

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXTRATOS DE *BACCHARIS* (*B. dracunculifolia*), ÓLEO
VEGETAL DE CAJU (*Anacardium occidentale*) E ÓLEO
ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) NA
DIETA DE ZEBRAFISH: TOXICIDADE E CRESCIMENTO
ANIMAL

Autor: Tatiane Rogelio Ramos
Orientador: Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXTRATOS DE *BACCHARIS* (*B. dracunculifolia*), ÓLEOS
VEGETAL DE CAJU (*Anacardium occidentale*) E ÓLEO
ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) NA
DIETA DE ZEBRAFISH: TOXICIDADE E CRESCIMENTO
ANIMAL

Autor: Tatiane Rogelio Ramos
Orientador: Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado

“Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal”

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Ramos, Tatiane Rogelio

R176e Extratos de baccharis (b. Dracunculifolia), óleos vegetal de caju (anacardium occidentale) e óleo essencial de cravo-da-índia (syzygium aromaticum) na dieta de zebrafish: toxicidade e crescimento animal/ Tatiane Rogelio Ramos. -- Maringá, 2019.

58 f. : il., color., figs. , tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2019.

1. Compostos bioativos. 2. extratos naturais. 3. crescimento animal. I. Prado, Ivanor Nunes do, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ED.636.2085
Jane Lessa Monção CRB9 1173



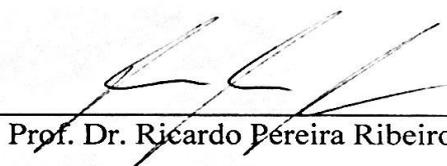
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXTRATOS DE *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA*, ÓLEO
VEGETAL DE CAJU (*ANACARDIUM OCCIDENTALE*) E
ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA (*SYZYGIUM
AROMATICUM*) NA DIETA DE ZEBRAFISH: CRESCIMENTO
ANIMAL E TOXICIDADE

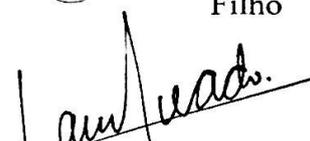
Autora: Tatiane Rogelio Ramos
Orientador: Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 19 de fevereiro de 2019.


Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro


Prof. Dr. Benício Alves de Abreu
Filho


Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado
Orientador

“A fé na vitória tem que ser inabalável!”

O rappa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida e por estar ao meu lado me iluminando, me guiando e me capacitando em todos os momentos.

A minha mãe Deolinda Rogelio, por ser o meu refúgio e fortaleza, por me apoiar e me aconselhar em minha caminhada.

Aos meus irmãos Rafaela Cristina Rogelio Ramos e Thiago Rogelio Ramos, por serem meus exemplos.

Ao meu namorado e amigo Kennyson Alves de Souza, por estar ao meu lado nos momentos difíceis me apoiando e aconselhando.

À Universidade Estadual de Maringá, professores e funcionários, pelo suporte necessário em todos os momentos necessitados.

Ao professor Dr. Ivanor Nunes do Prado, por aceitar me orientar, pelos ensinamentos a mim transmitidos e paciência nos momentos difíceis.

Aos professores Dr. Benício Alves de Abreu Filho e Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos e por estarem abertos a me ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a empresa Safeeds Nutrição Animal (Paraná, Brazil) pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

Aos amigos conquistados no Grupo de Pesquisa em Produção de Bovinos de Corte Qualidade de Carne, por me apoiarem e me inspirarem a seguir a carreira acadêmica: Ana Carolina Vital, Amanda Teixeira, Camila Barbosa, Camila Mottin, Carlos Eiras, Edineia Bonin, Emilia Kempinski, Fernando Zawadski, Gustavo Gonçalves, Juliana Torrecilhas, Maikon Barbosa, Mariana Garcia Ornaghi, Maribel Valero, Raquel Rossato e Rodrigo Cortez Passetti.

Aos amigos conquistados no período de graduação e que seguiram para a pós-graduação, que estiveram ao meu lado me apoiando e ajudando a conquistar meus objetivos: Amanda Poppi, Jaísa Casetta, Luiz Fernando, Vanessa Lewandowski e Vinicius Vieira.

BIOGRAFIA

Tatiane Rogelio Ramos, Filha de Deolinda Rogelio e Oscar Vidal Ramos, nasceu no município de Maringá, Estado do Paraná, Brasil, no dia 06 de maio de 1993.

Em fevereiro de 2012 iniciou-se o curso de Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá, Estado do Paraná, Brasil. Concluindo o mesmo em março de 2017, onde recebeu o título de Zootecnista.

Em março de 2017 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá, Estado do Paraná, Brasil. Em fevereiro de 2019 submeteu-se a banca examinadora afim de receber o título de Mestre em Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
I – INTRODUÇÃO.....	1
Referências.....	14
II – OBJETIVOS GERAIS.....	24
III – Análise de toxicidade de extrato hidro alcoólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> utilizando larvas de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo.....	25
Resumo.....	25
Palavra-chave.....	25
Abstract.....	25
Keyword.....	26
Introdução.....	26
Material e métodos.....	27
Resultados.....	28
Discussão.....	29
Conclusão.....	30
Agradecimentos.....	30
Referências bibliográficas.....	30
IV – Desempenho animal e atividades antioxidantes das rações e do músculo de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados com adição de <i>Baccharis dracunculifolia</i> ,	

óleo vegetal de caju (<i>Anacardium occidentale L</i>) e óleo essencial de cravo-da-Índia (<i>Caryophyllus aromaticus L</i>).....	37
Resumo.....	37
Palavra-chave.....	38
Abstract.....	38
Keyword.....	39
Introdução.....	39
Material e métodos	41
Resultados.....	46
Discussão.....	50
Conclusão.....	52
Agradecimentos.....	52
Referências bibliográficas.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
III -	
Análise de toxicidade de extrato hidro alcoólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> utilizando larvas de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo.....	25
Tabela 1. Análise de toxicidade de extrato de <i>B. dracunculifolia</i> em sete diferentes diluições (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1280 g/mL de H ₂ O) em três tempos de observações (0, 1 e 2 horas).....	33
Tabela 2. Análise de toxicidade de extrato de <i>B. dracunculifolia</i> em quatro diferentes diluições (1/500, 1/1000, 1/2500 e 1/5000 g/mL de H ₂ O) em quatro tempos de observações (0, 4, 8 e 12 horas).....	34
IV -	
Desempenho animal e atividades antioxidantes das rações e do músculo de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados com adição de <i>Baccharis dracunculifolia</i>, óleo vegetal de caju (<i>Anacardium occidentale L</i>) e óleo essencial de cravo-da-Índia (<i>Caryophyllus aromaticus L</i>).....	36
Tabela 1. Composição de misturas com compostos naturais (extrato de <i>Baccharis dracunculifolia</i> , óleo vegetal da castanha de caju e óleo essencial da folha do Cravo-da-Índia.....	43
Tabela 2. Formulação da dieta base utilizada no estudo.....	44
Tabela 3. Parâmetros de qualidade da água dos aquários de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados com adição de compostos naturais na dieta.....	46

Tabela 4.	Desempenho produtivo de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados com adição de compostos naturais na dieta.....	47
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
I - INTRODUÇÃO.....	1
Figura 1. Exemplo de compostos químicos dos óleos essenciais: 1. Monoterpenos, 2. Sesquiterpenos, 3. Fenipropanóides. Adaptado de Calsamiglia <i>et al.</i> , (2007).....	3
Figura 2. Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana (Burt 2004).....	7
Figura 3. <i>Baccharis dracunculifolia</i> e fonte de alimentos para abelhas.....	8
Figura 4. Cajueiro e frutos do caju (<i>Anacardium occidentale</i>).....	9
Figura 5. Estrutura química dos principais compostos presentes nos óleos do <i>Anacardium occidentale</i> . Fonte: Mazzetto et al., (2009).....	10
Figura 6. Cravo-da-Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	11
Figura 7. Peixe Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) e sua anatomia.....	12
III - Análise de toxicidade de extrato hidro alcoólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> utilizando larvas de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo.....	25
Figura 1. Fotos de larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) expostas em sete diferentes diluições (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1280 g / mL de H ₂ O) de extratos aquoso de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e três tempos de observação (0, 1 e 2 horas).....	35
Figura 2. Fotos de larvas de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) expostas em quatro diferentes diluições (1/500, 1/1000, 1/2500 e 1/5000 g / mL de H ₂ O) de extratos aquoso de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e quatro tempos de observações (0, 4, 8 e 12 horas).....	36

IV -	Desempenho animal e atividades antioxidantes das rações e do músculo de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados com adição de <i>Baccharis dracunculifolia</i>, óleo vegetal de caju (<i>Anacardium occidentale L</i>) e óleo essencial de cravo-da-Índia (<i>Caryophyllus aromaticus L.</i>).....	37
Figura 1.	Atividade antioxidante dos radicais livres DPPH e ABTS na ração de zebrafish com adição de compostos naturais.....	48
Figura 2.	Atividade antioxidante dos radicais livres DPPH e ABTS do músculo de zebrafish alimentados com dietas com adição de compostos naturais.....	49

RESUMO

Os aditivos sintéticos, tais como, hidroxianisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato, tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e ácido benzoico são amplamente utilizados na indústria alimentícia, bem como em dietas para animais por apresentarem atividade antioxidantes e antimicrobiana. Alguns desses aditivos, por exemplo o ácido benzoico, também podem ser usados em rações animal como potenciador zootécnico. No entanto, nos últimos anos, a utilização desses compostos sintéticos vem sendo restrita, por possíveis efeitos carcinogênicos, havendo aumento considerável na descoberta de compostos naturais com atividade antioxidante e antimicrobiana para uso em alimentos ou dieta animal, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos. Por meio dos estudos realizados, os objetivos desta pesquisa foram testar compostos bioativos de origem natural, tais como de extrato de *Baccharis dracunculifolia* e seu efeito de toxicidade em larva de Zebrafish (*Danio rerio*) e a associação em diferentes níveis com óleo vegetal da castanha do caju (*Anacardium occidentale*) e óleo essencial da folha do cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) sob o desempenho produtivo, efeitos antioxidantes na ração e no músculo de peixes Zebrafish. No primeiro estudo foi testado o efeito tóxico de diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico da planta *Baccharis dracunculifolia* a partir de dois ensaios realizados, utilizando como modelo de análise de toxicidade, larvas de Zebrafish de oito dias pós-fecundação. No primeiro ensaio foram testadas, como tratamentos, as diluições 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1280 g/mL de H₂O e observações em 0, 1 e 2 horas das larvas expostas ao extrato. No segundo ensaio foram testadas, como tratamento, as diluições 1/500, 1/1000, 1/2500 e 1/5000 g/mL de H₂O e observações de exposição das larvas ao extrato em 0, 4, 8 e 12 horas. A partir do desenvolvimento dos dois ensaios pode-se constatar que, quando as larvas foram expostas aos extratos de *B. dracunculifolia* com diluições de inferiores a 1/500 g/mL, foi obtido 100 % de mortalidade logo de imediato ao contato com extrato. A exposição de larvas de Zebrafish com

oito dias pós-fecundação nos diferentes níveis de diluição do extrato aquoso de *B. dracunculifolia*, proposto no presente estudo, demonstraram efeito tóxicos. No entanto, quando testadas as diluições a partir de 1/2500 g/mL obteve-se baixa porcentagem de mortalidade, não apresentando efeitos nocivos às larvas. No segundo estudo, avaliou-se o desempenho produtivo e os efeitos antioxidantes no músculo de peixes Zebrafish alimentados com adição de diferentes níveis do extrato de *Baccharis dracunculifolia*, óleo vegetal da castanha do caju e óleo essencial da folha do cravo-da-Índia na dieta. Os tratamentos foram Controle (CON), sem adição de compostos naturais; Controle Positivo (CON+), com adição de 50 g/kg de ração de BHT; MIX1, adição de 50 g/kg de ração de mistura com 60% de *B. dracunculifolia* + 39% óleo vegetal da castanha do caju + 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia; MIX2, adição de 50 g/kg de ração de mistura com 70% de *B. dracunculifolia*, 29% óleo vegetal da castanha do caju, 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia; MIX3, adição de 50 g / kg de ração de mistura com 90% de *B. dracunculifolia* + 9% óleo vegetal da castanha do caju + 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia e MIX4, adição de 50 g/kg de ração de mistura com 99% de *B. dracunculifolia* + 0,9% óleo vegetal da castanha do caju + 0,1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia. Não foi observado diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos para as medidas de pH, condutividade específica da água e sólidos dissolvidos totais, exceto para quantidade de oxigênio dissolvido. O peso vivo inicial e final foram alterados ($P < 0,05$) pela adição de compostos naturais, mas o ganho médio diário foi menor para o MIX3. Para as análises de atividades antioxidantes das rações não houve efeito ($P > 0,05$) entre os tratamentos para o teste de DPPH, mas com o método de ABTS, os tratamentos CON e CON+ apresentaram menores ($P < 0,05$) atividades antioxidantes. O tratamento CON+ apresentou a melhor ação antioxidante no músculo do peixe para o sequestro de radical livre DPPH, seguido pelo o tratamento o MIX4 (57,4%) e CON (55,2%). Pelo método de sequestro de radical livre ABTS, os tratamentos MIX2 e MIX4 apresentaram a melhor ação antioxidante (com 63,6 e 65,5%) de sequestro de radical livre. Em conclusão, extratos de *B. dracunculifolia*, óleo vegetal da castanha do caju e óleo essencial da folha do cravo-da-índia poderiam ser incorporados às dietas de Zebrafish para melhorar o poder antioxidante das dietas e do músculo dos peixes.

Palavras-chave: Compostos bioativos; extratos naturais; crescimento animal

ABSTRACT

Synthetic additives such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate, tert-butylhydroquinone (TBHQ) and benzoic acid are widely used in the food industry as well as in animal diets because they have antioxidant activity and antimicrobial. Some of these additives, for example benzoic acid, can also be used in animal feeds as a zootechnical enhancer. However, in recent years, the use of these synthetic compounds has been restricted due to possible carcinogenic effects. There has been a considerable increase in the discovery of natural compounds with antioxidant and antimicrobial activity for use in food or animal diet, with the aim of replacing synthetic antioxidants. The objective of this research was to test bioactive compounds of natural origin, such as *Baccharis dracunculifolia* extract and its toxicity effect on Zebrafish larvae (*Danio rerio*) and the association at different levels with the Brazilian nut oil cashew (*Anacardium occidentale*) and leaf clove essential oil (*Syzygium aromaticum*) under productive performance, antioxidant effects on Zebrafish fish feed and muscle. In the first study the toxic effect of different concentrations of hydroalcoholic extract of the *Baccharis dracunculifolia* plant was tested from two experiments using Zebrafish larvae of eight days post-fertilization as the toxicity analysis model. In the first assay, dilutions 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 and 1/1280 g / mL H₂O were tested as treatments, and observations at 0, 1, 2 hours of the larvae exposed to the extract. In the second assay, the dilutions 1/500, 1/1000, 1/2500 and 1/5000 g / mL of H₂O and exposure of larvae to the extract at 0, 04, 08 and 12 hours were tested as a treatment. From the development of the two tests it can be seen that, when the larvae were exposed to extracts of *B. dracunculifolia* with dilutions of less than 1/500 g / mL, 100% mortality was obtained immediately upon contact with extract. The exposure of Zebrafish larvae to eight days after fertilization at the different dilution levels of the aqueous extract of *B. dracunculifolia*, proposed in the present study, showed toxic effects. However, when dilutions were tested from 1/2500 g / mL, a low percentage of mortality

was obtained, with no harmful effects to the larvae. In the second study, the productive performance and antioxidant effects in the Zebrafish fish muscle fed with different levels of the extract of *Baccharis dracunculifolia*, cashew nut oil and leaf clove essential oil in the diet. The treatments were Control (CON), without addition of natural compounds; Positive Control (CON +), with addition of 50 g / kg of BHT ration; MIX1, addition of 50 g / kg mix ration with 60% *B. dracunculifolia* + 39% cashew nut vegetable oil + 1% clove leaf essential oil; MIX2, addition of 50 g / kg of mixing ration with 70% of *B. dracunculifolia*, 29% cashew vegetable oil, 1% clove leaf essential oil; MIX3, addition of 50 g / kg of mixing ration with 90% of *B. dracunculifolia* + 9% cashew vegetable oil + 1% clove leaf essential oil and MIX4, addition of 50 g / kg of mixing ration with 99% of *B. dracunculifolia* + 0.9% cashew nut vegetable oil + 0.1% clove leaf essential oil. No difference ($P > 0.05$) was observed between the treatments for pH, water specific conductivity and total dissolved solids, except for the amount of dissolved oxygen. Initial and final live weight were altered ($P < 0.05$) by the addition of natural compounds, but the mean daily gain was lower for MIX3. No effect ($P > 0.05$) was observed for the analyzes of antioxidant activities of the diets, but with the ABTS method, the CON and CON + treatments showed lower ($P < 0.05$) antioxidant activities. CON + treatment presented the best antioxidant action in the fish muscle for free radical sequestration DPPH, followed by treatment with MIX4 (57.4%) and CON (55.2%). By the ABTS free radical sequestration method, the MIX2 and MIX4 treatments presented the best antioxidant action (with 63.6 and 65.5%) of free radical sequestration. In conclusion, extracts of *B. dracunculifolia*, cashew nut vegetable oil and clove leaf essential oil could be incorporated into Zebrafish diets to improve the antioxidant power of fish diets and muscle.

Keywords: Bioactive compounds; natural extracts; growth

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

I. INTRODUÇÃO

O uso de antioxidantes na alimentação humana e animal teve início no final da década 40, a partir da utilização de antioxidantes fenólicos sintéticos desenvolvidos para proteção de petróleo (Nieva-Echevarría *et al.*, 2015), com a descoberta do hidroxianisole butilado (BHA) com ação eficaz como antioxidante em alimentos gordurosos. Anteriormente, vários ésteres alquílicos (incluindo n-propil) de ácido gálico foram investigados e aprovados para uso na alimentação em vários países. Em meados de 1954, teve início ampla utilização do hidroxitolueno butilado (BHT) nos Estados Unidos, juntamente com os antioxidantes alimentares anteriormente disponíveis, como BHA e o propil galato. Em 1972, deu-se início à comercialização do tert-butil-hidroquinona (TBHQ) como um antioxidante de qualidade na alimentação (Maziero *et al.*, 2001). Esses antioxidantes sintéticos foram e são amplamente utilizados na indústria alimentícia, bem como em dietas para animais (Fasseas *et al.*, 2008). Além da atividade antioxidante, os compostos fenólicos sintéticos (BHA, BHT, propil galato e TBHQ) também apresentam atividade antimicrobiana. Essa atividade, aparentemente, depende da presença de um grupo hidroxila na molécula, da solubilidade lipídica do composto e do grau de resistência estérica. Além disso, estudos apontam que o mecanismo de ação desses compostos sintéticos afetam a função e composição da membrana celular, sendo a síntese de DNA, síntese de RNA, síntese de proteína, síntese de lipídio e a função da mitocôndria bacteriana (Raccach 1984; Collins & Charles 1987).

No entanto, nos últimos anos, houve aumento considerável na descoberta de compostos naturais com atividade antioxidante e antimicrobiana para uso em alimentos ou em materiais medicinais, com o intuito de substituição aos antioxidantes sintéticos, que estão sendo restringidos, pelos seus efeitos carcinogênicos (Ito *et al.*, 1983; Zheng & Wang 2001).

Compostos naturais bioativos

39

40 Um composto pode ser considerado biologicamente ativo quando exerce uma ação
41 específica sobre um determinado ser vivo, seja ele animal, vegetal ou microrganismo. Muitos
42 compostos orgânicos de origem vegetal são considerados bioativos por apresentarem ação
43 tranquilizante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, antimicrobiana, antiviral, fungicida,
44 inseticida, entre outras ações (Pletsch 1998).

45 Os compostos bioativos têm origem a partir do metabolismo secundário de plantas e
46 estão presentes nos óleos essenciais (OEs), óleos vegetais (OVs) e outros tipos de extratos,
47 podendo ser obtidos de várias partes de uma planta, incluindo folhas, flores, sementes, raízes e
48 cascas (Benchaar *et al.*, 2008). São compostos hidrofóbicos, com densidade inferior à da água
49 e solúveis em solventes orgânicos (Calo *et al.*, 2015). Os óleos essenciais podem ser obtidos
50 por diferentes técnicas, como hidro destilação, arraste a vapor d'água, pressão à frio e extração
51 utilizando solvente orgânico (El Asbahani *et al.*, 2015; Stratakos & Koidis 2016). Esses extratos
52 apresentam de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo caracterizados por dois
53 ou três compostos em concentrações mais elevadas. No entanto, o composto em maior
54 concentração determina as propriedades biológicas dos OEs (Bakkali *et al.*, 2008).

55

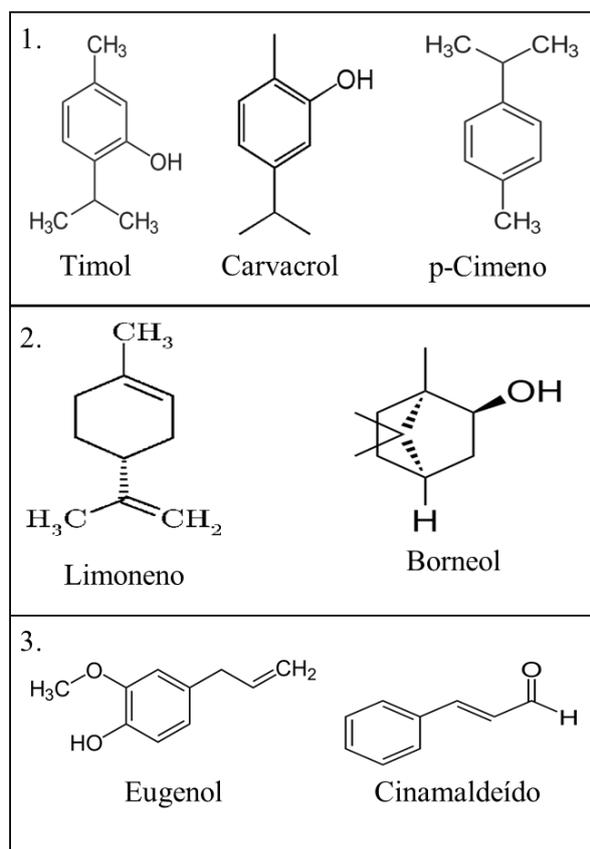
56 ***Definição e caracterização de óleos essenciais***

57 Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos das frações voláteis das
58 plantas por destilação a vapor (Gershenzon & Croteau 1991; El Asbahani *et al.*, 2015; Stratakos
59 & Koidis 2016). O termo "essencial" deriva da palavra "essência", o que significa cheiro ou
60 gosto. Este termo está relacionado com as propriedades destas substâncias pelos sabores e
61 odores característicos das plantas (Stratakos & Koidis 2016). De acordo com a 17ª Edição da
62 Farmacopeia Europeia, os OEs são definidos como: “produtos odorantes, geralmente de
63 composição complexa, obtidos a partir de material natural de plantas, tanto por vapor de água,
64 tanto por destilação a seco ou por método mecânico adequado sem aquecimento. O OE é
65 normalmente separado da fase aquosa por métodos que não possibilita variações significativas
66 na sua composição química”.

67 Os OEs são caracterizados por uma composição muito complexa, de natureza e
68 atividades diferentes (Calsamiglia *et al.*, 2007). Os compostos dos óleos essenciais estão
69 caracterizados em dois principais grupos químicos: terpenóides (monoterpenóides e
70 sesquiterpenóides) e fenilpropanóides (Calsamiglia *et al.*, 2007). Estes grupos são originários
71 de dois diferentes precursores do metabolismo primário e são sintetizados por via metabólica

72 diferentes (Figura 1). Os OEs são sintetizados em diferentes órgãos das plantas como
 73 metabólitos secundários como, por exemplo, flores (jasmim, rosa, violeta e lavanda), ervas e
 74 brotos (cravo), folhas (timol, eucaliptos, salvia), frutos (aniz), casca (*citrus*), sementes (uvas,
 75 caju), e rizomas e raízes (gengibre). Entre todas as espécies de plantas, somente 10% contém
 76 OEs e são chamadas plantas aromáticas (entre 17.000 espécies de plantas distribuídas em todo
 77 o planeta) (Svoboda & Greenaway 2003).

78 Terpenoides é o mais numeroso e diversificado grupo de metabólitos secundários das
 79 plantas (Calsamiglia *et al.*, 2007). Na realidade, mais de 15.000 compostos diferentes estão
 80 descritos na literatura (Gershenson & Croteau 1991). Estes compostos são caracterizados como
 81 derivados de uma estrutura básica de cinco átomos de carbono (C_5H_8), normalmente chamado
 82 de unidade de isopreno e são classificados de acordo com o número destas unidades no seu
 83 esqueleto. Dentre os terpenoides, os componentes mais importantes os óleos essenciais da
 84 maioria das plantas pertencem à família dos monoterpenos e sesquiterpenos (Gershenson &
 85 Croteau 1991).



86

87 **Figura 1.** Exemplo de compostos químicos dos óleos essenciais: 1. Monoterpenos, 2. Sesquiterpenos, 3.
 88 Fenilpropanóides. Adaptado de Calsamiglia *et al.*, (2007)

89 Fenilpropanóides são os compostos mais raros; mas algumas plantas apresentam esses
 90 em proporções significativas. O termo "fenilpropanóide" refere-se aos compostos com uma

91 cadeia de três átomos de carbono ligado ao anel aromático de seis carbonos. Os
92 fenilpropanóides são originários, principalmente a da fenilalanina (um AA aromático),
93 sintetizado via chiquimato que é funcional apenas em microrganismos e plantas (Sangwan *et*
94 *al.*, 2001).

95

96 ***Atividades dos óleos essenciais***

97 Os OEs têm uma ampla variedade de atividades sobre a saúde, incluindo efeitos
98 positivos sobre as doenças cardiovasculares, alguns tumores, os processos inflamatórios, e em
99 geral, doenças nas quais ocorre uma proliferação descontrolada de radicais livres (Harborne
100 1999; Reddy *et al.*, 2003; Trouillas *et al.*, 2003). Estas propriedades dependem de sua
101 capacidade evitar a formação de radicais livres, inibirem a peroxidação dos lipídeos nas
102 membranas, quelatar os metais e estimular a atividade antioxidante das enzimas (Gutiérrez *et*
103 *al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003). Contudo, as atividades mais importantes destes compostos são como
104 antissépticas e antibióticos. As propriedades antissépticas de muitas plantas são conhecidas
105 desde a antiguidade. Os chineses, por exemplo, começaram a usar plantas medicinais em
106 terapias 5.000 anos atrás (3.000 AC), os egípcios usavam plantas para a conservação de
107 alimentos e em cerimônias de mumificação (Davidson & Naidu 2000). No entanto, a primeira
108 prova científica descrevendo suas propriedades antimicrobianas apareceu no início do século
109 20 (Hoffmann & Evans 1911). Desde então, muitos compostos essenciais de petróleo com fortes
110 atividades antimicrobianas foram estudados (Burt 2004). Terpenóides e fenilpropanóides
111 desenvolvem suas ações contra bactérias interagindo com as membranas celulares (Griffin *et*
112 *al.*, 1999; Davidson & Naidu 2000; Dorman & Deans 2000). Pelo menos parte desta atividade
113 é devido à natureza hidrofóbica dos hidrocarbonetos, o que lhes permite interagir com a
114 membrana das células e se acumular na bicamada lipídica das bactérias, ocupando um espaço
115 entre as cadeias dos ácidos graxos (Ultee *et al.*, 1999). Esta interação provoca alterações na
116 conformação nas estruturas das membranas, celulares resultando em sua permeabilidade e
117 expansão (Griffin *et al.*, 1999).

118 Na maioria dos casos, as bactérias podem ser tolerantes estes efeitos por meio de bombas
119 iônicas e não ocorre a morte celular, mas grandes quantidades de energia são desviadas para
120 esta função e o crescimento bacteriano é retardado (Griffin *et al.*, 1999; Ultee *et al.*, 1999; Cox
121 *et al.*, 2001).

122

123 ***Ação antioxidante***

124 Antioxidantes são compostos ou sistemas que retardam a oxidação inibindo a formação
 125 de espécies reativas ao oxigênio (EROs) ou interrompendo a propagação das EROs por um ou
 126 mais mecanismos, como por exemplo:

- 127 - Espécies sequestradoras que iniciam a peroxidação;
- 128 - Quelatando íons metálicos, que são incapazes de gerar espécies reativas ou decompor
 129 peróxidos lipídicos;
- 130 - Extinguir o O_2^- prevenindo a formação de peróxidos;
- 131 - Quebrar a reação em cadeia auto-oxidativa;
- 132 - Reduzir concentrações localizadas de O_2 .

133 As EROs, responsáveis pela oxidação, incluem radicais livres como radicais ânions
 134 superóxidos (O_2^-), radical hidroxila (OH^\bullet) e espécies de radicais livres, como H_2O_2 e oxigênio
 135 simples (1O_2), sendo várias formas de oxigênio ativado (Gülçin *et al.*, 2003). As EROs são
 136 eletronicamente instáveis e altamente reativas pois apresentam um elétron não pareado na
 137 última órbita, fazendo com que as mesmas sejam capazes de reagirem com grande número de
 138 moléculas que estejam próximas, gerando uma cascata de reações (Migliore & Coppèdè 2009).

139 A oxidação acontece em três fases, a primeira fase é conhecida como Iniciação (1), onde
 140 se tem a formação de radicais livres a partir da remoção de hidrogênio de um substrato
 141 oxidativo; a segunda fase é conhecida como Propagação (2), acontece a partir da reação do
 142 radical livre com o oxigênio, onde têm a formação de produtos primários da oxidação, atuantes
 143 como propagadores da reação; E por fim, a terceira fase, conhecida como Terminação (3),
 144 consiste na formação de produtos estáveis pela combinação de radicais, ou acontece a
 145 interrupção do processo oxidativo pela presença de moléculas antioxidantes (Shahidi &
 146 Ambigaipalan 2015).

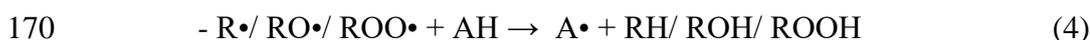


150

151 Os compostos naturais com atividade antioxidante, segundo Brewer (2011), originam-
 152 se devido aos tecidos vegetais estar em estresse oxidativo constante (espécies reativas ao
 153 oxigênio e pro oxidantes) gerados tanto exogenamente, pela presença de calor e luz, quanto
 154 endogenamente com H_2O_2 e metais de transição. Sendo assim, esses tecidos desenvolvem

155 sistemas para controlar os radicais livres, catalisadores de oxidação lipídica, intermediários de
 156 oxidação e produtos de degradação secundária. Esses compostos antioxidantes incluem
 157 flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides e tocoferóis que podem inibir a oxidação induzida
 158 por Fe^{3+} /ácido ascórbico, eliminar os radicais livres e agir como redutores (Zheng & Wang
 159 2001; Brewer 2011; Embuscado 2015).

160 Os compostos fenólicos, classificados como antioxidantes primários são principalmente
 161 radicais livres que atuam atrasando ou inibindo a etapa de iniciação ou interrompem a etapa de
 162 propagação da oxidação lipídica, diminuindo assim a formação de produtos voláteis de
 163 decomposição (por exemplo, aldeídos e cetonas) que causa oxidação nos alimentos. O potencial
 164 antioxidante dos compostos fenólicos está relacionado ao número e disposição dos grupos
 165 hidroxila nas moléculas de interesse. Os antioxidantes fenólicos podem doar átomos de
 166 hidrogênio (AH) a radicais lipídicos e produzir derivados lipídicos e radicais antioxidantes (4),
 167 sendo mais estáveis e menos prontamente disponíveis para promover a auto oxidação. O radical
 168 livre antioxidante pode interferir ainda mais nas reações de propagação (5 e 6) (Shahidi and
 169 Ambigaipalan, 2015).

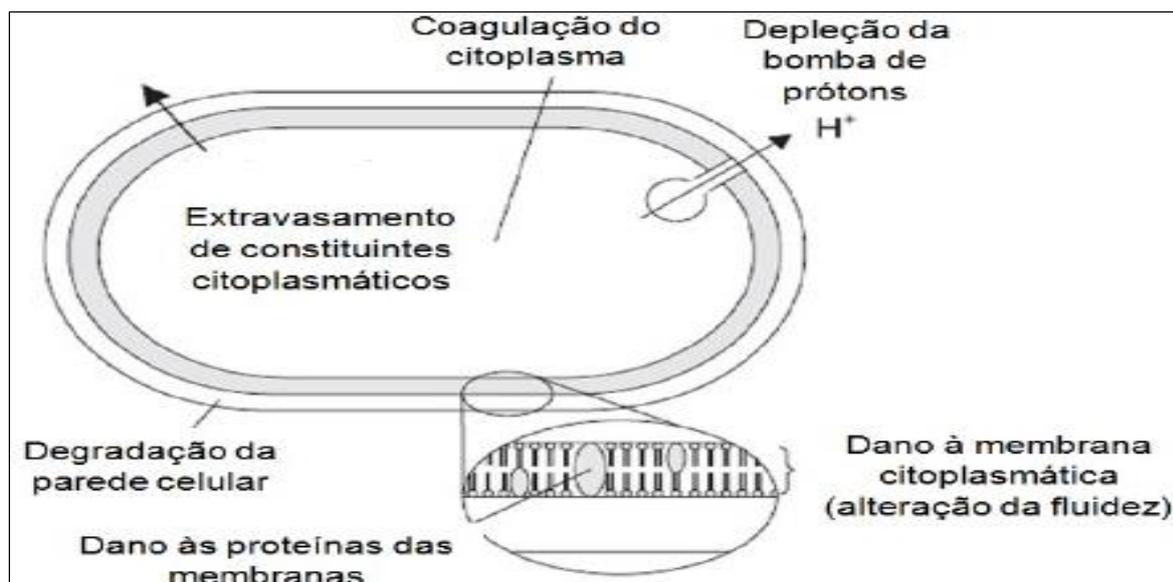


173

174 ***Ação antimicrobiana***

175 Embora as propriedades antimicrobianas dos compostos naturais tenham sido estudadas
 176 no passado, o mecanismo de ação não está detalhado. Esses extratos naturais de plantas contêm
 177 ampla variedade de compostos bioativos com diferentes funções e mecanismos de ação,
 178 podendo atuar de forma específica de acordo com sua estrutura química (Burt 2004).

179 Uma característica importante dos OEs e seus componentes, por exemplo, é a sua
 180 hidrofobicidade, que permite a associação aos lipídios da membrana celular bacteriana e
 181 mitocôndrias, acumulando-se na bicamada lipídica das bactérias. Esta interação pode provocar
 182 alterações na conformação estrutural das membranas celulares, resultando em sua
 183 permeabilidade e expansão (Griffin *et al.*, 1999). A desestruturação da membrana altera a
 184 estabilidade das trocas de íons pela membrana da célula e provoca uma redução no gradiente
 185 de troca iônica na membrana (Figura 2).



186

187 **Figura 2.** Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana (Burt 2004)

188 Também tem sido estudado o efeito dos terpenóides presentes nos extratos naturais, sob
 189 o consumo de oxigênio microbiano e na fosforilação oxidativa. A maioria dos terpenóides
 190 testados apresentaram efeitos em ambos os processos. Em particular, os álcoois fenólicos e não
 191 fenólicos apresentaram efeitos inibitórios mais fortes, seguidos por aldeídos e cetonas. Os
 192 hidrocarbonetos monoterpênicos apresentaram pouca atividade, sugerindo que o grupo OH livre
 193 posicionado pelos álcoois pode ser o responsável pela atividade (Griffin *et al.*, 1999).

194 No entanto, sabe-se que a carbonilação de terpenóides aumenta sua atividade
 195 bacteriostática, mas não necessariamente sua atividade bactericida (Naigre *et al.*, 1996).
 196 Também foi demonstrado que os terpenóides têm um potencial antiséptico diferente,
 197 dependendo de sua solubilidade na água. Entretanto, existem algumas anomalias com
 198 compostos como timol, carvacrol e eugenol, bem como aldeídos aromáticos, especialmente o
 199 cinamaldeído, que são de baixa solubilidade em água, mas altamente antiséptico (Griffin *et al.*,
 200 1999).

201 No caso do OE de alho, muitos de seus compostos não estão em toda a planta, como a
 202 maioria dos compostos de outros OEs, são produzidos a partir tiosulfatos durante o tratamento
 203 com vapor da planta (Pentz & Siegers 1996), podem ser ativos contra uma vasta gama de
 204 bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, parasitas, e vírus (Reuter *et al.*, 1996).
 205 Vários mecanismos de ação têm sido sugeridos para explicar a sua atividade antimicrobiana,
 206 incluindo a inibição da síntese de RNA, DNA, e proteínas da célula (Feldberg *et al.*, 1988). No
 207 entanto, o principal mecanismo antimicrobiano parece estar relacionado à sua capacidade de
 208 interagir com os grupos sulfidrilo (-SH) de outros compostos ativos (Reuter *et al.*, 1996).

209

210 *Baccharis dracunculifolia*

211 *Baccharis* é o maior gênero da família *Compositae*, com mais de 500 espécies
212 distribuídas nos continentes norte e sul americanos (Figura 3). As espécies deste gênero estão
213 distribuídas principalmente nas regiões temperadas e tropicais quentes do Brasil, Argentina,
214 Colômbia, Chile e México (Abad & Bermejo 2007).

215 A *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), nativa do Brasil, popularmente
216 conhecida como “Alecrim do campo” ou “Vassourinha” (Lage *et al.*, 2015). É uma planta
217 arbustiva, de crescimento perene, muito sensível a fatores ambientais, tais como, variação
218 climática e à interação com insetos e predadores, o que pode resultar em uma variação nas rotas
219 biossintéticas, responsáveis pela produção de metabólitos secundários (Sforzin 2007). No
220 entanto, essa espécie é a principal responsável pela origem biológica da própolis verde, cujo
221 nome é dado devido sua coloração (Park *et al.*, 2004).



222
223 **Figura 3.** *Baccharis dracunculifolia* e fonte de alimentos para abelhas

224 Essa espécie de planta tem sido amplamente utilizada na medicina popular na prevenção
225 de disfunções como anemia, inflamação, diabetes, distúrbios hepáticos e próstata (Menezes
226 2005; Verdi *et al.*, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que a espécie *Baccharis*
227 *dracunculifolia* apresentam compostos, como: flavonoides (isosakuranetina, aromadendrin-4'-
228 éter metílico) terpenos (bacarina) e ácidos fenólicos (artepelina C, ácido cafeico, ácido p-
229 cumárico, ácido ferúlico) (Silva Filho *et al.*, 2004; Menezes 2005; Loots *et al.*, 2006; Veiga *et*
230 *al.*, 2017).

231

232 *Óleo da castanha de Caju*

233 O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), pertencente à família Anacardiaceae,
234 originário do Brasil, possui como parte comestível o pseudofruto chamado de caju e o fruto, de

235 onde é extraído a castanha e o líquido da casca da castanha de caju (Figura 4), sendo este último,
236 beneficiado e utilizado de formas variadas na indústria química (Mazzetto *et al.*, 2009).
237 Atualmente, a planta está difundida em diversos países, como a Índia, Nigéria e Vietnã. No
238 Brasil os principais estados produtores de caju são o Ceará, Piauí e o Rio Grande do Norte,
239 participando com mais de 90% da produção, com uma produção nacional prevista para 2013 de
240 261,748 toneladas da castanha (IBGE 2013) e ao redor de 45 mil toneladas de óleo vegetal da
241 castanha de do caju (líquido da casca da castanha - LCC) (Mazzetto *et al.*, 2009).

242



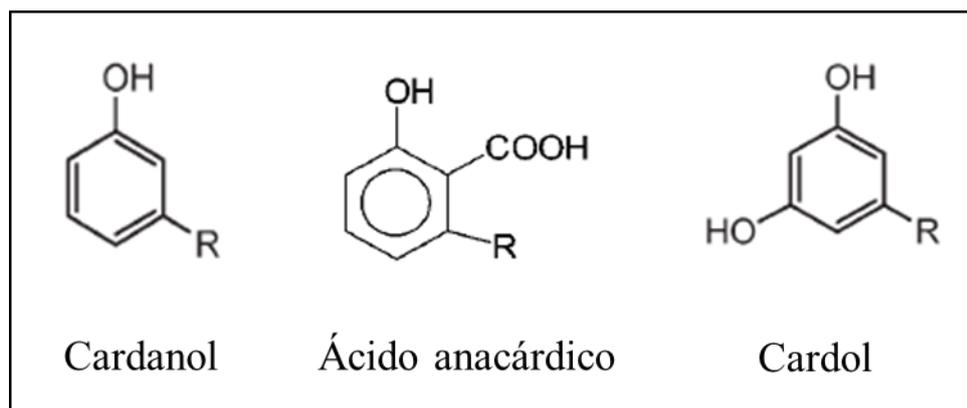
243

244 **Figura 4.** Cajueiro e frutos do caju (*Anacardium occidentale*)

245 O LCC é um líquido escuro obtido do mesocarpo da castanha e representa cerca de 25%
246 do peso da castanha, sendo considerado um subproduto do agronegócio do caju, de baixo valor
247 agregado (Mazzetto *et al.*, 2009), podendo ser utilizado de diversas formas na indústria química
248 (Calo *et al.*, 2007), como lubrificantes e combustíveis (Das *et al.*, 2004). O LCC é rico em
249 compostos fenólicos de cadeia longa e insaturada (Figura 5) (Gedam & Sampathkumaran 1986).
250 As concentrações dos ácidos variam em função do processo de obtenção da castanha (Das *et*
251 *al.*, 2004). A extração do LCC pode ser realizada utilizando técnicas a quente (LCC técnico) ou
252 a frio (LCC natural). O LCC técnico contém principalmente cardanol (67-94%), cardol (3-
253 18%), material polimérico (3-21%), e traços de metilcardol (Gedam & Sampathkumaran 1986).
254 De modo geral, o LLC técnico é obtido com temperaturas elevadas que pode acarretar na
255 alteração da estrutura química dos ácidos graxos pela reação de descarboxilação, originando
256 maiores teores do ácido cardanol (Mazzetto *et al.*, 2009). O LCC natural contém uma grande
257 quantidade de ácido anacárdico (70-80%), cardol (13-20%) e cardanol (1-9%), e não apresenta
258 material polimérico em sua composição (Gedam & Sampathkumaran 1986).

259 Pelo fato do modo de extração das castanhas no Brasil ser realizado de maneira
 260 industrial, o processo térmico-mecânico empregado impõe a obtenção do LCC técnico como
 261 subproduto. O cardanol em comparação aos derivados fenólicos similares apresenta
 262 peculiaridades em suas características, não apresentando cheiro agressivo e possuindo baixa
 263 volatilidade, sendo este composto considerado não tóxico (Mazzetto *et al.*, 2009).

264



265 **Figura 5.** Estrutura química dos principais compostos presentes nos óleos do *Anacardium occidentale*. Fonte:
 266 Mazzetto *et al.*, (2009)
 267

268 O modo de ação dos princípios ativos do óleo de caju não são totalmente esclarecidos.
 269 Todavia, Kubo *et al.*, (2003) evidenciaram a ação do ácido anacárdico atuando primariamente
 270 no desencadeamento da ruptura da membrana física das bactérias e inibição da cadeia
 271 respiratória das bactérias. Segundo Muroi and Kubo (1993), os ácidos anacárdicos possuem
 272 atividade antimicrobiana, principalmente em bactérias Gram-positivas. De acordo com Lima *et*
 273 *al.*, (2000), os ácidos anacárdicos apresentaram atividade antimicrobiana sobre os
 274 microrganismos *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida*
 275 *utilis*. O ácido anacárdico é um componente do óleo de caju com ação antioxidante (Kubo *et*
 276 *al.*, 2006) e antimicrobiana (Himejima & Kubo 1991). Os ácidos anacárdico e o cardol são
 277 compostos fenólicos e funcionam como um ionóforo monovalente (Nagabhushana *et al.*, 1995).
 278 O cardanol tem atividade tanto antiinflamatória, como antioxidante (Amorati *et al.*, 2001;
 279 Trevisan *et al.*, 2006).

280

281 *Óleo essencial da folha do Cravo-da-Índia*

282 A árvore de cravo-da-Índia é uma planta tropical perene (Figura 6). É utilizado como
 283 fonte de obtenção de um óleo essencial, amplamente aplicado em medicina e cosméticos
 284 (Jirovetz *et al.*, 2006). O óleo de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) é um óleo essencial

285 natural com substância aromatizante, apresenta atividades antimicrobiana e antioxidante por
286 conter uma variedade de compostos bioativos, como esquiterpenos e triterpenóides (Mulla *et*
287 *al.*, 2017). Estudos demonstraram que o óleo essencial de cravo apresenta como composto
288 majoritário o eugenol (4-alil-2-metoxifenol) que possui forte atividade inseticida, antioxidante
289 e antifúngica, e também apresenta β -cariofileno em sua composição (Chaieb *et al.*, 2007; Mulla
290 *et al.*, 2017). Esse óleo essencial é comumente utilizado como agente aromatizante em
291 alimentos e produtos cosméticos e possui atividades pró-oxidante e antioxidante (Mulla *et al.*,
292 2017).

293



294

295 **Figura 6.** Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*)

296

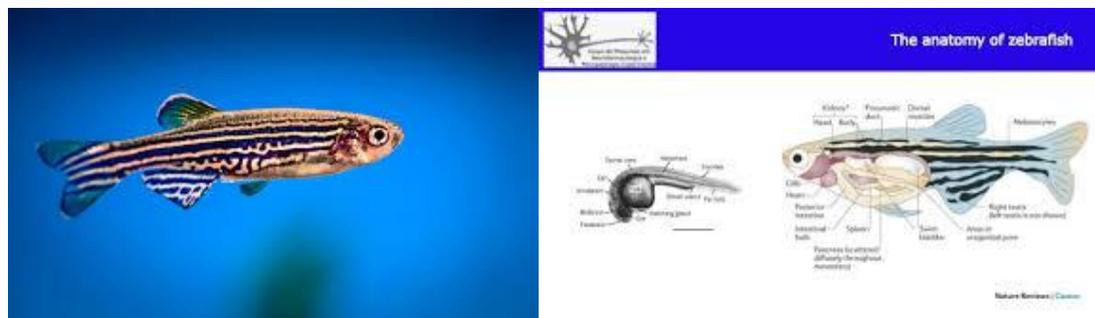
297 **Zebrafish (*Danio rerio*)**

298

299 O peixe Zebrafish (*Danio rerio*) conhecido popularmente no Brasil como paulistinha
300 (Figura 7). Este peixe Zebrafish pertence à família Cyprinidae (Perry *et al.*, 2010). O Zebrafish
301 é um animal pequeno da família dos teleósteos de água doce tropical. Tem o comprimento corpo
302 entre três a quatro centímetros. É uma espécie bem conhecida por seu uso ornamental (Poon &
303 Brand 2013). Atualmente, este pequeno animal está sendo muito estudado e usado pela
304 comunidade científica internacional (Howe *et al.*, 2013). Em 1955 foi relatado, pela primeira
305 vez, o uso do Zebrafish como modelo experimental (Santos *et al.*, 2016). Atualmente, o uso de
306 Zebrafish teve um crescimento exponencial na pesquisa científica (Santos *et al.*, 2016). O ponto
307 determinante para o sucesso do Zebrafish, como modelo experimental na pesquisa científica de
308 ponta, reside nas suas características e semelhança com seres humanos (Howe *et al.*, 2013).

309 Além disso, o Zebrafish tem um ciclo de vida curto, rápido desenvolvimento, pequeno espaço
 310 para seu uso, produz uma grande progênie, uso de baixo custo, higiene do local de trabalho,
 311 entre outros.

312



313

314 **Figura 7.** Peixe Zebrafish (*Danio rerio*) e sua anatomia

315 Os embriões do Zebrafish são pequenos (1 a 5 mm), dependendo do estágio de
 316 desenvolvimento e são translúcidos. Este fator os torna adequados para manuseio e uso (Lele
 317 & Krone 1996; Bailey *et al.*, 2013). No entanto, os fatores determinantes para o uso do Zebrafish
 318 como modelo experimental são as respostas fisiológicas e farmacológicas semelhantes aos seres
 319 humanos e outros mamíferos superiores (Perry *et al.*, 2010; Howe *et al.*, 2013). Estas respostas
 320 semelhantes aos seres humanos e mamíferos superiores os tornam adequados para identificação
 321 de medicamentos e produtos naturais bioativos com potencial terapêutico.

322 As características biológicas do Zebrafish, combinado com as vantagens que oferece em
 323 manutenção e cuidado, tornam-os como modelo ideal para pesquisas *in vivo* (Crawford *et al.*,
 324 2008). Outra vantagem em ensaios de bio-atividade de compostos, usando embriões e larvas de
 325 Zebrafish é que os compostos podem ser diluídos com água não estéril. As pequenas moléculas
 326 são rapidamente absorvidas pela pele e brânquias do Zebrafish. Isso permite um aumento na
 327 "taxa de transferência" de centenas de moléculas por dia (Zon & Peterson 2005).

328 Apesar do sucesso do uso deste animal em pesquisas científicas, uma grande questão
 329 seria até que ponto os resultados poderiam ser extrapolados para seres humanos e mamíferos
 330 superiores. No entanto, os testes genéticos e farmacológicos utilizando o Zebrafish como
 331 modelo experimental mostraram a boa representatividade para outros organismos, incluindo os
 332 seres humanos (Perry *et al.*, 2010; Howe *et al.*, 2013). Além disso, os genes identificados na
 333 organogênese do Zebrafish têm sido consistente para validar dados de seres humanos e ratos
 334 (Perry *et al.*, 2010; Howe *et al.*, 2013). Em vários trabalhos realizados, os genes do Zebrafish e
 335 dos seres humanos, foram observados lado a lado. As notáveis semelhanças farmacológicas e
 336 fisiológicas entre os seres humanos e Zebrafish poderiam ser estendidas para os fenótipos

337 modificados de doenças identificadas por meio de ensaios laboratoriais (Peterson & MacRae
338 2012).

339 O genoma mitocondrial do Zebrafish foi totalmente sequenciado em outubro de 2001
340 (Broughton *et al.*, 2001). No entanto, a sequência completa do genoma foi divulgada em 2013
341 pelo Sanger Institute (UK). Ao comparar a sequência do genoma do Zebrafish com o genoma
342 humano, observou-se que alguns genes como ciclo celular, crescimento e diferenciação,
343 funções teciduais, oncogênese e supressor tumoral, foram preservados. Alguns estudos
344 mostraram que os 70% dos genes do Zebrafish são similares aos genes humanos (Perry *et al.*,
345 2010; Howe *et al.*, 2013). Desta forma, os estudos mostraram que o Zebrafish poderia ser usado
346 como um modelo confiável para o rastreamento de drogas, compostos e produtos (Amatruda *et*
347 *al.*, 2002; Crawford *et al.*, 2008).

348 A utilização do Zebrafish, como um modelo para pesquisa *in vivo*, para estudo de drogas,
349 novas moléculas e novos compostos foi proposto há 58 anos (Santos *et al.*, 2016). Estes estudos
350 usaram embriões e larvas Zebrafish identificação de moléculas sintéticas e produtos naturais
351 (Jones & Huffman 1957). No entanto, apenas no ano de 2000 foi descrito o primeiro "rastreo"
352 usando placas de poços múltiplos para estudos em medicamentos e drogas. Depois disso, vários
353 estudos relataram o uso da Zebrafish para realizar pesquisas específicas para a descoberta de
354 novos medicamentos e compostos (Rennekamp & Peterson 2015; Santos *et al.*, 2016). Vários
355 compostos usados pelos seres humanos e animais como flavonoides, alcaloides e algumas
356 drogas foram testadas para seus efeitos teratogênicos e seu potencial efeito embriotóxicos
357 usando o Zebrafish como modelo experimental (Hill *et al.*, 2005; Kari *et al.*, 2007; Crawford *et*
358 *al.*, 2008; Marques *et al.*, 2011; Kirkwood *et al.*, 2012; Peterson & MacRae 2012; Strähle *et al.*,
359 2012; Bailey *et al.*, 2013; Blahová *et al.*, 2013; Jomaa *et al.*, 2014; Caro *et al.*, 2016; Zhou *et*
360 *al.*, 2017; Borges *et al.*, 2018). Ainda, o Zebrafish tem sido amplamente utilizado em pesquisas
361 avaliando agentes antioxidantes (Kirkwood *et al.*, 2012), determinação de espécies reativas de
362 oxigênio e demais biomarcadores de processos relacionados ao estresse oxidativo (Caro *et al.*,
363 2016). Esses estudos relatam principalmente o processo de oxidação referente à presença de
364 produtos químicos no meio aquático (Blahová *et al.*, 2013; Bartoskova *et al.*, 2014; Chen *et al.*,
365 2016). Além disso, estudos demonstraram que os embriões e larvas de Zebrafish são úteis para
366 análise de toxicidade a partir de testes de sobrevivência e desenvolvimento (Zhao *et al.*, 2013).

367 Desta forma, o Zebrafish é um modelo experimental interessante para os futuros estudos
368 para descoberta de novas substâncias, moléculas, drogas e/ou medicamentos para o bem-estar
369 dos seres humanos e estudos para descoberta de novos produtos naturais em substituição às
370 moléculas usadas atualmente e combatida pelos novos modelos de produção animal.

371

372 **Referências Bibliográficas**

373

374 Abad M.J. & Bermejo P. (2007) Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc* **7**, 76-96.375 Amatruda J.F., Shepard J.L., Stern H.M. & Zon L.I. (2002) Zebrafish as a cancer model system.
376 *Cancer cell* **1**, 229-231.377 Amorati R., Pedulli G.F., Valgimigli L., Attanasi O.A., Filippone P., Fiorucci C. & Saladino R.
378 (2001) Absolute rate constants for the reaction of peroxy radicals with cardanol derivatives.
379 *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2142-2146.380 Bailey J., Oliveri A. & Levin E.D. (2013) Zebrafish model systems for developmental
381 neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* **99**, 14-
382 23.383 Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils—
384 a review. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 446-475.385 Bartoskova M., Dobsikova R., Stancova V., Pana O., Zivna D., Plhalova L., Blahova J. &
386 Marsalek P. (2014) Norfloxacin—toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative
387 stress parameters. *BioMed research international* **2014**, 1-7.388 Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A. &
389 Beauchemin K.A. (2008) A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and
390 production. *Animal Feed Science and Technology* **145**, 209-228.391 Blahová J., Plhalová L., Hostovský M., Divišová L., Dobšíková R., Mikulíková I., Štěpánová
392 S. & Svobodová Z. (2013) Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after
393 subchronic exposure to atrazine. *Food and Chemical Toxicology* **61**, 82-85.

- 394 Borges R.S., Keita H., Ortiz B.L.S., Santos Sampaio T.I., Ferreira I.M., Lima E.S., da Silva
395 M.d.J.A., Fernandes C.P., Faria Mota A.E.M. & Conceição E.C. (2018) Anti-inflammatory
396 activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: *in vitro* and in
397 zebrafish studies. *Inflammopharmacology* **26**, 1-24.
- 398 Brewer M.S. (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and
399 potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10**, 221-
400 247.
- 401 Broughton R.E., Milam J.E. & Roe B.A. (2001) The complete sequence of the zebrafish (*Danio*
402 *rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA.
403 *Genome research* **11**, 1958-1967.
- 404 Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—
405 a review. *International journal of food microbiology* **94**, 223-253.
- 406 Calo E., Maffezzoli A., Mele G., Martina F., Mazzetto S.E., Tarzia A. & Stifani C. (2007)
407 Synthesis of a novel cardanol-based benzoxazine monomer and environmentally sustainable
408 production of polymers and bio-composites. *Green Chemistry* **9**, 754-759.
- 409 Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A. & Ricke S.C. (2015) Essential oils as antimicrobials in
410 food systems—A review. *Food Control* **54**, 111-119.
- 411 Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L. & Ferret A. (2007) Invited review:
412 essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* **90**,
413 2580-2595.
- 414 Caro M., Iturria I., Martinez-Santos M., Pardo M.A., Rainieri S., Tueros I. & Navarro V. (2016)
415 Zebrafish dives into food research: effectiveness assessment of bioactive compounds. *Food*
416 *& function* **7**, 2615-2623.
- 417 Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Kahla-Nakbi A.B., Rouabhia M., Mahdouani K. &
418 Bakhrouf A. (2007) The chemical composition and biological activity of clove essential oil,

- 419 Eugenia caryophyllata (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy*
420 *research* **21**, 501-506.
- 421 Chen M., Yin J., Liang Y., Yuan S., Wang F., Song M. & Wang H. (2016) Oxidative stress and
422 immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. *Aquatic Toxicology* **174**, 54-60.
- 423 Collins M.A. & Charles H.P. (1987) Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two
424 anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food microbiology* **4**, 311-315.
- 425 Cox S.D., Mann C.M. & Markham J.L. (2001) Interactions between components of the essential
426 oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied microbiology* **91**, 492-497.
- 427 Crawford A.D., Esguerra C.V. & Witte P.A.M. (2008) Fishing for drugs from nature: zebrafish
428 as a technology platform for natural product discovery. *Planta medica* **74**, 624-632.
- 429 Das P., Sreelatha T. & Ganesh A. (2004) Bio oil from pyrolysis of cashew nut shell-
430 characterisation and related properties. *Biomass and Bioenergy* **27**, 265-275.
- 431 Davidson P.M. & Naidu A.S. (2000) Phyto-phenols. In: *Natural Food Antimicrobial Systems*
432 (ed. by Naidu AS), pp. 265-293. CRC - Press, Boca Raton, FL.
- 433 Dorman H.J.D. & Deans S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of
434 plant volatile oils. *Journal of applied microbiology* **88**, 308-316.
- 435 El Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Addi E.H.A., Casabianca H., El Mousadik A.,
436 Hartmann D., Jilale A. & Renaud F.N.R. (2015) Essential oils: from extraction to
437 encapsulation. *International journal of pharmaceutics* **483**, 220-243.
- 438 Embuscado M.E. (2015) Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review.
439 *Journal of functional foods* **18, Part B**, 811-819.
- 440 Fasseas M.K., Mountzouris K.C., Tarantilis P.A., Polissiou M. & Zervas G. (2008) Antioxidant
441 activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* **106**, 1188-
442 1194.

- 443 Feldberg R.S., Chang S.C., Kotik A.N., Nadler M., Neuwirth Z., Sundstrom D.C. & Thompson
444 N.H. (1988) *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin.
445 *Antimicrobial agents and chemotherapy* **32**, 1763-1768.
- 446 Gedam P.H. & Sampathkumaran P.S. (1986) Cashew nut shell liquid: Extraction, chemistry
447 and applications. *Progress in Organic Coatings* **14**, 115-157.
- 448 Gershenzon J. & Croteau R. (1991) Terpenoids in herbivores: Their interactions with secondary
449 plant metabolites. In: *Terpenoids* (eds. by Rosenthal GA & Berenbaum MR), pp. 165-219.
450 Academic Press, San Diego.
- 451 Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L. & Leach D.N. (1999) The role of structure and
452 molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and*
453 *Fragrance Journal* **14**, 322-332.
- 454 Gülçın İ., Oktay M., Kireççi E. & Küfrevioğlu Ö.İ. (2003) Screening of antioxidant and
455 antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* **83**,
456 371-382.
- 457 Gutiérrez M.E., García A.F., Madariaga M.A., Sagrista M.L., Casadó F.J. & Mora M. (2003)
458 Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components:
459 evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life sciences* **72**, 2337-
460 2360.
- 461 Harborne J.B. (1999) An overview of antinutritional factors in higher plants. In: *Secondary*
462 *plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding* (eds. by Caygill JC
463 & Mueller H), pp. 7-16, Nottingham Univ Press, UK.
- 464 Hill A.J., Teraoka H., Heideman W. & Peterson R.E. (2005) Zebrafish as a model vertebrate
465 for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences* **86**, 6-19.
- 466 Himejima M. & Kubo I. (1991) Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale*
467 (*Anacardiaceae*) nut shell oil. *Journal of agricultural and food chemistry* **39**, 418-421.

- 468 Hoffmann C. & Evans A.C. (1911) The use of spices as preservatives. *Industrial & Engineering*
469 *Chemistry* **3**, 835-838.
- 470 Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E.,
471 Humphray S., McLaren K. & Matthews L. (2013) The zebrafish reference genome sequence
472 and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498-503.
- 473 IBGE (2013) Contas nacionais trimestrais. Jul.-set. 2013.
- 474 Ito N., Fukushima S., Haqlwara A., Shibata M. & Ogiso T. (1983) Carcinogenicity of butylated
475 hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute* **70**, 343-352.
- 476 Jirovetz L., Buchbauer G., Stoilova I., Stoyanova A., Krastanov A. & Schmidt E. (2006)
477 Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of*
478 *agricultural and food chemistry* **54**, 6303-6307.
- 479 Jomaa B., Hermsen S.A., Kessels M.Y., Van Den Berg J.H., Peijnenburg A.A., Aarts M.M.J.G.,
480 Piersma A.H. & Rietjens I.M. (2014) Developmental toxicity of thyroid-active compounds
481 in a zebrafish embryotoxicity test. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation* **31**, 303-
482 317.
- 483 Jones R.W. & Huffman N. (1957) Fish embryos as bio-assay material in testing chemicals for
484 effects on cell division and differentiation. *Transmission American Microscopy Society* **1**,
485 177-183.
- 486 Kari G., Rodeck U. & Dicker A.P. (2007) Zebrafish: an emerging model system for human
487 disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **82**, 70-80.
- 488 Kirkwood J.S., Lebold K.M., Miranda C.L., Wright C.L., Miller G.W., Tanguay R.L., Barton
489 C.L., Traber M.G. & Stevens J.F. (2012) Vitamin C deficiency activates the purine
490 nucleotide cycle in zebrafish. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 3833-3841.

- 491 Kubo I., Masuoka N., Ha T.J. & Tsujimoto K. (2006) Antioxidant activity of anacardic acids.
492 *Food Chemistry* **99**, 555-562.
- 493 Kubo I., Nihei K. & Tsujimoto K. (2003) Antibacterial action of anacardic acids against
494 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of agricultural and food*
495 *chemistry* **51**, 7624-7628.
- 496 Lage T.C.A., Montanari R.M., Fernandes S.A., Oliveira Monteiro C.M., Senra T.d.O.S.,
497 Zeringota V., Silva Matos R. & Daemon E. (2015) Chemical composition and acaricidal
498 activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its
499 constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus*
500 *microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental parasitology* **148**, 24-29.
- 501 Lee S.E., Hwang H.J., Ha J.-S., Jeong H.-S. & Kim J.H. (2003) Screening of medicinal plant
502 extracts for antioxidant activity. *Life sciences* **73**, 167-179.
- 503 Lele Z. & Krone P.H. (1996) The zebrafish as a model system in developmental, toxicological
504 and transgenic research. *Biotechnology advances* **14**, 57-72.
- 505 Lima C.A.A., Pastore G.M. & Lima E.D.P.A. (2000) Estudo da atividade antimicrobiana dos
506 ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) dos clones de cajueiro-
507 anão-precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco estágios de maturação sobre microrganismos da
508 cavidade bucal. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos* **20**.
- 509 Loots D.T., van der Westhuizen F.H. & Jerling J. (2006) Polyphenol composition and
510 antioxidant activity of Kei-apple (*Dovyalis caffra*) juice. *Journal of agricultural and food*
511 *chemistry* **54**, 1271-1276.
- 512 Marques A., Lourenço H.M., Nunes M.L., Roseiro C., Santos C., Barranco A., Rainieri S.,
513 Langerholc T. & Cencic A. (2011) New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake
514 of chemical contaminants in meat and seafood. *Food research international* **44**, 510-522.

- 515 Maziero G.C., Baunwart C. & Toledo M.C.F. (2001) Estimates of the theoretical maximum
516 daily intake of phenolic antioxidants BHA, BHT and TBHQ in Brazil. *Food Additives &*
517 *Contaminants* **18**, 365-373.
- 518 Mazzetto S.E., Lomonaco D. & Mele G. (2009) Óleo da castanha de caju: oportunidades e
519 desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. *Química Nova* **32**,
520 732-741.
- 521 Menezes H. (2005) Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Baccharis*
522 *dracunculifolia* (Asteraceae). *Arquivos do Instituto Biológico* **72**, 33-33.
- 523 Migliore L. & Coppedè F. (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative
524 disorders and aging. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental*
525 *Mutagenesis* **674**, 73-84.
- 526 Mulla M., Ahmed J., Al-Attar H., Castro-Aguirre E., Arfat Y.A. & Auras R. (2017)
527 Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film
528 for chicken meat packaging. *Food Control* **73**, 663-671.
- 529 Muroi H. & Kubo I. (1993) Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus*
530 *mutans* and their potentiation. *Journal of agricultural and food chemistry* **41**, 1780-1783.
- 531 Nagabhushana K.S., Shobha S.V. & Ravindranath B. (1995) Selective ionophoric properties of
532 anacardic acid. *Journal of Natural Products* **58**, 807-810.
- 533 Naigre R., Kalck P., Roques C., Roux I. & Michel G. (1996) Comparison of antimicrobial
534 properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta medica* **62**, 275-277.
- 535 Nieva-Echevarría B., Manzanos M.J., Goicoechea E. & Guillén M.D. (2015) 2, 6-Di-tert-butyl-
536 hydroxytoluene and its metabolites in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and*
537 *Food Safety* **14**, 67-80.

- 538 Park Y.K., Paredes-Guzman J.F., Aguiar C.L., Alencar S.M. & Fujiwara F.Y. (2004) Chemical
539 constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern
540 Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**, 1100-1103.
- 541 Pentz R. & Siegers C. (1996) Methods for qualitative and quantitative assessment of their
542 ingredients. *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum L. and related*
543 *species. Baltimore: Williams & Wilkins*, 109-134.
- 544 Perry S.F., Ekker M., Farrell A.P. & Brauner C.J. (2010) *Zebrafish*. Academic Press Elsevier,
545 Amsterdam, Holanda.
- 546 Peterson R.T. & MacRae C.A. (2012) Systematic approaches to toxicology in the zebrafish.
547 *Annual review of pharmacology and toxicology* **52**, 433-453.
- 548 Pletsch M. (1998) Compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia: Ciência e*
549 *Desenvolvimento* **4**, 12-15.
- 550 Poon K.L. & Brand T. (2013) The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny
551 fish with mighty prospects. *Global Cardiology Science and Practice* **2013**, 1-4.
- 552 Raccach M. (1984) The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: A review.
553 *Journal of Food Safety* **6**, 141-170.
- 554 Reddy L., Odhav B. & Bhoola K.D. (2003) Natural products for cancer prevention: a global
555 perspective. *Pharmacology & therapeutics* **99**, 1-13.
- 556 Rennekamp A.J. & Peterson R.T. (2015) 15 years of zebrafish chemical screening. *Current*
557 *opinion in chemical biology* **24**, 58-70.
- 558 Reuter H.D., Koch H.P. & Lawson L.D. (1996) Therapeutic effects and applications of garlic
559 and its preparations. *The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and*
560 *Related Species*, 135-212.

- 561 Sangwan N.S., Farooqi A.H.A., Shabih F. & Sangwan R.S. (2001) Regulation of essential oil
562 production in plants. *Plant Growth Regulation* **34**, 3-21.
- 563 Santos I.V.F., Duarte J.L., Fernandes C.P., Keita H., Amado J.R.R., Velázquez-Moyado J.A.,
564 Navarrete A. & Carvalho J.C.T. (2016) Use of zebrafish (*Danio rerio*) in experimental
565 models for biological assay with natural products. *African Journal of Pharmacy and*
566 *Pharmacology* **10**, 883-891.
- 567 Sforcin J.M. (2007) Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*
568 **113**, 1-14.
- 569 Shahidi F. & Ambigaipalan P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and
570 spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods* **18**,
571 820-897.
- 572 Silva Filho A.A., Bueno P.C.P., Gregório L.E., Silva M.L.A., Albuquerque S. & Bastos J.K.
573 (2004) In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds
574 from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*
575 **56**, 1195-1199.
- 576 Strähle U., Scholz S., Geisler R., Greiner P., Hollert H., Rastegar S., Schumacher A.,
577 Selderslaghs I., Weiss C. & Witters H. (2012) Zebrafish embryos as an alternative to animal
578 experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal
579 welfare regulations. *Reproductive Toxicology* **33**, 128-132.
- 580 Stratakos A.C. & Koidis A. (2016) Methods for extracting essential oils. In: *Essential oils in*
581 *food preservation, flavor and safety* (ed. by Preedy V), pp. 31-38. Academic Press.
- 582 Svoboda K.P. & Greenaway R.I. (2003) Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis*
583 L.(summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *The International*
584 *Journal of Aromatherapy* **4**, 196-202.

- 585 Trevisan M.T.S., Pfundstein B., Haubner R., Würtele G., Spiegelhalder B., Bartsch H. & Owen
586 R. (2006) Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products
587 and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 188-197.
- 588 Trouillas P., Calliste C.-A., Allais D.-P., Simon A., Marfak A., Delage C. & Duroux J.-L. (2003)
589 Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant
590 extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry* **80**, 399-407.
- 591 Ultee A., Kets E.P.W. & Smid E.J. (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne
592 pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4606-4610.
- 593 Veiga R.S., Mendonça S., Mendes P.B., Paulino N., Mimica M.J., Lagareiro Netto A.A., Lira
594 I.S., López B.G.C., Negrão V. & Marcucci M.C. (2017) Artepillin C and phenolic
595 compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and
596 *Baccharis dracunculifolia*. *Journal of applied microbiology* **122**, 911-920.
- 597 Verdi L.G., Brighente I.M.C. & Pizzolatti M.G. (2005) Gênero *Baccharis* (Asteraceae):
598 aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova* **28**, 85-94.
- 599 Zhao X., Wang S., Wu Y., You H. & Lv L. (2013) Acute ZnO nanoparticles exposure induces
600 developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish.
601 *Aquatic Toxicology* **136**, 49-59.
- 602 Zheng W. & Wang S.Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.
603 *Journal of agricultural and food chemistry* **49**, 5165-5170.
- 604 Zhou H., George S., Li C., Gurusamy S., Sun X., Gong Z. & Qian H. (2017) Combined toxicity
605 of prevalent mycotoxins studied in fish cell line and zebrafish larvae revealed that type of
606 interactions is dose-dependent. *Aquatic Toxicology* **193**, 60-71.
- 607 Zon L.I. & Peterson R.T. (2005) In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Drug*
608 *Discovery* **4**, 35-44.

II. OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar o efeito toxicológico do extrato de Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia*) em larvas de Zebrafish (*Danio rerio*) de oito dias de vida pós fertilização.
- Avaliar os efeitos da aspersão da associação dos compostos naturais em diferentes concentrações na dieta de peixes Zebrafish sobre o crescimento animal e efeitos antioxidantes na ração e nos músculos dos mesmos.

34 However, when dilutions were tested from 1/2500 g / mL, a low percentage of mortality was
35 obtained, with no harmful effects to the larvae.

36

37 **Keywords:** phenolic compounds; flavonoids; mortality

38

39 1. Introdução

40 A espécie *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), popularmente conhecido como
41 Alecrim-do-Campo ou Vassourinha, é uma planta nativa brasileira, arbustiva e de crescimento
42 perene, podendo ser encontrada por toda a América do Sul, principalmente em áreas com clima
43 temperado e tropicais¹. Essa planta tem sido amplamente utilizada na medicina popular, na
44 prevenção de disfunções como anemia, inflamação, diabetes, distúrbios hepáticos e próstata².
45 Isso porque, alguns estudos têm demonstrado que a espécie *Baccharis dracunculifolia*
46 apresenta compostos, como: flavonoides (isosakuranetina, aromadendrin-4'-éter metílico)
47 terpenos (bacarina) e ácidos fenólicos (artepelina C, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido
48 ferúlico)^{3,4,5}. É descrita como principal fonte vegetal da própolis verde, assim chamada por
49 causa de sua coloração⁶. Estudos demonstraram algumas propriedades biológicas da própolis
50 verde, incluindo, citotoxicidade⁷, anti herpes⁸, antitumoral⁹, antioxidante¹⁰, antimicrobiano¹¹ e
51 atividades anti-HIV¹². Alguns autores afirmam que as atividades biológicas da própolis verde
52 brasileira são devido aos altos níveis de ácidos p-cumáricos prenilados, principalmente
53 Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-p-cumárico), que também está presente na *B.*
54 *dracunculifolia*^{13,14,15}.

55 O peixe Zebrafish (*Danio rerio*) conhecido popularmente no Brasil como Paulistinha
56 de água doce pertencente à família Ciprinidae, pode ser encontrado naturalmente no sul e
57 sudeste da Ásia, aos redores dos rios Ganges e Brahmaputra. Apresenta pequeno porte,
58 chegando a aproximadamente 4 cm de comprimento e coloração distinta com listras claras e
59 escuras alternadas pelo corpo¹⁶. Têm sido amplamente utilizados em pesquisas avaliando
60 agentes antioxidantes¹⁷, determinação de espécies reativas de oxigênio e demais biomarcadores
61 de processos relacionados ao estresse oxidativo¹⁸. Esses estudos relatam principalmente o
62 processo de oxidação referente à presença de produtos químicos no meio aquático^{19,20,21}. Além
63 disso, estudos demonstraram que os embriões e larvas de Zebrafish são úteis para análise de
64 toxicologia a partir de testes de sobrevivência e desenvolvimento²². Neste contexto, o objetivo
65 deste trabalho foi testar diferentes diluições do extrato hidro alcoólico de *B. dracunculifolia*, a

66 fim de encontrar uma dosagem que não apresente toxicidade às larvas de Zebrafish (*Danio*
67 *rerio*) com 8 dias pós fertilização.

68

69 **2. Material e métodos**

70

71 A análise de toxicidade utilizando larvas de Zebrafish foi aprovada pelo comitê de ética
72 animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA N° 6119170518).

73

74 *2.1. Coleta da planta e extração dos compostos bioativos*

75

76 A *Baccharis dracunculifolia* foi coletado na cidade de Maringá, Paraná, Brasil, no mês
77 de agosto de 2017 e levado para o Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM),
78 centro de ciências biológicas, para que fosse realizado o reconhecimento da espécie por um
79 especialista, em seguida a planta foi levada para o Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal
80 (LANA) do Departamento de Zootecnia pertencente à Universidade Estadual de Maringá, onde
81 foi realizado a secagem da planta sem raiz, em estufa de circulação forçada a 40° C por 72
82 horas até a completa secagem, e moagem em moinho faca com peneira de 1 mm de espessura.
83 Após o processamento, a planta seca e moída foi armazenada em refrigerador em temperatura
84 de 4° C dentro de saco plástico envolto de papel alumínio, para proteger a planta possíveis
85 perdas de compostos voláteis para a utilização posteriormente.

86 A extração dos compostos bioativos da planta foi realizada através de extrato hidro
87 alcólico, onde foi pesado em béquer com o auxílio de balança analítica (BEL engineering,
88 M214Ai), 1 grama de amostra e em seguida adicionado 80 mL de etanol (99,9 % de pureza) e
89 20 mL de H₂O destilada, homogeneizada em agitador magnético (TE-0851) por 20 segundos e
90 descanso por 10 minutos. Esse processo de agitação e descanso foi repetido por quatro vezes,
91 posteriormente o extrato foi filtrado e colocado em banho maria à 45° C por 24 horas para
92 evaporação total do álcool, resultando em um extrato aquoso com diluição de 1/20.

93

94 *2.2. Reprodução e criação das larvas de Zebrafish (Danio rerio)*

95

96 A criação das larvas foi realizada no Laboratório de Zebrafish do Núcleo de Pesquisa
97 PeixeGen – Manejo, melhoramento genético e genética molecular em piscicultura de água
98 doce, localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Os

99 peixes foram mantidos em ambiente controlado, com ciclo de iluminação 14 -10 horas de claro-
100 escuro e temperatura entre 26 e 28° C, com parâmetros de qualidade de água adequados
101 conforme recomendado para espécie. Foram utilizados seis casais adultos de Zebrafish
102 acondicionados em aquários de 30 litros e mantidos separadamente até o momento do
103 acasalamento para obtenção das larvas.

104

105 2.3. Análise de toxicidade

106

107 O presente estudo foi executado em dois ensaios, sendo o primeiro ensaio realizado
108 através da utilização de 240 larvas com 8 dias pós fertilização (dpf). Foram testados sete
109 tratamentos com diferentes diluições do extrato hidro alcoólico de *B. dracunculifolia*, sendo
110 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1280 (g/mL de H₂O) e como tratamento controle foi
111 utilizado água declorada, foram realizados três tempos de observações de exposição ao extrato
112 (0, 1 e 2 horas). Em microplacas de 96 poços foi pipetado 200 µL de extrato/poço e em seguida
113 adicionado a larva, sendo que cada poço tinha uma larva. Imediatamente após colocar a larva
114 em contato com o extrato, foi realizado observações de presença de movimentos natatórios nas
115 microplacas, em seguida, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur a larva foi colocada em lâmina
116 e com o auxílio de microscópio de luz (Motic BA310E) com objetiva de 10 vezes de aumento
117 e câmara Moticam 5.0 MP acoplada, foi observado se houve alterações corporais, circulação
118 sanguínea e batimentos cardíacos, quando se constatava a ausência desses movimentos a larva
119 era considerada morta. Foram utilizadas 30 larvas por tratamentos e o resultado obtido foi
120 expresso em % de mortalidade/hora de exposição.

121 No segundo ensaio, foram utilizadas 180 larvas de oito dpf e testadas quatro tratamentos
122 com diluições de extratos hidro alcóolico de *B. dracunculifolia* (1/500, 1/1000, 1/2500 e 1/5000
123 g/mL de H₂O), em quatro tempos de observação (0, 4, 8 e 12 horas). O ensaio foi realizado
124 seguindo os mesmos procedimentos do primeiro ensaio. Sendo que foram utilizadas 36 larvas
125 por tratamento e o resultado obtido foi expresso em % de mortalidade sobre o tempo de
126 exposição. Os ensaios de toxicidade em larvas de Zebrafish foram realizados de acordo com a
127 diretriz da OCDE; N° 236: Teste de Toxicidade Aguda dos Peixes (FET) com adaptação.

128

129 3. Resultados

130

131 No primeiro ensaio (Tabela 1), foi realizada a observação de movimentos natatórios nas
132 larvas de oito dpf, em sete diferentes diluições de extrato hidro alcoólico de *B. dracunculifolia*,

133 onde se pode observar que as larvas expostas aos extratos em diluições de 1/20, 1/40, 1/80 e
134 1/160 não apresentaram movimentos natatórios imediatos à exposição. Da mesma forma, em
135 microscopia não foi constatado a presença de circulação sanguínea e batimentos cardíacos.
136 Sendo assim, foi considerado 100% de mortalidade em zero hora de observação. Ao analisar
137 os tratamentos com diluições de 1/320, 1/640 e 1/1280 em zero hora de exposição obteve-se
138 0% de mortalidade. Entretanto, para o tratamento 1/320 em 1 hora de exposição obteve-se
139 100% de mortalidade, já para os tratamentos 1/640 e 1/1280 obteve-se 50 e 20% de mortalidade
140 em 1 hora de exposição e em 2 horas de exposição obteve-se 60 e 50% de mortalidade
141 respectivamente. Em contrapartida, ao realizar as observações no tratamento controle
142 observou-se 0 % de mortalidade nos três tempos de exposição, indicando que as mortalidades
143 obtidas no estudo estão relacionadas de exposição do extrato de *B. dracunculifolia* (Figura 1).

144 No segundo ensaio (Tabela 2), pode-se constatar que as larvas expostas ao extrato com
145 diluições 1/500, 1/1000, 1/2500 1/5000 não foi observado mortalidade no tempo zero de
146 observação, no entanto, observou-se um aumento na mortalidade conforme aumentava o tempo
147 de exposição, sendo que em 4 horas de exposição ao extrato obteve-se 100,00 % de mortalidade
148 para o tratamento 1/500 e o tratamento 1/1000 obteve-se 100 % de mortalidade em 12 horas de
149 exposição. O tratamento 1/2500 apresentou 41,47 % de mortalidade em 12 horas de exposição.
150 E o tratamento 1/5000 não apresentou mortalidade em até 4 horas de exposição, em 8 e 12
151 horas de exposição obteve-se 11 e 25% de mortalidade respectivamente. Ao analisar o
152 tratamento controle, não foi observado mortalidade, o que indica que as mortalidades
153 observadas estão relacionadas diretamente ao extrato de *B. dracunculifolia* (Figura 2).

154

155 **4. Discussão**

156

157 A partir dos resultados obtidos observou-se que a planta *Braccharis dracunculifolia*
158 apresenta acentuada toxicidade quando trabalhado com extratos de diluição inferiores a 1/500
159 g/mL, corroborando com estudos que apontaram algumas espécies do gênero *Baccharis*
160 apresentavam acentuada toxicidade, incluindo a *B. dracunculifolia*^{23,24}. Além disso, em outro
161 estudo, foram relatados efeitos genotóxicos e mutagênicos para a própolis verde em
162 camundongos²⁵, sendo que o *B. dracunculifolia* é a principal matéria prima para a produção da
163 própolis verde. Além do mais, estudos investigando o possível efeito genotóxicos e
164 mutagênicos do *B. dracunculifolia* em camundongos, demonstraram que o extrato aquoso da
165 planta aumentou o dano ao DNA, tecidos sanguíneos e hepáticos e a frequência do micronúcleo
166 na medula óssea²⁶.

167 Sabe-se que os principais constituintes do *B. dracunculifolia* são flavonoides, saponinas
168 e ácido fenólico²⁷. Estudos realizados por Fukuda et al. (2006)²⁸ analisando o efeito citotóxico
169 de compostos isolados da *Baccharis dracunculifolia* demonstraram que fenóis monoterpênicos
170 e álcoois sesquiterpênicos exibiram forte efeito citotóxico. Podendo sugerir que os
171 efeitos nocivos encontrados nos tratamentos com maiores concentrações de compostos da *B.*
172 *dracunculifolia* (diluições < 1/500), está relacionado a maiores concentrações de flavonoides e
173 ácidos fenólicos presente nos extratos.

174

175 5. Conclusão

176

177 A exposição de larvas de Zebrafish (*Danio rerio*) com oito dias pós-fecundação nos
178 diferentes níveis de diluição do extrato aquoso de *B. dracunculifolia* proposto no presente
179 estudo, demonstraram efeito tóxicos para as diluições menores que 1/500 g/mL com 100% de
180 mortalidade assim que os animais eram expostos. No entanto, quando testados as diluições a
181 partir de 1/2500 g/mL obteve-se baixa porcentagem de mortalidade.

182

183 6. Agradecimentos

184

185 Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
186 Nível Superior - CAPES (Brasília, Brasil). Os autores agradecem a empresa Safeeds Nutrição
187 Animal, Cascavel, Paraná, Brasil (Email: safeeds@safeeds.com.br) pelo financiamento e
188 fornecimento dos produtos utilizados nesta pesquisa, que foi possível para desenvolver este
189 trabalho.

190

191 7. Referências bibliográficas

192

- 193 1. Abad, M. J. & Bermejo, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(7), 76-96.
194 2007.
- 195 2. Verdi, L. G., Brighente, I. M. C. & Pizzolatti, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae):
196 aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, 28(1), 85-94. 2005.
- 197 3. Loots, D. T., van der Westhuizen, F. H. & Jerling, J. Polyphenol composition and
198 antioxidant activity of Kei-apple (*Dovyalis caffra*) juice. *Journal of Agricultural and Food*
199 *Chemistry*, 54(4), 1271-1276. 2006. doi: <http://dx.doi.org/0.1021/jf052697j>.
- 200 4. Mendez, J. Dihydrocinnamic acids in *Pteridium aquilinum*. *Food Chemistry*, 93(2), 251-
201 252. 2005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.019>.
- 202 5. Silva Filho, A. A., Bueno, P. C. P., Gregório, L. E., Silva, M. L. A., Albuquerque, S. &
203 Bastos, J. K. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated

- 204 compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Journal of Pharmacy and*
205 *Pharmacology*, 56(9), 1195-1199. 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1211/0022357044067>.
- 206 6. Park, Y. K., Paredes-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M. & Fujiwara, F. Y.
207 Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of
208 southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1100-
209 1103. 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/jf021060m>.
- 210 7. Matsuno, T., Matsumoto, Y., Saito, M. & Morikawa, J. Isolation and characterization of
211 cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 52(9-10),
212 702-704. 1997. doi: <https://doi.org/10.1515/znc-1997-9-1020>.
- 213 8. Vynograd, N., Vynograd, I. & Sosnowski, Z. A comparative multi-centre study of the
214 efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV).
215 *Phytomedicine*, 7(1), 1-6. 2000. doi: [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80014-8](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80014-8).
- 216 9. Kimoto, T., Arai, S., Kohguchi, M., Aga, M., Nomura, Y., Micallef, M. J., et al. Apoptosis
217 and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer*
218 *Detection and Prevention*, 22(6), 506-515. 1998. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1525-1500.1998.00020.x>.
- 220 10. Basnet, P., Matsuno, T. & Neidlein, R. Potent free radical scavenging activity of propolis
221 isolated from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 52(11-12), 828-833. 1997.
222 doi: <https://doi.org/10.1515/znc-1997-11-1217>.
- 223 11. Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A., Ikegaki, M., Cury, J. A. & Rosalen, P. L.
224 Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Currents Microbiological*,
225 36(1), 24-28. 1998. doi: <https://doi.org/10.1007/s002849900274>.
- 226 12. Ito, J., Chang, F.-R., Wang, H.-K., Park, Y. K., Ikegaki, M., Kilgore, N. & Lee, K.-H. Anti-
227 AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-
228 related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *Journal of Natural products*, 64(10),
229 1278-1281. 2001. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/np010211x>.
- 230 13. Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of*
231 *Ethnopharmacology*, 100(1), 114-117. 2005.
- 232 14. Messerli, S. M., Ahn, M. R., Kunimasa, K., Yanagihara, M., Tatefuji, T., Hashimoto, K.,
233 et al. Artemisinin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1
234 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. *Phytotherapy Research*, 23(3),
235 423-427. 2009. doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.2658>.
- 236 15. Nguyen, B. C. Q., Taira, N., Maruta, H. & Tawata, S.. Artemisinin C and other herbal PAK1-
237 blockers: Effects on hair cell proliferation and related PAK1-dependent biological function
238 in cell culture. *Phytotherapy Research*, 30(1), 120-127. 2016 doi:
239 <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5510>.
- 240 16. Spence, R., & Smith, C. Innate and learned colour preference in the zebrafish, *Danio rerio*.
241 *Ethology*, 114(6), 582-588. 2008. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2008.01515.x>.
- 242 17. Kirkwood, J. S., Lebold, K. M., Miranda, C. L., Wright, C. L., Miller, G. W., Tanguay, R.
243 L., et al. Vitamin C deficiency activates the purine nucleotide cycle in zebrafish. *Journal*
244 *of Biological Chemistry*, 287(6), 3833-3841. 2012. doi:
245 <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.316018>.
- 246 18. Caro, M., Iturria, I., Martinez-Santos, M., Pardo, M. A., Rainieri, S., Tueros, I. et al.
247 Zebrafish dives into food research: effectiveness assessment of bioactive compounds. *Food*
248 *& Function*, 7(6), 2615-2623. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/C6FO00046K>.
- 249 19. Blahová, J., Plhalová, L., Hostovský, M., Divišová, L., Dobšíková, R., Mikulíková, I., et al.
250 Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine.
251 *Food and Chemical Toxicology*, 61, 82-85. 2013. doi:
252 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.041>.

- 253 20. Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Pana, O., Zivna, D., Plhalova, L., et al.
254 Norfloxacin—toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative stress parameters.
255 *BioMed Research International*, 2014, 1-6. 2014. doi:
256 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/560235>.
- 257 21. Chen, M., Yin, J., Liang, Y., Yuan, S., Wang, F., Song, M. et al.. Oxidative stress and
258 immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 174, 54-60.
259 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.015>.
- 260 22. Zhao, X., Wang, S., Wu, Y., You, H. & Lv, L. Acute ZnO nanoparticles exposure induces
261 developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish.
262 *Aquatic Toxicology*, 136, 49-59. 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.019>.
- 263 23. Jarvis, B. B., Wang, S., Cox, C., Rao, M. M., Philip, V., Varaschin, M. S. et al. Brazilian
264 *Baccharis* toxins: livestock poisoning and the isolation of macrocyclic trichothecene
265 glucosides. *Natural Toxins*, 4(2), 58-71. 1996 doi: <https://doi.org/10.1002/19960402NT2>.
- 266 24. Varaschin, M. S. & Alessi, A. C. Poisoning of mice by *Baccharis coridifolia*: an
267 experimental model. *Veterinary and Human Toxicology*, 45(1), 42-44. 2003.
- 268 25. Pereira, A. D., Andrade, S. F., Oliveira Swerts, M. S. & Maistro, E. L. First in vivo
269 evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and
270 micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2580-2584. 2008. doi:
271 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.001>.
- 272 26. Rodrigues, C. R. F., Dias, J. H., Semedo, J. G., da Silva, J., Ferraz, A. B. F. & Picada, J. N.
273 Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (DC). *Journal of*
274 *Ethnopharmacology*, 124(2), 321-324. 2009. doi:
275 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.022>.
- 276 27. Campos, F. R., Bressan, J., Jasinski, V. C. G., Zuccolotto, T., Silva, L. E. & Cerqueira, L.
277 B. *Baccharis* (*Asteraceae*): Chemical constituents and biological activities. *Chemistry &*
278 *Biodiversity*, 13(1), 1-17. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201500363>.
- 279 28. Fukuda, M., Ohkoshi, E., Makino, M., & Fujimoto, Y. (2006). Studies on the constituents
280 of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (*Asteraceae*) and their cytotoxic activity.
281 *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 54, 1465-1468.
282 <https://doi.org/10.1248/cpb.54.1465>
- 283

284 **Tabela 1.** Análise de toxicidade de extrato de *B. dracunculifolia* em sete diferentes diluições
285 (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1280 g/mL de H₂O) em três tempos de observações
286 (0, 1 e 2 horas)

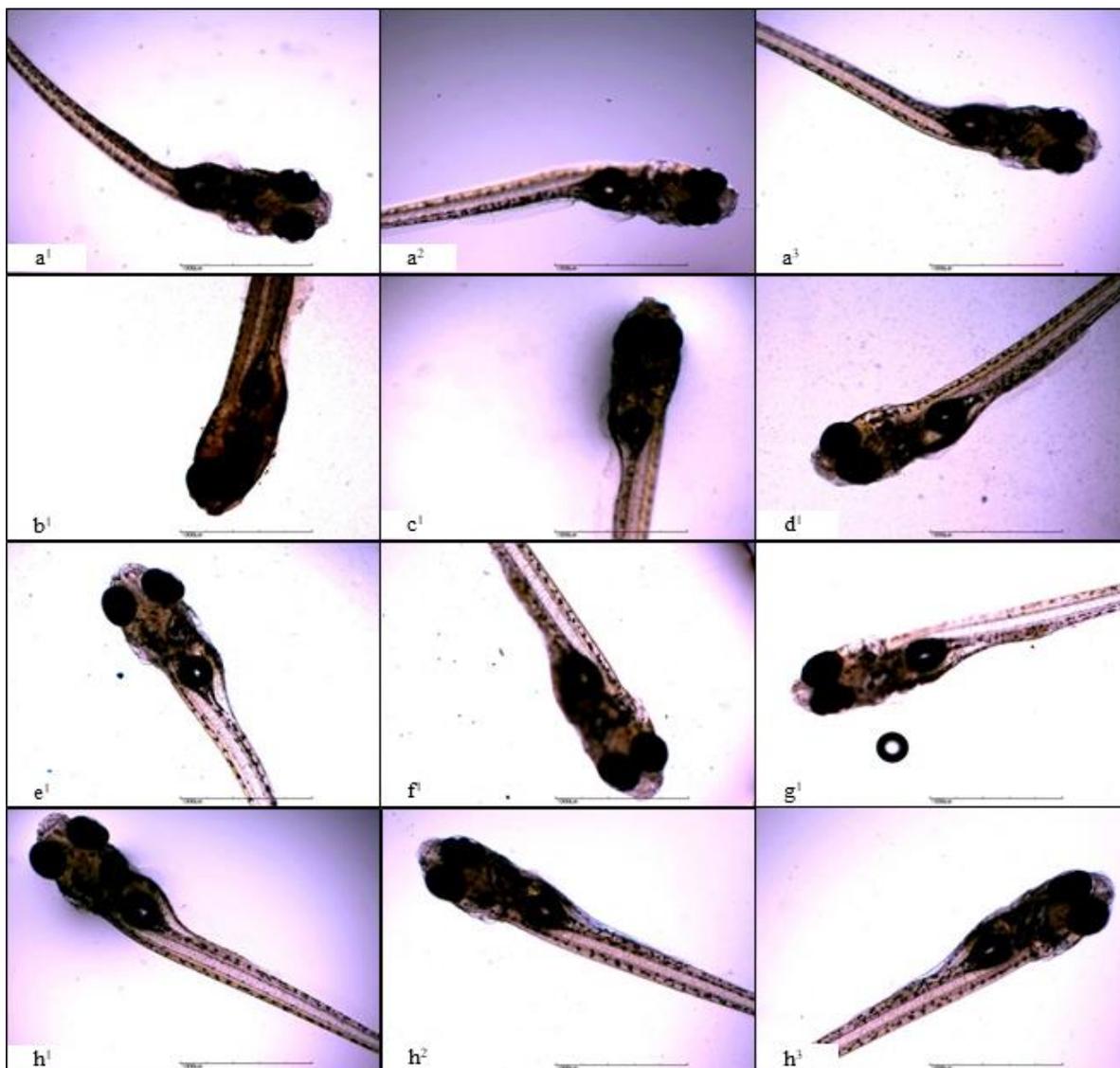
Diluições, g/mL de H ₂ O	Mortalidade, %		
	0 hora	1 hora	2 horas
CON	0,00	0,00	0,00
1/20	100,00	100,00	100,00
1/40	100,00	100,00	100,00
1/80	100,00	100,00	100,00
1/160	100,00	100,00	100,00
1/320	0,00	100,00	100,00
1/640	0,00	50,00	60,00
1/1280	0,00	20,00	50,00

287

288 **Tabela 2.** Análise de toxicidade de extrato de *B. dracunculifolia* em quatro diferentes diluições
289 (1/500, 1/1000, 1/2500 e 1/5000 g/mL de H₂O) em quatro tempos de observações (0, 4, 8 e 12
290 horas)

Diluições, g/mL de H ₂ O	Mortalidade, %			
	0 hora	4 horas	8 horas	12 horas
CON	0,00	0,00	0,00	0,00
1/500	0,00	100,00	100,00	100,00
1/1000	0,00	19,44	75,00	100,00
1/2500	0,00	8,33	36,11	41,67
1/5000	0,00	0,00	11,11	25,00

291



292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306

Figura 1. Fotos de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostas em sete diferentes diluições (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1280 g / mL de H₂O) de extratos aquoso de *Baccharis dracunculifolia* e três tempos de observação (0, 1 e 2 horas)

a¹: Animal vivo no tratamento controle em zero hora de exposição; a²: Animal vivo no tratamento controle em 1 hora de exposição; a³: Animal vivo no tratamento controle em 2 horas de exposição; b¹: Animal morto no tratamento 1/20 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; c¹: Animal morto no tratamento 1/40 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; d¹: Animal morto no tratamento 1/80 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; e¹: Animal morto no tratamento 1/160 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; f¹: Animal morto no tratamento 1/320 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; g¹: Animal vivo no tratamento 1/640 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; h¹: Animal vivo morto no tratamento 1/1280 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; h²: Animal vivo morto no tratamento 1/1280 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 1 hora de exposição; h³: Animal vivo vivo no tratamento 1/1280 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 2 hora de exposição.



307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330

Figura 2. Fotos de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostas em quatro diferentes diluições (1/500, 1/1000, 1/2500 e 1/5000 g / mL de H₂O) de extratos aquoso de *Baccharis dracunculifolia* e quatro tempos de observações (0, 4, 8 e 12 horas)

a¹: Animal vivo no tratamento controle em zero hora de exposição; a²: Animal vivo no tratamento controle em 1 hora de exposição; a³: Animal vivo no tratamento controle em 2 horas de exposição; a⁴: Animal vivo no tratamento controle em 2 horas de exposição; b¹: Animal vivo no tratamento 1/500 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; b²: Animal morto no tratamento 1/500 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 4 hora de exposição; b³: Animal morto no tratamento 1/500 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 8 hora de exposição; b⁴: Animal morto no tratamento 1/500 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 12 hora de exposição; c¹: Animal vivo no tratamento 1/1000 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; c²: Animal vivo no tratamento 1/1000 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 4 hora de exposição; c³: Animal morto no tratamento 1/1000 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 8 hora de exposição; c⁴: Animal morto no tratamento 1/1000 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 12 hora de exposição; d¹: Animal vivo no tratamento 1/2500 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; d²: Animal vivo no tratamento 1/2500 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 4 hora de exposição; d³: Animal vivo no tratamento 1/2500 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 8 hora de exposição; d⁴: Animal vivo no tratamento 1/2500 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 12 hora de exposição; e¹: Animal vivo no tratamento 1/5000 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em zero hora de exposição; e²: Animal vivo no tratamento 1/5000 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 4 hora de exposição; e³: Animal vivo no tratamento 1/5000 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 8 hora de exposição; e⁴: Animal vivo no tratamento 1/5000 (g/mL) de extrato de *B. dracunculifolia* em 12 hora de exposição.

1 **IV. Desempenho animal e atividades antioxidantes das rações e do músculo de**
2 **Zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com adição de *Baccharis dracunculifolia*, óleo**
3 **vegetal de caju (*Anacardium occidentale* L) e óleo essencial de cravo-da-Índia**
4 **(*Caryophyllus aromaticus* L.)**

5
6 **Revista:** Animal Feed Science and Technology

7
8 **RESUMO.** Este trabalho foi realizado para avaliar o desempenho produtivo e os efeitos
9 antioxidantes no músculo de peixes zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com adição de
10 diferentes níveis do extrato de *Baccharis dracunculifolia*, óleo vegetal da castanha do caju e
11 óleo essencial da folha do Cravo-da-Índia na dieta. Os tratamentos foram: Controle (CON),
12 sem adição de compostos naturais; Controle Positivo (CON+), com adição de 50 g / kg de ração
13 de BHT; MIX1, adição de 50 g / kg de ração de mistura com 60% de *B. dracunculifolia* + 39%
14 óleo vegetal da castanha do caju + 1% óleo essencial da folha do Cravo-da-Índia; MIX2, adição
15 de 50 g / kg de ração de mistura com 70% de *B. dracunculifolia*, 29% óleo vegetal da castanha
16 do caju, 1% óleo essencial da folha do Cravo-da-Índia; MIX3, adição de 50 g / kg de ração de
17 mistura com 90% de *B. dracunculifolia* + 9% óleo vegetal da castanha do caju + 1% óleo
18 essencial da folha do Cravo-da-Índia e MIX4, adição de 50 g / kg de ração de mistura com 99%
19 de *B. dracunculifolia* + 0,9% óleo vegetal da castanha do caju + 0,1% óleo essencial da folha
20 do Cravo-da-Índia. Não foi observado diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para as medidas
21 de pH, condutividade específica da água e sólidos dissolvidos totais, exceto para quantidade de
22 oxigênio dissolvido. O peso vivo inicial e final não foram alterados ($P>0,05$) pela adição de
23 compostos naturais, mas o ganho médio diário foi menor para o MIX4. Para as análises de
24 atividades antioxidantes das rações, não houve efeito ($P>0,05$) entre os tratamentos para o teste
25 de DPPH, mas com o método de ABTS, os tratamentos CON e CON+ apresentaram menores
26 ($P<0,05$) atividades antioxidantes. O tratamento CON+ apresentou a melhor ação antioxidante

27 no músculo do peixe para o sequestro de radical livre DPPH, seguido pelo o tratamento o MIX4
28 (57,4%) e CON (55,2%). Pelo método de sequestro de radical livre ABTS, os tratamentos
29 MIX2 e MIX4 apresentaram a melhor ação antioxidante (com 63,6 e 65,5%) de sequestro de
30 radical livre. Em conclusão, extratos de *B. dracunculifolia*, óleo vegetal da castanha do caju e
31 óleo essencial da folha do cravo-da-Índia poderiam ser incorporados às dietas de Zebrafish para
32 melhorar o poder antioxidante das dietas e do músculo dos peixes.

33 **Palavra-chave:** compostos bioativos, extratos naturais, produção animal, radical livre

34

35 **ABSTRACT.** This work was carried out to evaluate the animal growing performance and the
36 antioxidant effects in Zebrafish fish fed with the addition of different levels of the extract of
37 *Baccharis dracunculifolia* and vegetable oils of cashew nuts and clove leaf essential oil in the
38 diet. The treatments were: Positive Control (CON +), with addition of 50 g of BHT/kg of ration;
39 MIX1, addition of 50 g of blend/kg of ration with 60% *B. dracunculifolia* + 39% cashew
40 vegetable oil + 1% clove leaf essential oil; MIX2, addition of 50 g of blend / kg of ration with
41 70% of *B. dracunculifolia*, 29% cashew vegetable oil, 1% clove leaf essential oil; MIX3,
42 addition of 50 g of blend / kg of ration with 90% of *B. dracunculifolia* + 9% cashew nut
43 vegetable oil + 1% clove leaf essential oil and MIX4, addition of 50 g of blend / kg of ration
44 with 99% of *B. dracunculifolia* + 0.9% cashew vegetable oil + 0.1% clove leaf essential oil.
45 No difference ($P>0.05$) was observed between the treatments for the pH, water specific
46 conductivity and total dissolved solids, except for the amount of dissolved oxygen. The initial
47 and final live weight did not change ($P>0.05$) by the addition of natural compounds, but the
48 average daily gain was lower for MIX4. No effect ($P>0.05$) was observed for the analyzes of
49 antioxidant activities of the diets, but with the ABTS method, the CON and CON + treatments
50 presented lower ($P<0.05$) antioxidant activity. CON+ treatment presented the best antioxidant
51 action in the fish muscle for free radical scavenging with DPPH, followed by the treatment

MIX4 (57.4%) and CON (55.2%). Using the ABTS free radical scavenging method, the MIX2 and MIX4 treatments presented the best antioxidant activities (with 63.6 and 65.5%) of free radical scavenging. In conclusion, *B. dracunculifolia* extracts, cashew nut vegetable oils and clove leaf essential oil could be incorporated into Zebrafish diets to improve the antioxidant power of fish diets and muscle.

Keywords: bioactive compounds, natural extracts, animal production, free radical

58

59 1. Introdução

60

Os aditivos para produtos destinados à alimentação animal são definidos como substâncias adicionadas às rações para desempenhar funções específicas, como, antioxidantes, corantes, intensificadores de sabor, edulcorantes, emulsionantes, estabilizantes, conservantes entre outros, podendo ser naturais, idênticos aos naturais ou sintéticos (Decreto nº 55871, 1965). Os aditivos naturais são substâncias encontradas em alimentos, os quais são extraídos com a possibilidade de serem utilizados tanto na alimentação humana, como em dietas para animais. Os aditivos idênticos aos naturais são substâncias produzidas sinteticamente; porém, são iguais às substâncias que ocorrem naturalmente, um exemplo é o ácido benzoico, o qual é comumente usado na alimentação humana como conservante alimentar e em ração animal como potenciador zootécnico. Já os aditivos sintéticos são produzidos em laboratórios (Nunes et al., 2018).

Os aditivos artificiais, como, hidroxianisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato (PG) e tert-butil-hidroquinona (TBHQ) são amplamente utilizados na indústria alimentícia, bem como em dietas para animais (Fasseas et al., 2008) por apresentarem atividade antioxidante e antimicrobiana (Collins & Charles, 1987; Raccach, 1984). Todavia, nos últimos anos, houve um aumento considerável na descoberta de compostos naturais com

77 atividade antioxidante e antimicrobiana para o uso na alimentação humana e na alimentação
78 animal, com o intuito de substituição aos aditivos sintéticos, por estarem sofrendo uma restrição
79 devido à sua carcinogenicidade (Lorenzo et al., 2018; Pateiro et al., 2018).

80 Esses compostos naturais tem origem a partir do metabolismo secundários de plantas e
81 estão presentes em óleos essenciais (OE), óleos vegetais (OV) e outros tipos de extratos
82 utilizando solventes, podendo ser obtidos de várias partes de uma planta, incluindo folhas,
83 flores, sementes, raízes e cascas (Benchaar et al., 2008). Esses extratos apresentam de 20 a 60
84 componentes em diferentes concentrações, sendo caracterizados por dois ou três compostos em
85 concentrações mais elevadas, sendo que o composto em maior concentração determina as
86 propriedades biológicas dos extratos (Bakkali et al., 2008).

87 O extrato hidroalcoólico de *Baccharis dracunculifolia*, apresenta terpenos (baccharin),
88 isopropanol, flavonoides (isosakuranetin, aromadendrin-4'-metil ether) e ácido fenólico
89 (artepelin C, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico), tendo o artepelin C como o
90 composto principal (Campos et al., 2016; Veiga et al., 2017). O óleo vegetal da castanha do
91 caju, apresenta uma mistura de ácido anacárdico, cardanol e vestígios de cardol e 2-metilcardol,
92 podendo ser considerado um subproduto dos recursos naturais sustentável, de baixo custo e
93 largamente disponível no setor do caju (Trevisan et al., 2006). O óleo essencial da folha do
94 Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) apresenta como composto majoritário o eugenol (4-
95 alil-2-metoxifenol) que possui forte atividade inseticida, antioxidante, antifúngica e
96 antimicrobiana (Chaieb et al., 2007; Mulla et al., 2017). No entanto, poucos estudos com a
97 combinação destes compostos naturais e seus possíveis efeitos sob o desempenho animal são
98 encontrados.

99 Desta forma, o desenvolvimento deste trabalho tem como objetivo realizar a avaliação
100 do desempenho produtivo e seus possíveis efeitos antioxidantes no músculo de peixes zebrafish

101 alimentados com adição de misturas em diferentes níveis de *Baccharis dracunculifolia*, OV da
102 castanha do caju e OE da folha do cravo-da-Índia na dieta.

103

104 **2. Material e métodos**

105

106 Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Estadual
107 de Maringá (CEUA), seguindo o protocolo 6119170518 e realizado no laboratório Peixegen da
108 Universidade Estadual de Maringá.

109

110 *2.1. Origem dos compostos naturais*

111

112 A *Baccharis dracunculifolia* foi coletado na região da cidade de Maringá, Estado do
113 Paraná, Brasil, em agosto de 2017 (final do inverno e início da primavera). Na sequência, o
114 material foi levado para o Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal, onde foi realizada a
115 secagem da planta inteira sem as raízes em estufa de circulação forçada a 40° C, evitando
116 perdas de compostos voláteis por temperatura, por 72 horas. Em seguida foi realizado a
117 moagem da planta em moinho faca com peneira de 1 mm de espessura. Após o processamento,
118 a planta seca e moída foi armazenada em saco plástico envolto por alumínio em temperatura
119 de 4°C, evitando exposição a luz, calor e ao oxigênio, reduzindo possíveis deterioração para o
120 uso posterior.

121 O óleo vegetal da castanha do caju foi adquirido da empresa Safeeds Nutrição Animal®
122 (Cascavel, Estado do Paraná, Brasil) e o óleo essencial da folha do Cravo-da-Índia foi adquirido
123 da empresa Ferquima® (Vargem Grande Paulista, Estado de São Paulo, Brasil). Os óleos
124 estavam na forma líquida e foram armazenados em temperatura de 4°C, evitando possíveis
125 perdas de compostos voláteis, para o uso posterior.

126

127 *2.2. Local, animais e instalações*

128

129 O estudo foi realizado no Laboratório de Zebrafish do Núcleo de Pesquisa PeixeGen –
130 Manejo, melhoramento genético e genética molecular em piscicultura de água doce, localizado
131 no Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, durante um período de
132 30 dias.

133 Foram utilizados 120 peixes da espécie Zebrafish com 4 meses de idade, distribuídos
134 aleatoriamente em 6 aquários, sendo 20 animais por aquário, formando assim, grupos
135 homogêneos conforme o peso. Inicialmente, os animais foram pesados e medidos com auxílio
136 de uma balança analítica e um paquímetro digital, respectivamente.

137 Os animais foram alojados em aquários com dimensões de 37 cm de comprimento, 23
138 cm de largura e 28 cm de profundidade, com capacidade de 20 litros. Permaneceram em
139 ambiente com aeração constante, ciclo de iluminação 14-10 horas de claro-escuro e
140 temperatura entre 26 e 28°C, conforme recomendado para espécie. Além disso, a cada três dias
141 foi realizado troca parcial (30%) de água dos aquários. E a cada dois dias, foi realizada a
142 verificação da qualidade da água dos aquários, por meio de mensuração do pH, condutividade
143 específica (SPC, $\mu\text{S} / \text{cm}$), sólidos dissolvidos totais (TDS, mg / L), oxigênio dissolvido (O_2 ,
144 mg / L), e temperatura (T, °C), utilizando um aparelho de avaliação multiparâmetros YSI.

145

146 *2.3. Dietas e tratamentos*

147

148 Os animais foram submetidos a um período de sete dias de adaptação, antes do início
149 do período experimental. A ração foi fornecida três vezes ao dia (9:00 am, 2:00 pm e 5:00 pm)
150 até a saciedade aparente, com dietas contendo a adição ou não de compostos naturais. Os

151 tratamentos experimentais foram: Controle (CON), sem adição de compostos naturais;
 152 Controle Positivo (CON+), com adição de 50 g / kg de ração de BHT diluído em etanol, sendo
 153 um grama de BHT para 100 mL de etanol; MIX1, com adição de 50 g / kg de ração do Mix 1
 154 (60% de *B. dracunculifolia*, 39% óleo vegetal da castanha de caju, 1% óleo essencial da folha
 155 do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX2, com adição de 50 g / kg de ração do Mix 2 (70%
 156 de *B. dracunculifolia*, 29% óleo vegetal da castanha de caju, 1% óleo essencial da folha do
 157 cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX3, com adição de 50 g / kg de ração do Mix 3 (90% de
 158 *B. dracunculifolia*, 9% óleo vegetal da castanha de caju, 1% óleo essencial da folha do cravo-
 159 da-Índia) diluído em etanol; MIX4, com adição de 50 g / kg de ração do Mix 4 (99% de *B.*
 160 *dracunculifolia*, 0,9% óleo vegetal da castanha de caju, 0,1% óleo essencial da folha do cravo-
 161 da-Índia) diluído em etanol. Sendo que a diluição das misturas foi realizada na proporção 1 g
 162 de mistura para 100 mL de etanol (99,9% de pureza), em seguida foi filtrado (Tabela 1).

163

164 **Tabela 1.** Composição de misturas com compostos naturais (extrato de *Baccharis*
 165 *dracunculifolia*, óleo vegetal da castanha de caju e óleo essencial da folha do Cravo-da-Índia

Tratamentos	Extrato <i>Baccharis</i> <i>dracunculifolia</i> , %	Óleo vegetal da castanha de caju, %	Óleo essencial da folha do Cravo-da- Índia,%
MIX1	60	39	1
MIX2	70	29	1
MIX3	90	9	1
MIX4	99	0,9	0,1

166

167 A dieta base foi formulada sem produto antioxidante (Tabela 2), o BHT e as misturas
 168 de compostos naturais foram adicionados à dieta após a extrusão, por meio de aspersão,
 169 conforme os níveis estabelecidos. Durante o período experimental, as dietas testes foram

170 armazenadas em temperatura ambiente e em recipientes escuros impedindo exposição à luz,
 171 para que não houvesse possíveis perdas dos compostos naturais.

172

173 **Tabela 2.** Formulação da dieta base utilizada no estudo

Ingredientes	Quantidade (g / kg)
Farelo de soja	304,00
Fubá de milho	237,23
Glúten de milho	145,02
Farinha de vísceras de aves	99,23
Farinha de penas	80,00
Quirera de arroz	50,00
Fosfato bicálcico	49,56
Glúten de trigo	10,00
L-Lisina	7,56
Sal comum	5,00
Premix ¹	5,00
DL-Metionina	2,93
L-Treonina	1,30
Cloreto de colina	1,00
Antifúngico	1,00
Vitamina C	1,00
L-Triptofano	0,47

174 ¹Níveis garantidos por quilo de produto: vit. A – 500,000 IU; vit. D3 – 200,00 IU; vit. E – 5,000 mg; vit. K3 –
 175 1000mg; vit. B1 – 1,500mg; vit. B2 – 1,500mg; vit. B6 1,500mg; vit. B12 – 4,000mg; ácido fólico – 500mg;
 176 pantotenato de cálcio – 4000mg; biotina – 50mg; inositol – 10,000; nicotinamida – 7,000; colina – 40,000mg;
 177 cobalto – 10mg; cobre – 500mg; ferro – 5,000mg; iodo – 50mg; manganês – 1,500mg; selênio – 10mg; zinco –
 178 5,000mg.

179

180 *2.4. Desenvolvimento animal*

181

182 Ao final do estudo, os animais foram submetidos à eutanásia por choque térmico em
183 gelo e posteriormente pesados e mensurado o comprimento, onde se obteve os parâmetros de
184 desempenho produtivo, como peso vivo inicial (PVI), peso vivo final (PVF), ganho de peso
185 diário (GPD) (ganho de peso diário = (peso vivo final – peso vivo inicial) / dias de experimento),
186 comprimento inicial (CI) e comprimento final (CF).

187

188 2.5. Atividade antioxidante da ração e do músculo do Zebrafish (*Danio rerio*)

189

190 Os animais foram esviscerados e agrupados em três “pools” por tratamentos, tendo 3 g
191 por *pools*, para a realização das análises de atividade antioxidante do músculo. A extração dos
192 compostos bioativos da ração e do músculo foi realizada através da utilização de metanol
193 (99,9% de pureza). Após as extrações, as amostras foram centrifugadas (4000 rpm por 15 min),
194 filtradas e os extratos foram utilizados para as análises.

195 O método de DPPH foi realizado de acordo com Li et al. (2009). Onde foi misturado
196 150 µL de amostras com 2850 µL de uma solução metanólica contendo DPPH (60 µM) e
197 colocado em ambiente escuro por 30 minutos para reagir. A absorvência foi medida a 515 nm
198 e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem.

199 O ensaio ABTS foi conduzido de acordo com Re et al. (1999). O ABTS+ foi gerado
200 pela interação de 7 mM ABTS (5 mL) com persulfato de potássio 140 mM (88 µL). A mistura
201 foi incubada no escuro em temperatura ambiente durante 16 h. O radical ABTS foi diluído em
202 etanol até uma absorvência de $0,70 \pm 0,02$. Foi realizada a mistura de 40 µL de amostras com
203 1960 µL de solução ABTS+, após seis minutos de descanso em ambiente escuro foi realizada
204 a leitura da atividade de sequestro de radical livre em espectrometria a 734 nm, sendo expressos
205 os resultados em porcentagem.

206

207 *2.6. Análise de estatística*

208

209 Aquário foi considerado como unidade experimental para todas as análises. Os dados
210 quantitativos foram analisados utilizando o procedimento MIXED do SAS (SAS Institute Inc.,
211 Cary, NC, EUA). Todos os dados foram analisados por meio da aproximação de Satterthwaite
212 para determinar o denominador df para testes de efeitos fixos. Declarações-modelo para
213 resultados iniciais e finais de peso corporal e ganho médio diário continham os efeitos do
214 tratamento como uma covariável independente. A estrutura de covariância utilizada foi
215 autorregressiva de primeira ordem, que forneceu o menor critério de informação de Akaike e,
216 portanto, o melhor ajuste para todas as variáveis analisadas. Todos os resultados são relatados
217 como médias de mínimos quadrados, ajustadas por covariância, e a significância foi
218 estabelecida em $P \leq 0,05$.

219

220 **3. Resultados**

221

222 A qualidade da água foi monitorada ao longo do desenvolvimento do trabalho (Tabela
223 3). Não foi observado diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos para as medidas de pH,
224 condutividade específica da água e sólidos dissolvidos totais. Entretanto, o tratamento MIX3
225 apresentou maior ($P < 0,05$) quantidade de oxigênio dissolvido (5,07 mg / L). Porém, os valores
226 observados ficaram dentro do limite determinado para espécie (acima de 4,0 mg / L). Para as
227 medidas de temperatura não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

228 **Tabela 3.** Parâmetros de qualidade da água dos aquários de Zebrafish (*Danio rerio*)

229 alimentados com adição de compostos naturais na dieta

Parâmetros	CON	CON+	MIX1	MIX2	MIX3	MIX4	SEM	P<Value
pH	6,60	6,62	6,59	6,60	6,62	6,61	0,09	0,99
Condutividade específica, $\mu\text{S} / \text{cm}$	62,5	62,7	62,3	62,8	64,6	63,6	1,09	0,69
Sólidos dissolvidos, mg / L	40,6	40,9	40,6	40,8	42	41,3	0,71	0,67
Oxigênio dissolvido, mg / L	4,39 ^b	4,31 ^b	4,51 ^b	4,74 ^{ab}	5,07 ^a	4,67 ^{ab}	0,09	0,01
Temperatura, °C	27,4	27,4	27,4	27,3	27,4	27,6	0,31	0,99

230 CON: Controle, sem adição de antioxidante; CON+: Controle Positivo, com adição de 50 g / kg de ração de BHT
 231 diluído em etanol; MIX1: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 1 (60% de *B. dracunculifolia*, 39% óleo de caju,
 232 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX2: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 2
 233 (70% de *B. dracunculifolia*, 29% óleo de caju, 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol;
 234 MIX3: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 3 (90% de *B. dracunculifolia*, 9% óleo de caju, 1% óleo essencial da
 235 folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX4: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 4 (99% de *B.*
 236 *dracunculifolia*, 0,9% óleo de caju, 0,1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; Números
 237 seguidos de letras minúsculas: diferença de estatística entre os tratamentos.

238 Neste estudo pode-se observar que o peso vivo inicial e final não foram alterados
 239 ($P>0,05$) devido a adição de *B. draunculifolia*, óleo vegetal da castanha do caju e óleo essencial
 240 da folha do cravo-da-Índia testados (Tabela 4). Ao contrário dos pesos inicial e final, os animais
 241 do tratamento MIX4 apresentaram menor ganho médio diário (0,0034 g / dia, $P<0,05$) (Tabela
 242 4). No entanto, quando comparado com os tratamentos CON, CON+, MIX2 e MIX3 não se
 243 observou diferença ($P>0,05$) entre tratamentos.

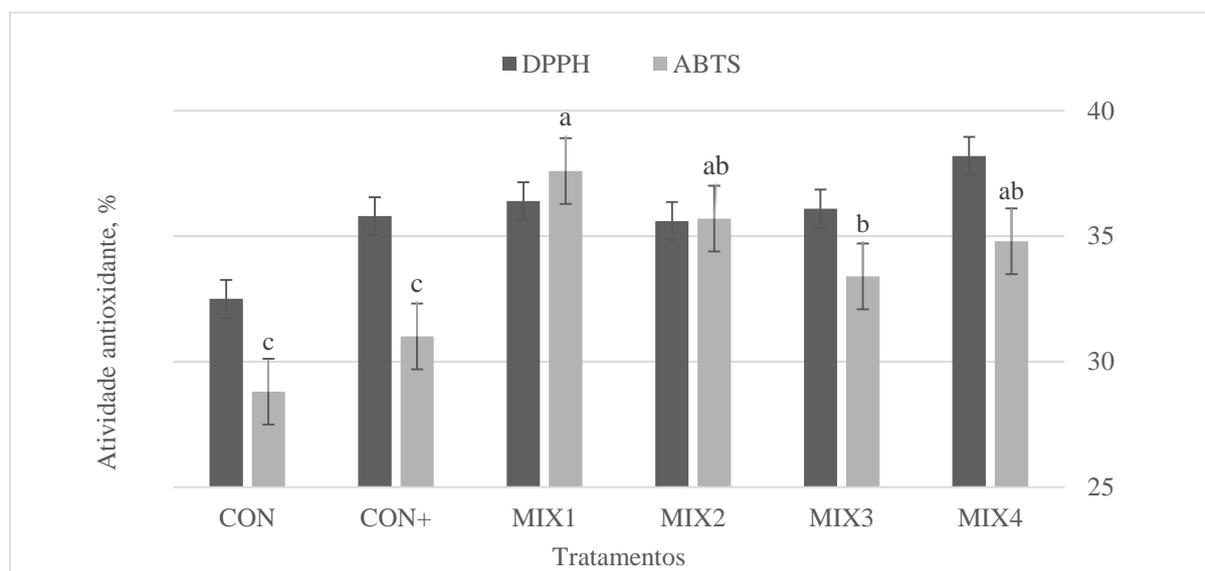
244 **Tabela 4.** Desempenho produtivo de Zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com adição de
 245 compostos naturais na dieta

Parâmetros	CON	CON+	MIX1	MIX2	MIX3	MIX4	SEM	P-Value
Peso vivo inicial, g	0,36	0,38	0,34	0,36	0,36	0,35	0,02	0,85
Peso vivo final, g	0,49	0,54	0,51	0,50	0,54	0,46	0,03	0,46
Ganho de peso diário, g / dia	0,0044 ^{ab}	0,0051 ^{ab}	0,0056 ^a	0,0046 ^{ab}	0,0059 ^a	0,0034 ^b	0,01	0,01
Comprimento inicial, mm	32,4	33,1	32,1	32,5	32,5	30,3	0,64	0,07

Comprimento final, mm 34,8 35,6 34,8 35,6 35,7 35,6 0,54 0,74

246 CON: Controle, sem adição de antioxidante; CON+: Controle Positivo, com adição de 50 g / kg de ração de BHT
 247 diluído em etanol; MIX1: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 1 (60% de *B. dracunculifolia*, 39% óleo de caju,
 248 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX2: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 2
 249 (70% de *B. dracunculifolia*, 29% óleo de caju, 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol;
 250 MIX3: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 3 (90% de *B. dracunculifolia*, 9% óleo de caju, 1% óleo essencial da
 251 folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX4: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 4 (99% de *B.*
 252 *dracunculifolia*, 0,9% óleo de caju, 0,1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; Números
 253 seguidos de letras minúsculas: diferença de estatística entre os tratamentos.

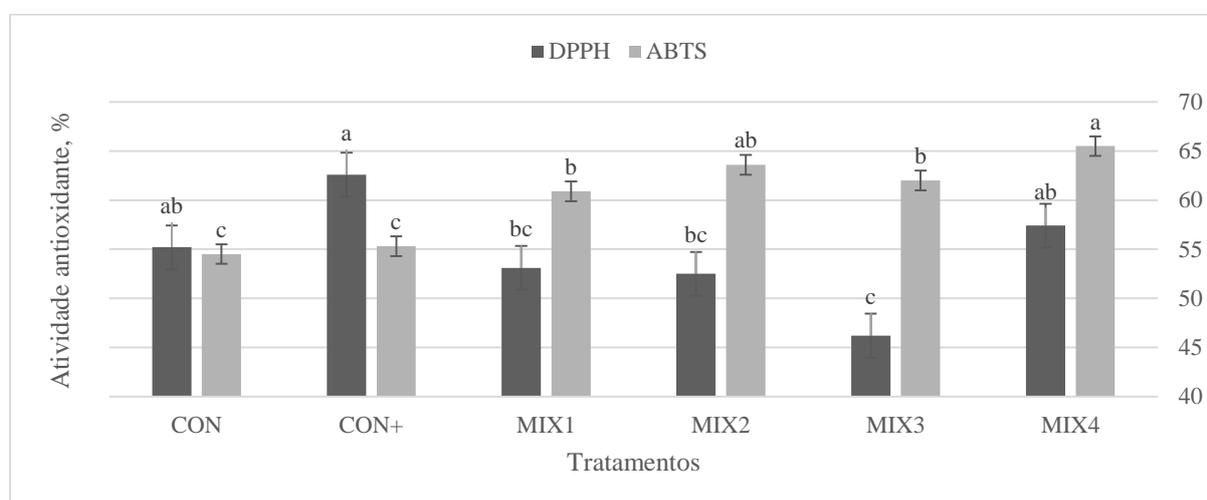
254 Para as análises de atividades antioxidantes das rações com adição de óleos essenciais
 255 e óleos vegetais e extrato de *B. dracunculifolia*, não houve efeito ($P>0,05$) entre os tratamentos
 256 para o teste de DPPH (Figura 1). Por outro lado, ao testar as atividades antioxidantes pelo
 257 método de radical livre ABTS, os tratamentos CON e CON+ (sem adição de compostos
 258 naturais) apresentaram menor ($P<0,05$) atividade antioxidante do que os tratamentos com
 259 adição de compostos naturais.



260
 261 **Figura 1.** Atividade antioxidante dos radicais livres DPPH e ABTS na ração de zebrafish com
 262 adição de compostos naturais

263 CON: Controle, sem adição de antioxidante; CON+: Controle Positivo, com adição de 50 g / kg de ração de BHT
 264 diluído em etanol; MIX1: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 1 (60% de *B. dracunculifolia*, 39% óleo de caju,
 265 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX2: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 2
 266 (70% de *B. dracunculifolia*, 29% óleo de caju, 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol;
 267 MIX3: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 3 (90% de *B. dracunculifolia*, 9% óleo de caju, 1% óleo essencial da
 268 folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX4: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 4 (99% de *B.*
 269 *dracunculifolia*, 0,9% óleo de caju, 0,1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; Colunas
 270 com letras minúsculas: diferença de estatística entre os tratamentos.

271 Em relação a atividade antioxidante do músculo do animal (Figura 2), houve efeito
 272 ($P < 0,05$) entre os tratamentos para as análises de DPPH e ABTS. Sendo que, o tratamento
 273 CON+ apresentou a melhor ação antioxidante para o sequestro de radical livre DPPH com
 274 62,6%, em seguida o tratamento o MIX 4 com 57,4% e o Controle com 55,2%. Entretanto, ao
 275 analisar ação antioxidante pelo método de rapto de radical livre ABTS os tratamentos MIX2 e
 276 MIX4 apresentaram a melhor ação antioxidante, com 63,6 e 65,5%.



277
 278 **Figura 2.** Atividade antioxidante dos radicais livres DPPH e ABTS do músculo de zebrafish
 279 alimentados com dietas com adição de compostos naturais

280 CON: Controle, sem adição de antioxidante; CON+: Controle Positivo, com adição de 50 g / kg de ração de BHT
 281 diluído em etanol; MIX1: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 1 (60% de *B. dracunculifolia*, 39% óleo de caju,
 282 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX2: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 2

283 (70% de *B. dracunculifolia*, 29% óleo de caju, 1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol;
284 MIX3: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 3 (90% de *B. dracunculifolia*, 9% óleo de caju, 1% óleo essencial da
285 folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; MIX4: Adição de 50 g / kg de ração do Mix 4 (99% de Alecrim-do-
286 Campo, 0,9% óleo de caju, 0,1% óleo essencial da folha do cravo-da-Índia) diluído em etanol; Colunas com letras
287 minúsculas: diferença de estatística entre os tratamentos

288

289 4. Discussão

290

291 O Zebrafish é um peixe pequeno de água doce tropical, muitas das características o
292 tornaram popular na aquariofilia, incluindo sua tolerância a grandes variações ambientais e a
293 facilidade de reprodução em cativeiro (Perry et al., 2010; Santos et al., 2016; Silveira et al.,
294 2012). Sendo assim, as medidas de parâmetros de qualidade de água (Tabela 3) obtidas ao
295 desenvolver do estudo ficaram dentro do recomendado para a melhor criação do animal em
296 laboratório (Avdesh et al., 2012; Perry et al., 2010).

297 O Zebrafish, nos últimos anos, está sendo utilizado para vários ensaios em laboratórios
298 para seu sequenciamento genético, desenvolvimento de novas linhagens específicas (Howe et
299 al., 2013; Perry et al., 2010) e testes mais precisos sobre novas drogas e compostos na
300 alimentação humana e animal (Santos et al., 2016; Seth et al., 2013; Silveira et al., 2012). Por
301 outro lado, os compostos naturais, atualmente, são utilizados na dieta animal com o intuito de
302 substituição aos aditivos sintéticos (Monteschio et al., 2017; Rivaroli et al., 2017; Souza et al.,
303 2019). A utilização desses compostos naturais na dieta pode promover melhora no trato
304 digestivo animal, assim melhorando o desempenho (Chrubasik et al., 2005; Muhl & Liebert,
305 2007; Santurio et al., 2007).

306 Na atualidade, os compostos mais testados são os óleos essenciais (Sary et al., 2019;
307 Souza et al., 2019) e extratos naturais de plantas (Shah et al., 2014). A cada dia novos extratos
308 de plantas estão sendo caracterizados e usados para o desenvolvimento de novos produtos em

309 substituição aos compostos sintéticos, entre eles os derivados da *Baccharis dracunculifolia*
310 (Bobek, 2015; Campos et al., 2016; Muro, 2015; Veiga et al., 2017). Dados da literatura
311 mostram que a *Baccharis dracunculifolia* em elevadas doses pode ser tóxica para diferentes
312 espécies animais (Driemeier et al., 2000; Marsh et al., 1920; Stegelmeier et al., 2009).

313 A *Baccharis draunculifolia* em altas concentrações, pode ter um efeito negativo no
314 desempenho animal, podendo, inclusive, determinar a morte dos animais (Driemeier et al.,
315 2000; Marsh et al., 1920; Stegelmeier et al., 2009). No entanto, neste estudo não foi observado
316 efeito adverso sobre o peso final do Zebrafish. Desta forma, o uso de doses baixas de *Baccharis*
317 *dracunculifolia* não altera o desempenho do Zebrafish. Entretanto, doses mais elevadas, como
318 no caso do MIX4, o desempenho foi reduzido (Tabela 4).

319 Com relação a análise de atividade antioxidante da ração e do músculo do Zebrafish,
320 dois métodos foram testados (DPPH e ABTS). Os radicais DPPH e ABTS têm sido amplamente
321 utilizados para avaliar as propriedades antioxidantes de produtos naturais, isso porque são
322 utilizados como fonte de radicais livres, uma vez que simula as espécies reativas de oxigênio,
323 nitrogênio e hidrogênio peroxidado que afetam os sistemas biológicos (Bendary et al., 2013;
324 Monteschio et al., 2017; Vital et al., 2018). Dessa forma, pode-se constatar que a incorporação
325 de óleo vegetal da castanha do caju, óleo essencial da folha do Cravo-da-Índia e extrato de *B.*
326 *dracunculifolia* confere uma real atividade antioxidante às dietas como demonstrado no figura
327 1.

328 A ação de compostos antioxidantes adicionados em dieta animal, podem ser
329 transferidos para o músculo (Monteschio et al., 2017). Conforme observado neste estudo
330 (figura 2), onde observou-se uma maior porcentagem de rapto de radical livre para o tratamento
331 MIX4. No entanto, os antioxidantes são tipicamente adicionados à ração em níveis moderados,
332 no entanto, altos níveis de inclusão podem levar a efeitos adversos, como a ação pró-oxidativa
333 (Martin & Appel, 2009).

334

335 **5. Conclusão**

336

337 Uma mistura de extrato de *Baccharis dracunculifolia*, óleo vegetal da castanha do caju
338 e óleos essenciais da folha do cravo-da-Índia poderia ser utilizado na dieta de peixes, tendo o
339 Zebrafish como modelo experimental, para melhor o desempenho animal e proteger as dietas
340 e o músculo do animal à oxidação lipídica, usando os métodos de sequestro de radical livre
341 DPPH e ABTS. Este composto poderia ser usado em substituição às moléculas e compostos
342 sintéticos que estão sendo proibidos no sistema de produção animal em respeito a
343 sustentabilidade do sistema de produção e à saúde dos animais e do ser humano.

344

345 **6. Agradecimentos**

346

347 Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
348 Nível Superior - CAPES (Brasília, Brasil). Os autores agradecem a empresa Safeeds Nutrição
349 Animal, Cascavel, Paraná, Brasil (Email: safeeds@safeeds.com.br) pelo financiamento e
350 fornecimento dos produtos utilizados nesta pesquisa, que foi possível para desenvolver este
351 trabalho. A menção de nomes comerciais ou produtos comerciais nesta publicação destina-se
352 exclusivamente a fornecer informações específicas e não implica recomendações ou endosso
353 por parte do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

354

355 **7. Referências**

356

- 357 Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Verdile,
358 G. (2012). Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an
359 introduction. *Journal of Visualized Experiments*, 69, 4196. doi:
360 <http://dx.doi.org/10.3791/4196>.
- 361 Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential
362 oils—a review. *Food and Chemical toxicology*, 46, 446-475. doi:
363 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- 364 Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A.
365 & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition
366 and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 209-228. doi:
367 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>.
- 368 Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I. & El Hady, S. (2013). Antioxidant and
369 structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals*
370 *of Agricultural Sciences*, 58, 173-181. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.aos.2013.07.002>.
- 371 Bobek, V. B. (2015). *Análise farmacobotânica comparativa de espécies de Baccharis*
372 *L.(Asteraceae) da região dos Campos Gerais*. Master of Science, Universidade Federal do
373 Paraná, Curitiba.
- 374 Campos, F. R., Bressan, J., Jasinski, V. C. G., Zuccolotto, T., Silva, L. E. & Cerqueira, L. B.
375 (2016). Baccharis (*Asteraceae*): Chemical constituents and biological activities. *Chemistry*
376 *& Biodiversity*, 13, 1-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201500363>.
- 377 Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. &
378 Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential
379 oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review.
380 *Phytotherapy Research*, 21, 501-506. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2124>.

- 381 Chrubasik, S., Pittler, M. H. & Roufogalis, B. D. (2005). Zingiberis rhizoma: a comprehensive
382 review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine*, 12, 684-701. doi:
383 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.009>.
- 384 Collins, M. A. & Charles, H. P. (1987). Antimicrobial activity of Carnosol and Ursolic acid:
385 two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Microbiology*, 4, 311-315.
386 doi: [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(87\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(87)80005-9).
- 387 Driemeier, D., Cruz, C. & Loretto, A. P. (2000). *Baccharis megapotamica* var *Weirii* poisoning
388 in Brazilian cattle. *Veterinary and Human Toxicology*, 42, 220-221.
- 389 Fasseas, M. K., Mountzouris, K. C., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. & Zervas, G. (2008).
390 Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry*,
391 106, 1188-1194. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.060>.
- 392 Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Matthews, L.
393 (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.
394 *Nature*, 496, 498-503. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12111>.
- 395 Li, W., Hydamaka, A. W., Lowry, L. & Beta, T. (2009). Comparison of antioxidant capacity
396 and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Central European*
397 *Journal of Biology*, 4, 499-506. doi: <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-009-0041-1>.
- 398 Lorenzo, J. M., Pateiro, M., Domínguez, R., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., Franco,
399 D. (2018). Berries extracts as natural antioxidants in meat products: A review. *Food*
400 *Research International*, 106, 1095-1104. doi:
401 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.005>.
- 402 Marsh, C. D., Clawson, A. B. & Eggleston, W. W. (1920). *Baccharis pteronioides* as a
403 poisonous plant of the southwest. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 57,
404 430-434.

- 405 Martin, K. R. & Appel, C. L. (2009). Polyphenols as dietary supplements: a double-edged
406 sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2, 1-12.
- 407 Monteschio, J. O., Souza, K. A., Vital, A. C. P., Guerrero, A., Valero, M. V., Kempinski, E.
408 M. B. C., Prado, I. N. (2017). Clove and rosemary essential oils and encapsuled active
409 principles (eugenol, thymol and vanillin blend) on meat quality of feedlot-finished heifers.
410 *Meat Science*, 130, 50-57. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.002>.
- 411 Muhl, A. & Liebert, F. (2007). Growth and parameters of microflora in intestinal and faecal
412 samples of piglets due to application of a phytogetic feed additive. *Journal of Animal*
413 *Physiology and Animal Nutrition*, 91, 411-418. doi: [https://doi.org/10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00668.x)
414 [0396.2006.00668.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00668.x).
- 415 Mulla, M., Ahmed, J., Al-Attar, H., Castro-Aguirre, E., Arfat, Y. A. & Auras, R. (2017).
416 Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film
417 for chicken meat packaging. *Food Control*, 73, 663-671. doi:
418 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.018>.
- 419 Muro, E. M. (2015). *Baccharis dracunculifolia na alimentação de frangos de corte*. Master of
420 Science, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.
- 421 Nunes, C. S., Kunamneni, A., Kumar, V. & Habte-Tsion, H.-M. (2018). Registration of food
422 and feed additives (enzymes) in the United States, Canada, and China *Enzymes in Human*
423 *and Animal Nutrition* (pp. 457-480): Elsevier. doi: [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00024-1)
424 [805419-2.00024-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00024-1).
- 425 Pateiro, M., Barba, F. J., Domínguez, R., Sant'Ana, A. S., Khaneghah, A. M., Gavahian, M.,
426 Lorenzo, J. M. (2018). Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in
427 meat and meat products: A review. *Food Research International*, 113, 156-166. doi:
428 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.014>.

- 429 Perry, S. F., Ekker, M., Farrel, A. P. & Brauner, C. J. (2010). *Zebrafish*. Amsterdam, Holanda:
430 Elsevier.
- 431 Raccach, M. (1984). The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: A review.
432 *Journal of Food Safety*, 6, 141-170. doi: [https://doi.org/10.1111/j.1745-](https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1984.tb00479.x)
433 [4565.1984.tb00479.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1984.tb00479.x).
- 434 Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999).
435 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free*
436 *Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237. doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
437 [5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- 438 Rivaroli, D. C., Ornaghi, M. G., Mottin, C., Prado, R. M., Ramos, T. R., Guerrero, A., Prado,
439 I. N. (2017). Essential oils in the diet of crossbred (½ Angus vs. ½ Nellore) bulls finished
440 in feedlot on animal performance, feed efficiency and carcass characteristics. *Journal of*
441 *Agricultural Science*, 9, 205-212. doi: <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v9n10p205-212>.
- 442 Santos, I. V. F., Duarte, J. L., Fernandes, C. P., Keita, H., Amado, J. R. R., Velázquez-Moyado,
443 J. A., Carvalho, J. C. T. (2016). Use of zebrafish (*Danio rerio*) in experimental models for
444 biological assay with natural products. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*,
445 10, 883-891. doi: <http://dx.doi.org/10.5897/AJPP2016.4662>.
- 446 Santurio, J. M., Santurio, D. F., Pozzatti, P., Moraes, C., Franchin, P. R. & Alves, S. H. (2007).
447 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a
448 sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural*, 37, 803-808.
- 449 Sary, C., Carbonera, F., Silva, M. C., Oliveira, M., Lewandowski, V., Todesco, H., Ribeiro, R.
450 P. (2019). Effect of clove (*Eugenia caryophyllus*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*)
451 essential oils in Nile tilapia diets on performance, antioxidant power and lipid oxidation in
452 filets. *Aquaculture Research*, 50, 673-679. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/are.13944>.

- 453 Seth, A., Stemple, D. L. & Barroso, I. (2013). The emerging use of zebrafish to model
454 metabolic disease. *Disease Models & Mechanisms*, 6, 1080-1088. doi:
455 <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.011346>.
- 456 Shah, M. A., Bosco, S. J. D. & Mir, S. A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat
457 and meat products. *Meat Science*, 98, 21-33. doi:
458 <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.020>.
- 459 Silveira, T. R., Schneider, A. C. & Hammes, T. O. (2012). Zebrafish: modelo consagrado para
460 estudos de doenças humanas. *Ciência e Cultura*, 64, 4-5. doi:
461 <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000200002>.
- 462 Souza, K. A., Monteschio, J. O., Mottin, C., Ramos, T. R., Pinto, L. A. M., Eiras, C. E., Prado,
463 I. N. (2019). Effects of diet supplementation with clove and rosemary essential oils and
464 protected oils (eugenol, thymol and vanillin) on animal performance, carcass characteristics,
465 digestibility, and behavior activities for Nellore heifers finished in feedlot. *Livestock
466 Science*, 220, 190-195. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2018.12.026>.
- 467 Stegelmeier, B. L., Sani, Y. & Pfister, J. A. (2009). *Baccharis pteronioides* toxicity in livestock
468 and hamsters. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21, 208-213. doi:
469 <https://doi.org/10.1177/104063870902100205>.
- 470 Trevisan, M. T. S., Pfundstein, B., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalter, B., Bartsch, H. &
471 Owen, R. (2006). Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*)
472 products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 188-
473 197. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2005.06.012>.
- 474 Veiga, R. S., Mendonça, S., Mendes, P. B., Paulino, N., Mimica, M. J., Lagareiro Netto, A. A.,
475 Marcucci, M. C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial
476 and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia*. *Journal of Applied
477 Microbiology*, 122, 911-920. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13400>.

478 Vital, A. C. P., Guerrero, A., Kempinski, E. M. B. C., Monteschio, J. O., Sary, C., Ramos, T.
479 R., Prado, I. N. (2018). Consumer profile and acceptability of cooked beef steaks with edible
480 and active coating containing oregano and rosemary essential oils. *Meat Science*, *143*, 153-
481 158. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.035>.