebral, com córtex em estado relaxado.

O espectograma referente ao eletroencefalograma do animal tratado (11B) mostra grande alteração nas frequências das ondas cerebrais. O gráfico 10B mostra a presença de frequências de até 50 Hz até, aproximadamente, 180 segundos, que, então, vão progressivamente decaindo para a faixa de 30 Hz até 300 segundos, e retornam a valores próximos ao basal em 500 segundos, onde se verificam frequências de 4 Hz.

Os resultados do espectograma do animal tratado quando comparados com os do espectograma basal mostram maior ritmo de atividade cortical no zebrafish quando ele está submetido ao extrato etanólico de *Spilanthes acmella*, pois ocorre, inicialmente, prevalência de ondas cerebrais do tipo gama (frequências maiores que 30 Hz e que sinalizam maior atividade cerebral e grande excitação), e, posteriormente, de ondas do tipo beta (frequências entre 14 e 30 Hz e que demonstram um cérebro em atividade e excitado).

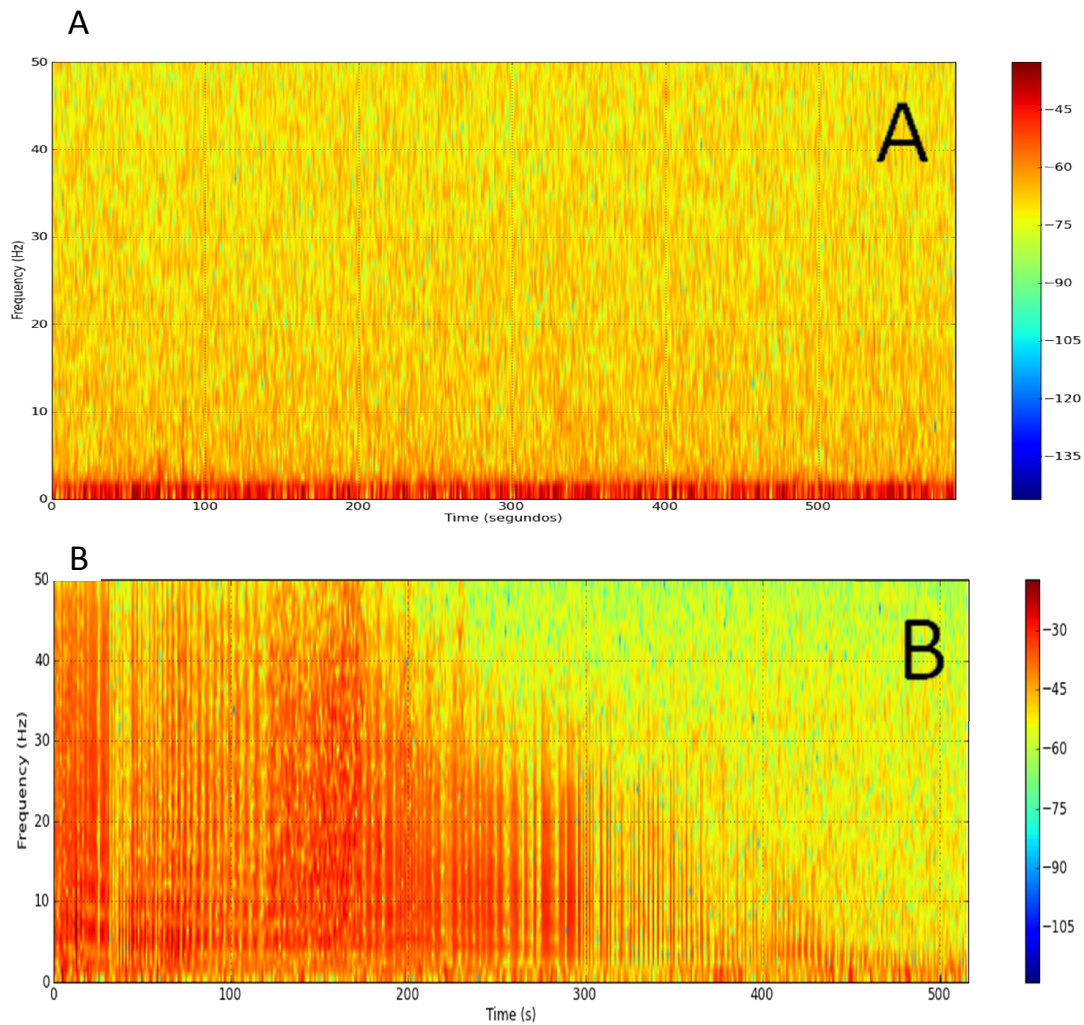


Figura 11-Espectograma relacionando os níveis de distribuição de energia até 50Hz correspondentes aos traçados eletroencefalográficos basal (A) e do animal tratado com o extrato etanólico da raiz de jambú (B).

A Figura 12 é apresentada em escala logarítmica (dB) posicionando a amplitude na ordenada e a frequência até 50 Hz na abscissa. Pode ser observado que os registros basais apresentam maior força nas frequências abaixo de 10 Hz, comprovando os dados anteriores, com a queda progressiva até 50 Hz. Os animais que foram submetidos ao extrato etanólico da raiz do jambú, apresentaram maior força do que o basal na frequência até 50 Hz, sendo a maior força apresentada de 4 a 10 Hz.

A queda da força é progressiva e mais lenta, ocorreu também maior variabilidade entre as frequências, o que pode ser observado nos desvios padrões se comparados com os do basal. Dessa forma, constatamos que ocorre maior gasto de energia proveniente da atividade encefálica dos animais submetidos ao extrato etanólico da raiz do jambú.

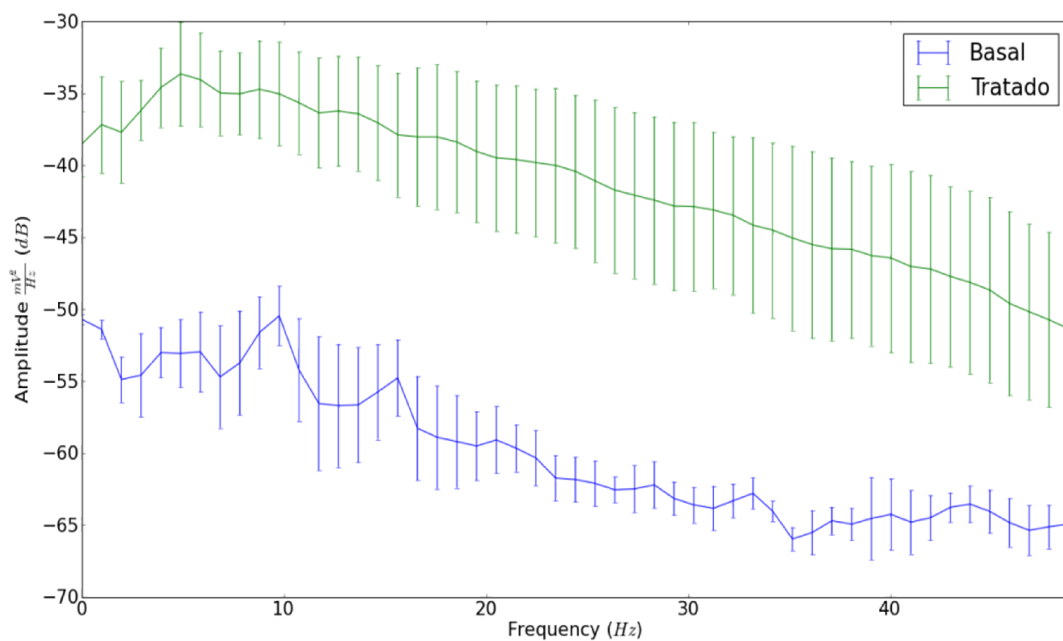


Figura 12-Demonstra a amplitude (Potência em dB), quantificando o nível da força entre os traçados eletroencefalográficos basais e tratados (n=9).

Foram identificados cinco padrões de traçado no eletroencefalograma após o contato com o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* na concentração de 0,17 mg/ml, como apresentado na Figura 13.

Os padrões de traçados foram classificados como fases de acordo com a ordem de surgimento no registro que se caracterizaram por aumento gradativo da excitabilidade com o aparecimento de salvas de potenciais e elevação na amplitude do registro e, posteriormente, diminuição gradativa dessa amplitude.

Inicialmente, se pode observar alteração no traçado relacionada à amplitude e frequência, como citado anteriormente na análise de resultados. É possível identificar também, por meio do potencial de campo, salvas de potenciais com aumento na amplitude e na frequência.

No traçado eletroencefalográfico representado por A₁, é observado o momento de salva de potencial, cujas frequências de 1 a 9 Hz estão alteradas, apresentando pico de amplitude de 0,12 mV/Hz.

No padrão A₂, correspondente a 60 até 65 segundos do traçado A, ocorre redução das amplitudes entre 0 e 10 Hz e aumento das amplitudes situadas entre 15 e 30 Hz quando comparado com A₁. Nessa fase são observadas formas intercaladas de amplitudes maiores que atingem até, aproximadamente, 0,9 mV e outra que chega até 0,25 mV. No gráfico de frequência por amplitude é observada uma queda na amplitude, na qual a mais alta corresponde a 0,08 mV/Hz e as maiores amplitudes estão na faixa de frequência de 0 a 10 Hz; e ligeiro aumento nas frequências.

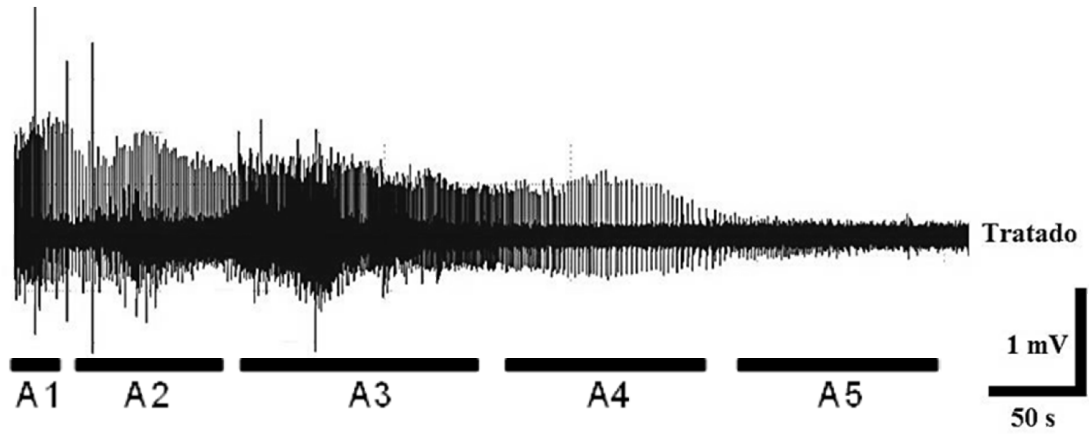
O traçado de A₃ obedece a um padrão de salvas de potenciais com a amplitude menor e a distribuição de energia em cada frequência é bem repartida até 50 Hz, estando as maiores amplitudes situadas entre 10 e 20 Hz e atingindo o pico em 10 Hz, que corresponde a 0,05 mV/Hz.

O traçado eletroencefalográfico A₄ possibilita a observação de disparos de potenciais de campo isolados com diminuição do ritmo, todavia mantendo a amplitude. No gráfico de amplitude por frequência têm-se as maiores forças entre 4 a 17 Hz.

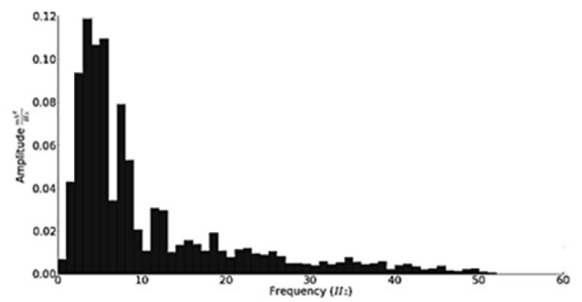
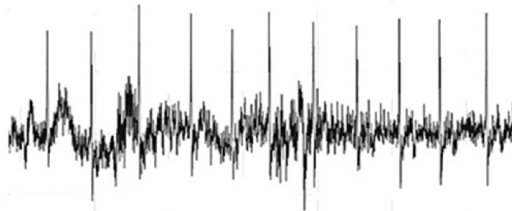
O padrão A₅ indica o período em que o animal tratado apresenta uma similaridade com o registro basal, com as maiores frequências situadas na frequência de 2Hz e então o cérebro torna-se irresponsivo.

Logo, em relação às frequências observadas, levando em consideração todos os padrões, durante a exposição ao extrato, o aumento da excitabilidade do traçado do

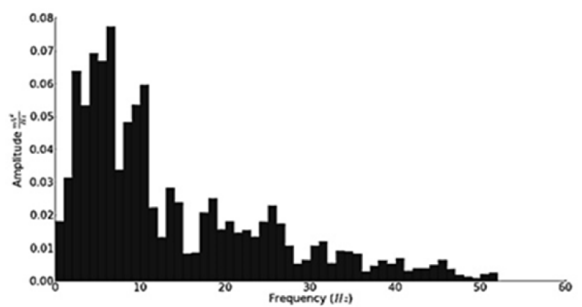
eletroencefalograma provoca variação em todas as frequências, mas, principalmente, nas baixas e médias frequências.



A1



A2



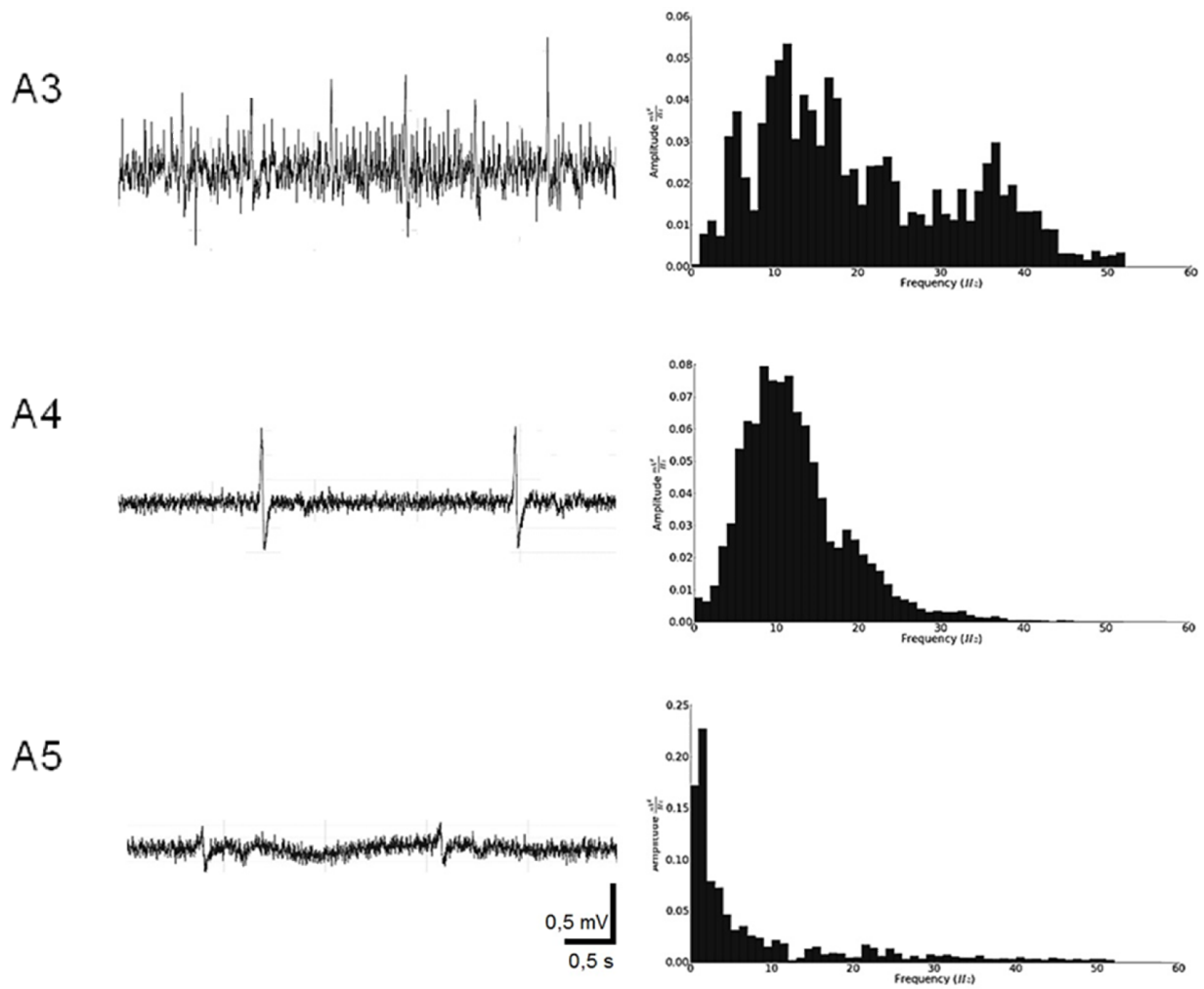


Figura 13-Padrões de traçados encontrados no eletroencefalograma de animais tratados de acordo com a ordem de aparecimento.

10.4 ELETROMIOGRAMA

Na Figura 14, que mostra os traçados eletromiográficos referentes ao registro basal (14A) e ao registro com o animal submetido ao extrato etanólico da raiz de *Spilanthes acmella* (14B), é possível notar alteração nos traçados quando os dois são comparados. Pois, enquanto o registro basal se caracteriza pela manutenção de baixas e constantes amplitudes no decorrer do tempo, o registro eletromiográfico do animal submetido à droga aponta, inicialmente, aumentos esporádicos na amplitude, seguido por uma salva de potencial e posterior retorno do registro a níveis basais de traçado.

Na primeira fase do eletromiograma ocorrem contrações musculares esporádicas de média amplitude intercaladas por relaxamento muscular de traçado semelhante ao basal.

O segundo padrão demonstra uma fase que se caracteriza por intensa atividade muscular em um curto intervalo de tempo, sendo este um traçado típico de intensa mioclonia. Logo, nesse padrão ocorre aumento no nível de esforço muscular e, consequente, gasto energético.

O último padrão se caracteriza por relaxamento muscular, ocorrendo neste: traçado semelhante ao registro basal do animal.

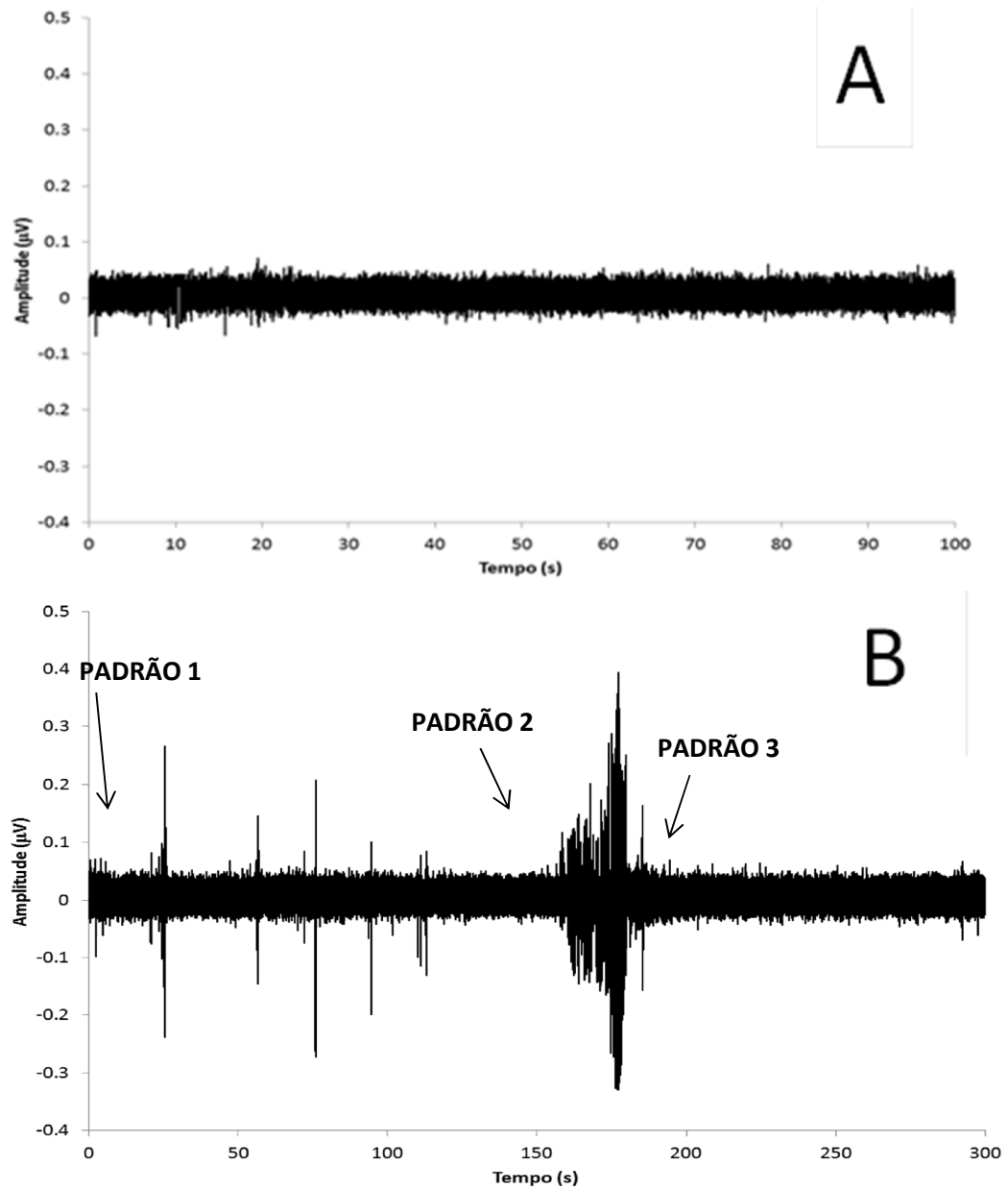


Figura 14- Traçados eletromiográficos representados por (A) traçado Basal e (B) traçado do animal submetido ao contato com o extrato etanólico da raiz do jambú. E os padrões encontrados no eletromiograma do animal tratado.

A Figura 15 é apresentada em escala logarítmica (dB) posicionando a amplitude na ordenada e a frequência até 50 Hz na abscissa. Nessa análise não houve diferença entre o padrão observado no registro basal e no tratado, a despeito de uma diferença na faixa entre 4 e 10 Hz com maior amplitude no registro do animal tratado.

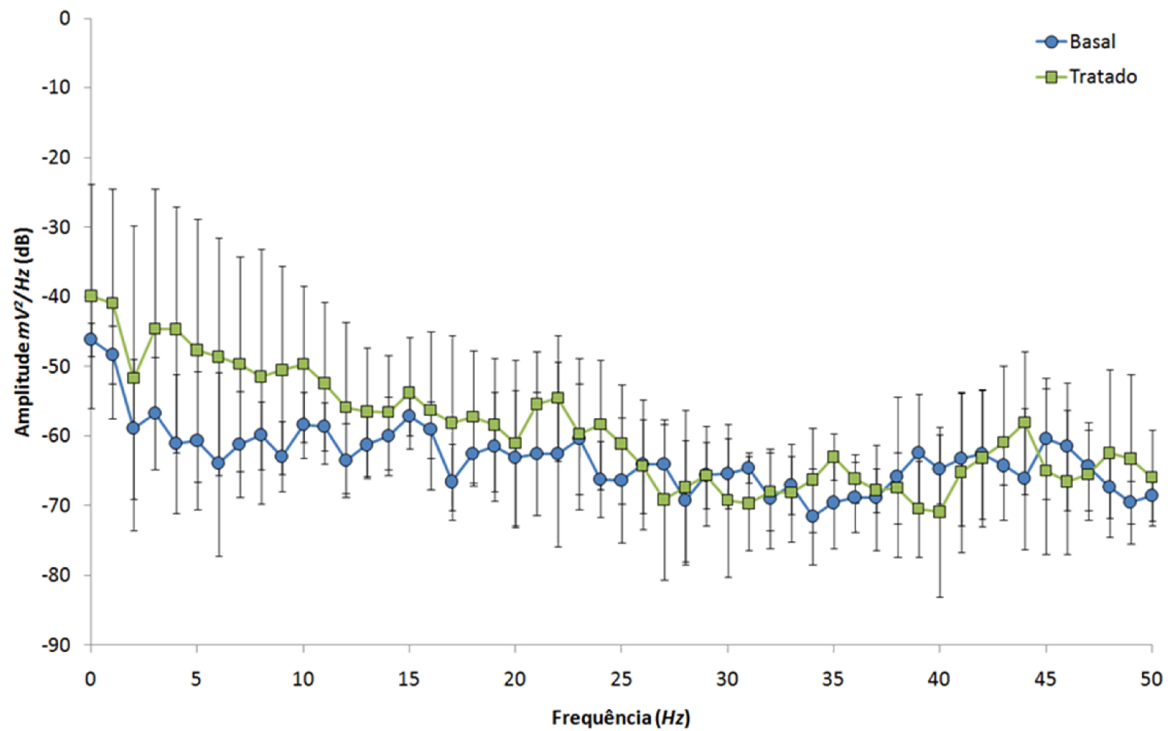


Figura 15-Demonstra a amplitude (Potência em dB), quantificando o nível da força entre os traçados eletromiográficos basais e tratados (n=5).

10.5 AVALIAÇÃO DOS ESTÁGIOS COMPORTAMENTAIS

A submissão via imersão do *Danio rerio* ao extrato etanólico da raiz do jambú na concentração de 0,17 mg/ml desencadeou expressivas alterações comportamentais no peixe.

A Tabela 3 mostra as mudanças comportamentais apresentadas pelo zebrafish durante exposição ao extrato etanólico de *Spilanthes acmella* na concentração de 0,17mg/ml, as mudanças comportamentais foram divididas em estágios e os tempos de latência de cada estágio de comportamento é apresentado.

Tabela 3– Demonstra a latência em segundos para cada estágio comportamental, assim como as características desse, em zebrafish (n=30) imerso no extrato etanólico da raiz de jambú na concentração de 0,17 mg/ml.

Estágios Comportamentais	Característica do comportamento	Latência em segundos
Estágio 1 (C1)	Aumento na atividade de nado, espasmos, tremores no eixo da cauda.	$3,58 \pm 2,03$
Estágio 2 (C2)	Nado circular antecedido ou seguido por perda de postura.	$73,57 \pm 14,88$
Estágio 3(C3)	Clônus, perda de motilidade, deposição do animal no fundo do béquer e morte.	$101,42 \pm 28,53$

A exposição ao extrato traz ao animal modificações comportamentais quase imediatas. O intervalo de tempo médio de latência para o Estágio 1 foi de apenas $3,58 \pm 2,03$. Nesse estágio, o peixe apresentou um perfil excitatório com o aumento na atividade de nado. Notaram-se, ainda, movimentos espasmódicos e tremores na extremidade da cauda do animal.

Com um intervalo de tempo médio de $73,57 \pm 14,88$, manifestou-se o Estágio 2. Nele, o animal realiza nado em círculos, acompanhados, antes ou depois dessa expressão comportamental, pela perda da postura. Durante esse estágio, houve o aparecimento de

características comportamentais do primeiro estágio (aumento da natação, espasmos e tremores caudais).

O estágio 3 se inicia em um intervalo de tempo médio de latência de $101,42 \pm 28,53$. Observa-se a gradativa imobilidade do animal, bem como a sua deposição no fundo do béquer, apresentando convulsões e evoluindo para a morte.

Nenhum desses comportamentos motores foi observado no peixe exposto ao seu meio normal, sendo o comportamento controle do zebrafish caracterizado por carência geral de movimento e preferência por permanecer em uma área determinada no ambiente.

10.6 CORRELAÇÕES ENTRE ACHADOS ELETROFIOLÓGICOS E ESTÁGIOS COMPORTAMENTAIS

Correlacionando os tempos e características dos achados eletrofisiológicos e comportamentais, nota-se que:

As contrações musculares esparsas e de média amplitude, presentes no primeiro padrão do eletromiograma (P1), ocorrem no intervalo de tempo correspondente ao período de salva de potenciais com elevada amplitude (A1) e de disparos de alta amplitude intercalados por componentes de menor amplitude (A2), nos quais há intensa atividade cerebral com aumento de amplitude no eletroencefalograma. Nesse intervalo de tempo também ocorrem os períodos em que o zebrafish se apresenta nos estágios 1 e 2 (C1 e C2) com comportamento. Ou seja, na fase de intensa explosão muscular (aumento da atividade natatória, espasmos e tremores) seguida pela fase marcada por esforço muscular (nado circular) intercalado por bloqueio muscular (perda do reflexo de postura).

E o período em que ocorre o padrão eletromiográfico referente à mioclonia (P2) corresponde ao padrão A3 eletroencefalográfico no qual se notam salvas de potenciais, com maior distribuição de frequência e de energia. E também corresponde ao tempo médio de aparecimento do estágio 3, que é caracterizado, além de sua perda de motilidade, por um período de convulsão do Zebrafish quando ele se deposita no fundo do béquer.

Tabela 4-Representação do intervalo médio de duração de cada fase do EEG (A1, A2, A3, A4 e A5), do EMG (P1, P2 e P) e dos estágios comportamentais (C1, C2 e C3)

EEG		EMG		COMPORTAMENTO	
A1	0 - 38	P1	0 - 152	C1	3,58 – 73,57
A2	38 - 124	P2	152 - 194	C2	73,57 – 101,42
A3	124 - 246	P3	194 - 300	C3	101,42 - 300
A4	246 - 394				
A5	394 - 500				

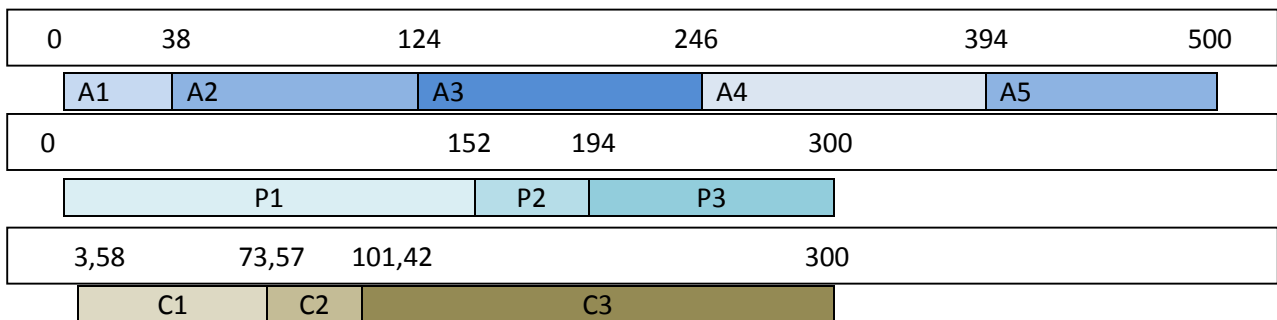


Figura 16 - Escala temporal de surgimento das fases nos registros do EEG e EMG e dos estágios do comportamento no zebrafish, em segundos. A escala acima é representativa do surgimento temporal das cinco fases do EEG (A1, A2, A3, A4 e A5). A escala do meio é representativa do surgimento das três fases do EMG (P1, P2 e P3). E a escala abaixo é representativa do surgimento dos três estágios comportamentais (C1, C2 e C3).

11 DISCUSSÃO

A *Spilanthes acmella* é uma planta de grande interesse científico devido seu diversificado uso na medicina tradicional em diversas afecções, tais como: dor de dente, doenças reumáticas, infecções e febre (WONGSAWATKUL et al, 2008).

Esse trabalho mostrou que o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* tem efeito ictiotóxico sobre o zebrafish, causando a morte dos peixes submetidos a ele em um curto período de tempo.

Outra substância que possui ação ictiotóxica sobre o peixe é a rotenona, que é uma toxina natural usada no mundo como pesticida e piscicida. Ela age sobre a cadeia respiratória de transporte de elétrons inibindo uma das enzimas envolvidas com a oxidação do NADH (CHAUVIN et al, 2001). Logo, a rotenona provoca a morte dos peixes e outros organismos ao bloquear a absorção celular de oxigênio (SINGER e RAMSAY, 1994). Ensaios de toxicidade aguda apresentam efeitos severos e rápidos que essa substância pode causar em um curto período de tempo no peixe (MELO et al, 2012).

Os piretróides, entre eles a deltametrina, também são substâncias que provocam uma série de sinais de toxicidade no zebrafish (VAROLI et al, 2005). O alvo principal dos piretróides são os canais de sódio, os quais têm sua abertura e fechamento prejudicados, levando assim a injúrias no sistema nervoso central dos peixes (VENTURINI, 2013).

O extrato etanólico de *Spilanthes acmella* também mostrou ter ação no sistema nervoso central do peixe, o que foi observado através das alterações na atividade cerebral do zebrafish, nas quais se notou aumento nas amplitudes e frequências dos registros e modificações nos tipos de ondas cerebrais observados no eletroencefalograma. As ondas cerebrais passaram de um ritmo teta no eletroencefalograma basal do animal para ritmos que demonstram grande atividade cerebral, como gama, inicialmente, e beta, posteriormente.

No trabalho de Pineda, Beattie, Hall, 2010, os registros do eletroencefalograma do zebrafish exposto ao pentilenotetrazol (PTZ) mostra achados similares, com aumento de amplitude e frequência.

As alterações comportamentais apresentadas pelo zebrafish também apontam para uma neurotoxicidade aguda induzida pelo extrato. Tal correlação é de suma importância

pois pesquisas indicam que danos funcionais do sistema nervoso durante a exposição a substâncias neurotóxicas podem ter seus efeitos analisados através de testes de performance comportamental (CHASIN e PEDROZO, 2003).

Foi possível observar ainda que o extrato etanólico de *Spilanthesacmella* apresenta um curto período de latência para o aparecimento das primeiras alterações comportamentais no peixe quando o animal é exposto a ele e para modificações observadas no traçado eletroencefalográfico do animal tratado.

Moreira et al, 1989, em trabalho que demonstra o efeito convulsivante do *Spilanthes acmella* em camundongos, vem ao encontro desses achados, no qual conclui que a latência para o aparecimento da primeira crise clônica generalizada e crise tônica seguida de morte do animal foi rápida e de curta duração. Nesse estudo, as latências para a ocorrência dos estágios 4 e 5 do comportamento foram 52,6 +/-2,35 e 59,6 +/-2,42 segundos, respectivamente.

Essa mesma pesquisa foi a primeira que apresentou evidências de que o *Spilanthes acmella* possui princípio(s) ativo(s) responsável(eis) por alterações comportamentais características de atividade convulsiva, na qual o extrato da raiz de jambú provocou convulsões no camundongo quando injetado em doses de 50 a 150 mg/kg por via intraperitoneal.

Baraban et al, 2005, estabeleceu a sequência de comportamento apresentado pelo zebrafish durante a convulsão. Para isso o animal foi exposto ao pentilenotetrazol (PTZ), substância comprovadamente convulsivante, e foram analisadas suas alterações comportamentais. Os estágios de comportamento induzidos por essa substância foram: estágio 1: incremento da atividade do nado; estágio 2: comportamento de nado circular rápido como um redemoinho; estágio 3: série de clônus como convulsões seguido de perda de postura. E então o peixe cai para o lado e permanece imóvel por 1 a 3 segundos. Tais estágios foram bastante similares aos encontrados nessa pesquisa com o extrato etanólico de jambú.

Além disso, Pineda, Beattie, Hall, 2011, fizeram o registro eletroencefalográfico da convulsão induzida pelo pentilenotetrazol (PTZ) no zebrafish adulto, assim como Baraban et al, 2005, que fez o registro em larvas do peixe. Nas duas situações, o pentilenotetrazol (PTZ) induziu descargas epileptiformes de alta amplitude e frequência (4 – 7 Hz), semelhantes aos achados de EEG ictal de humanos e roedores. Sendo tais registros distintos da atividade basal

do peixe que é marcada por baixa amplitude sinusoidal em frequência delta (3-4 Hz) e livre de eventos epileptiformes.

Os registros eletroencefalográficos do extrato etanólico de *Spilanthes acmella* também se mostraram similares ao do pentilenotetrazol (PTZ), com ocorrência de descargas epileptiformes.

Pode-se concluir então, com tais evidências comportamentais e eletrofisiológicas, que o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* evidenciou um padrão convulsionante no zebrafish.

Além disso, os experimentos iniciais de submissão do zebrafish a diferentes concentrações do extrato sugeriram uma proximidade entre sua dose efetiva e a dose letal, pois a menor concentração que causou alteração comportamental do peixe também levou um percentual deles à morte.

A pesquisa de Moreira et al, 1989, corrobora com esse dado, pois em sua pesquisa as doses efetivas medianas (DE50) para as crises generalizadas foram muito próximas ou iguais às doses letais (DL50).

Os achados referentes à eletromiografia não apresentaram grande significância, porém, foram importantes para traçar uma correlação entre os resultados eletrofisiológicos e comportamental, que apontaram para uma progressão paralela e inter-relacionada entre tais eventos. O que demonstra que os achados não foram arbitrários.

12 CONCLUSÕES

O extrato etanólico de *Spilanthes acmella* mostrou ser um potente ictiotóxico e indutor de excitabilidade central no zebrafish, o que foi constatado a partir das mudanças de padrões de atividade elétrica vistas no eletroencefalograma do animal submetido à droga e através do aumento da atividade encefálica visto no espectograma. E o aparecimento de alterações eletroencefalográficas foi perceptível em pequenas doses e em um curto intervalo de tempo, o que aponta para uma alta susceptibilidade do peixe ao extrato.

Além das alterações eletroencefalográficas, o extrato também causou alterações, em menor escala, nos traçados eletromiográficos do zebrafish submetido à mesma concentração da droga. Houve o aparecimento de contrações musculares esparsas e de mioclonias breves. O que remonta a um efeito do extrato de jambú ao nível de sistema nervoso periférico também.

Em relação às alterações comportamentais, foi possível notar o aparecimento de 3 estágios de comportamento, que se iniciam com o aumento da excitabilidade do animal e culminam com clônus, perda da postura e morte do peixe. Com isso, os achados comportamentais serviram para corroborar com os achados eletrofisiológicos de que o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* atua como potente droga com ação no sistema nervoso do zebrafish, com atividade convulsivante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1998. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. Annual Book of ASTM Standards. Water and Environmental Technology. Section 11. E 729-96 : 218-238

BARABAN, S.C. et al. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience*, v. 131 p. 759-768, 2005.

BARABAN, S.C.; MATTHEW T. DINDAY, M. T.; CASTRO, P. A.; CHEGE, S.; MICHEL, R. T. A Large-scale Mutagenesis Screen to Identify Seizure-resistant Zebrafish. ***Epilepsia***, Vol. 48, No. 6, 2007.

BARBAZUK WB, KORF I, KADAVI C, HEYEN J, TATE S, WUN E. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10:1351-1358.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J.A. Fundamentos da Toxicologia. São Paulo: Atheneu, p. 59-70, 2008.

BEAR, M. Neurociências – Desvendando o sistema nervoso. ARTMED. 2008.

BILOTTA, J.O.; et al. “Ethanol exposure alters zebrafish development: A novel model of fetal alcohol syndrome”. *Neurotoxicology and Teratology*, Vol.26, no.6. 2004.

BOONEN, J.; et al. **Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthal (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts.** *Journal of Ethnopharmacology*, 2009.

BORGES, Luciana da Silva. **Biomassa, teores de nutrientes, espilantol e atividade antioxidante em plantas de Jambu (*Acmellaciliata*Kunth) sob adubações mineral e orgânica** / Luciana da Silva Borges. – Botucatu: [s.n.], 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde). Disponível em <http://www.saude.gov.br/bvs>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Testos Básicos de Saúde). Disponível em <http://www.saude.gov.br/bvs>.

CALIXTO, JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in CARVALHO, L. C. N.; et al. **Estudo de caracteres morfoanatômicos da folha de *Serjaniapaucidentata*DC., Sapindaceae**. IV Encontro Amazônico de Agrárias 26 a 31 de Março de 2012. Universidade Federal Rural da Amazônia.

CAVALCANTI, V. M. S. Extração de espilantol de *Spilanthesacmellavar oleracea*ecom dióxido de carbono supercrítico. **Tese (Doutorado em Química)**- Universidade Estadual de Campinas, 2008.

CHASIN, A A M.; PEDROZO, M.F.M. O estudo da toxicologia. In: AZEVEDO, F.A; CHASIN, A .A .M. (Coord.) As Bases Ecotoxicológicas da Ecotoxicologia. São Paulo: RiMa, 2003. 1-25p.

CHAUVIN, C.; OLIVEIRA, F. DE; RENOT, X.; MOUSSEU, M.; LEVERVE, X.; FONTAINE, E. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *The Journal of Biology Chemistry*, 276 (44): 41394-98, 2001.

ELIZABETSKY, E. Etnofarmacologia Como Ferramenta de Busca de Substâncias Ativas. In: Farmacognosia: Da planta ao medicamento, Simões C.M.O. et al. (Eds), UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2000, pp. 87–100.

FLEMING, L. **Entrevista à Doutora Leonor Fleming - Zebra-Fish.** <http://modelosexperimentais.blogspot.com.br/2010/04/entrevista-doutora-leonor-fleming-zebra.html>

GERLAI, R. Zebra Fish: Na uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics*. V. 33, p. 461-468, 2003.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTHAL. Drinks like a fish: Zebrafish (Daniorerio) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Vol. 4, 2010.

GOUVEIA JR, A., Maximino, C.; BRITO, T.M. **Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências.** Faculdade de Ciências/UNESP. Bauru: SP, 2006.

Grosell M, Wood CM. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 2002;205:1179-1188.

KIMMEL C, WARGA R. cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryos. *Trends Genet.* 1988;5:68-74.

KIMMEL C. Genetics and early development of zebrafish. *Trend Genet.* 1989;5:283-288.
Latin America. A personal view. *J Ethnopharmacol* 100: 131–134, 2005.

LEVIN, Edward D. CERUTTI, Daniel T. Behavioral Neuroscience of Zebrafish. In: BUCCAFUSCO, Jerry. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2ª Edição. Boca Raton-FL: CRC Press; 2009.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(5):353-367.

LIESCHKE, J. G.; CURRIE, C. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **NatureReviewsGenetics**. Vol. 8, 2007.

LIMA, A. S.; GEBAUER, D. L. P.; PAGNUSSAT, N.; LARA, D. R. Avaliação de parâmetros comportamentais induzidos por ansiolíticos em Zebrafish (*Daniorerio*). Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS. **X Salão de Iniciação Científica – PUCRS**, 2009.

LÔBO, L. T. et al. Stilbenes from *Degueliarufescens* var. *urucu* (Ducke) A. M. G. Azevedo Leaves: Effects on seed germination and plant growth. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 1838-1844, 2010.

MASCARO, U. C. P. et al. Valores de DL50 em peixes e no rato tratados com pó de raízes de *Derrisspp* e suas implicações ecotoxicológicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, p. 53-56, 1998.

MATTHIAS, A., CONNELLAN, P., THOMPSON, D., BONE, K.M., LEHMANN, R.P., 2008. Acute immune modulatory effects of bioavailable *Echinacea* alkalamides. *Planta Medica* 74, 1008–1009.

MELO, K.M.; FILHO, J.S.; PIECZARKA, J.JC.; GRISOLIA, C.K.; NAGAMASHI, C.Y. Determinação da CL50 e Toxicidade Aguda da Rotenona em Peixes da Espécie *Poeciliareticulata*. XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. 2012.

MOREIRA, V. M., MAIA, J. G., DE SOUZA, J. M., BARTOLOTO, Z. A., CAVALHEIRO, E. A. Characterization of convulsions induced by a hexanic extract of *Spilanthescamellavar*. *Oleracea* in rats. **Brazilian, J. Med. Biol. Research**, 22 (1): 65 – 67, 1989.

NAGASHIMA, M.; NAKATANI, N. LC-MS analysis and structure determination of pungent alkalamides from *Spilanthescamella* L. flowers. *LebensWiss Technol.* 1992; 25; 417-21.

NAYAK, S. & CHAND, R. Dynamics of spilanthol in plant growth and development. **RevueIndiandrugs**, 2002, vol. 39 no 8, pp 419-421.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Traditional Medicine Strategy 2002–2005. Geneva,WHO/EDM/TRM/2002.1, 2002.

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C. Journal of Ethnopharmacology, v. 25, p. 61-65, 1998.

PINEDA, R., C.E. BEATTIE, AND C.W. HALL, Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylenetetrazole seizures. J NeurosciMethods, 2011.

PINTO, L. C. Neurofisiologia Clínica: Princípios Básicos e Aplicações/ Luiz Carlos Pinto – São Paulo. EditoraAtheneu, 2006.

RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J. Bioactive N-isobutylamides from flower buds of *Sphalantesacmella*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 51, p.729-732,1999.

RANI, S. A.; MURTY, S. U.; Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthescacmella*Linn. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, n. 1, p. 67-68, 2006.

RANI, S. A.; MURTY, S. U.; Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthescacmella*Linn. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, n. 1, p. 67-68, 2006.

RATNASOORIYA, W. D.; Diuretic activity of *Spilanthescacmella*flowers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n.2-3, p .371-320, 2004.

Ratnasooriya, W.D., Pieris, K.P.P., 2005. Attenuation of persistent pain and hyperalgesia by *Spilanthescacmella* flowers in rats. *Pharmaceutical Biology* 43, 614– 619.

RICO, EP; ROSEMBERG, DB; LANGONI, AD; SOUTO, AA; DIAS, RD; BOGO, MR; BONAN, CD; SOUZA, DO. 2011. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. *Neurotoxicology*. Dói: 10.1016/j. neuro. 2011.05.010.

RIOS, M.Y., AGUILAR-GUADARRAMA, A.B., GUTIERREZ, M.D., 2007. Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology* 110, 364–367.

ROSA, I. G. *Detecção automática de contração muscular utilizando a eletromiografia de superfície*. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SANTOS, Daniele Silva dos, 2010. **Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para determinação de espilantol em *Spilanthes acmella* (L.) Murray** / Daniela Silva dos Santos, 2010.

SCHENKEL, E.P., ZANNIN, M., MENTZ L.A., BORDIGNON, S.A.L., IRGANG, B. 2001. Plantas tóxicas. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/EDUFSC, 2001, p.755-788

SCHNEIDER, A. C. R.; SANTOS, J. L.; PORAWSKI, M.; SCHAEFER, P.G.; MAURER, R. L.; MATTE, U.; SILVEIRA, T. R. Implementação de um novo modelo de experimentação animal – zebrafish. **Rev. HCPA** 2009; 29(2): 100-103.

SINGER, T.P.; RAMSAY R.R. The reaction site of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1187: 198-202. 1994.

TIMBÓ: **aspectos botânicos e moléculas bioativas**/ editores técnicos, Antônio Pedro da Silva Souza Filho, José Luiz Martins do Nascimento. – Brasília, DF: Embrapa, 2012. 112 p.: il.; 14 cm x 21 cm.

TOZZI, A. M. G. A. A identidade do Timbó Verdadeiro: *Degueliautilia* (A. C. Sm.) A. M. G. Azevedo (Leguminosae: Papilionoideae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 58, p. 511-516, 1998.

VAROLI, F.M.F.; BERNARDI, M.M.; PANZA, A.B.; CHIMINAZZO, C.C. Avaliação dos efeitos neurotóxicos da deltametrina, um piretróide, em peixes. 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. and MACIEL, M. A. M.. **Plantas medicinais: cura segura?**.*Quím. Nova* [online]. 2005, vol.28, n.3, pp. 519-528.ISSN 0100-4042.

VENTURINI, F.P. Efeitos da exposição a um pesticida piretróide na performance natatória e em comportamentos olfatórios em peixes. 2013.

WARD, G. S. & PARRISH, P. R., 1980. Evaluation of early life stages toxicity tests with embryos and juveniles of sheepshead minnows. In: Eaton, J.G., P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (Ed.). *Aquatic Toxicology*, ASTM STP 707, American Society for Testing and Materials: 143-247.

WEBSTER J. G. ***Biomedical Instrumentation***.3 ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1978.

WEBSTER J. G. ***Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation***.3 ed. Nova Iorque: John Wiley& Sons, 1988.

WONGSAWATKUL O, PRACHAYASITTIKUL S, ISARANKURA-NA-AYUDHYA C, SATAYAVIVAD J, RUCHIRAWAT S, PRACHAYASITTIKUL V. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. *Int J MolSci*2008;9:2724-44.