



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - REGIONAL JATAÍ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

**Kerolay Carrijo Silva**

***PASSIFLORA CINCINNATA* COMO ALTERNATIVA PARA CONSERVAÇÃO DE  
EMBRIÕES.**

**Jataí – GO**

**2024**

**Kerolay Carrijo Silva**

***PASSIFLORA CINCINNATA* COMO ALTERNATIVA PARA CONSERVAÇÃO DE  
EMBRIÕES.**

**Orientador (a): Dra. Mônica Ferreira Machado**

**Projeto apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biociência Animal, da Unidade  
Acadêmica de Ciências Agrárias,  
da Universidade Federal de Jataí  
(UFJ), como pré-requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre  
em Biociência Animal.**

**Linha de pesquisa:  
Biotecnologia e produção  
sustentável**

**JATAÍ – GO**

**2024**

## **Ata de defesa**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases do desenvolvimento embrionário do peixe ZebraFish. Fase de zigoto (1,2); Embriões durante a fase de clivagem (3-8); Período de blástula (9-14); Gastrulação (15-26); Neurulação (27-41); Período de farínula (42-50). ..... **Error! Bookmark not defined.**

Figura 2: A-Diferenças no Desenvolvimento Embrionário ( $\Delta$ HFPP), B-Significância Estatística das Diferenças (p-values). ..... 18

## LISTA DE TABELAS

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Fases de Desenvolvimento Embrionário .....                  | 13 |
| Tabela 2: Tempo de Exposição dos Embriões a <i>P.cincinnata</i> ..... | 18 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FET: Fish Embryo Toxicity

GABA: Ácido Gama-Aminobutírico

HMG: High Mobility Group

hpf: Horas Pós-Fertilização

mL: Milliliter

mg: Milligram

SOX: Sry-related HMG box

WHO: World Health Organization

## **SUMÁRIO**

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO .....</b>                                          | <b>7</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                        | <b>7</b>  |
| <b>1   CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA .....</b>      | <b>8</b>  |
| <b>2   CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO .....</b>                      | <b>9</b>  |
| <b>3   MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                         | <b>12</b> |
| 3.1 <i>Comitê de Ética .....</i>                             | <i>12</i> |
| 3.2 <i>Obtenção e Preparo do Material Vegetal.....</i>       | <i>12</i> |
| 3.3 <i>Coleta de Embriões de Zebrafish .....</i>             | <i>12</i> |
| 3.4 <i>Análise Estatística .....</i>                         | <i>14</i> |
| <b>4   RESULTADOS.....</b>                                   | <b>14</b> |
| 4.1 <i>Passiflora cincinnata.....</i>                        | <i>15</i> |
| <b>5   DISCUSSÃO.....</b>                                    | <b>18</b> |
| <b>6   IMPACTO DO TRABALHO NA SOCIEDADE .....</b>            | <b>20</b> |
| <b>7   CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b> | <b>21</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                      | <b>23</b> |

## RESUMO

Este trabalho investigou os efeitos do extrato de *Passiflora cincinnata* no desenvolvimento embrionário de zebrafish, com o objetivo de avaliar seu potencial biotecnológico na conservação e transporte de embriões de peixes. Os embriões foram expostos à *P. cincinnata* em um período de 1 hpf até 24 hpf de exposição, posteriormente foram retirados e avaliados quanto ao seu atraso no desenvolvimento. Os embriões expostos ao extrato apresentaram atrasos significativos nas fases de gástrula e segmentação, sem apresentar teratogênias evidentes. O estudo sugere que o extrato pode ser utilizado como uma ferramenta eficaz para retardar o desenvolvimento embrionário de peixes, permitindo novas abordagens em conservação e aquicultura. A segurança e a eficácia da *Passiflora cincinnata* reforçam seu potencial uso em biotecnologias reprodutivas. Estudos in silico corroboraram os resultados experimentais, identificando possíveis interações entre a vitexina e os genes SOX, que são cruciais para o desenvolvimento embrionário.

**Palavras-chave:** *Passiflora cincinnata*, desenvolvimento embrionário, zebrafish, vitexina, SOX, biotecnologia, conservação de embriões

## ABSTRACT

This study investigated the effects of *Passiflora cincinnata* extract on zebrafish embryonic development to assess its biotechnological potential in embryo conservation and aquaculture. Embryos exposed to the extract showed significant delays in the gastrula and segmentation stages without evident teratogenic effects. Comparisons with *Passiflora incarnata* indicated that *Passiflora cincinnata* has a more favorable safety profile, being less toxic to zebrafish embryos. The chemical composition of *Passiflora cincinnata*, rich in flavonoids such as vitexin and isovitexin, contributes to its antioxidant and anti-inflammatory effects, modulating embryonic development. In silico studies supported the experimental results, identifying potential interactions between vitexin and SOX genes, which are crucial for embryonic development. Applying this knowledge may lead to the development of new therapies and the use of natural compounds in regenerative medicine.

**Keywords:** *Passiflora cincinnata*, embryonic development, zebrafish, vitexin, SOX, biotechnology, embryo conservation

## 1 CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A atividade comercial da aquicultura vem crescendo exponencialmente, atingindo um recorde histórico de 214 milhões de toneladas de pescado em 2020. No Brasil, em 2023, foram produzidas 887.029 toneladas, das quais 263.479 toneladas correspondem a peixes nativos como tambaqui, pacu e pintado, representando 29,7% da produção total do país (FAO, 2022; PEIXE BR, 2024). Estima-se que até 2030 essa atividade crescerá ainda mais, com a intensificação dos processos de produção. Para isso, é necessário desenvolver novas técnicas de produção intensiva oferecendo suporte tecnológico a esse crescimento (Aliabad et al., 2022; Boyd et al., 2020; Kord et al., 2021; Peixe BR, 2024).

Nos últimos 50 anos, a aquicultura passou por um rápido desenvolvimento devido à aplicação da ciência e à introdução de novas tecnologias (Burnell & Allan, 2009). Essas biotecnologias têm o papel de promover uma expansão produtiva e corrigir problemas inerentes ao setor. A reprodução de peixes nativos é atualmente um dos principais desafios na cadeia produtiva, já que muitas espécies são migratórias e necessitam percorrer grandes distâncias para completar o processo de maturação gonadal. Nesse contexto, as biotecnologias aplicadas à reprodução podem contribuir significativamente para a melhoria dos parâmetros produtivos da aquicultura (Ayyappan, 2013).

Apesar dos avanços nas biotecnologias de reprodução de peixes, ainda existem muitos obstáculos na produção, especialmente em relação aos peixes tropicais. Entre esses entraves estão a sazonalidade da reprodução e a ausência de protocolos para conservação de embriões, dificultando a produção contínua de alevinos ao longo do ano. Além disso, a alta prolificidade das espécies gera uma produtividade elevada, mas limita o número de fêmeas induzidas devido à insuficiência de incubadoras para manter os embriões até o momento de transferência para os tanques escavados, que ocorre cinco dias após a fertilização, ou 120 horas. Uma solução seria o desenvolvimento de protocolos para retardar o desenvolvimento embrionário ou técnicas de resfriamento para armazenamento dos embriões.

A *Passiflora cincinnata*, amplamente conhecida por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, vem sendo investigada por sua capacidade de modular o crescimento celular, de modo que, estudos sugerem que seus compostos bioativos, especialmente os flavonoides vitexina e isovitexina, podem atuar na regulação de processos celulares fundamentais, como a proliferação e diferenciação celular. Essas substâncias exercem um efeito protetor nas células, reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação, o que pode retardar o desenvolvimento celular em modelos biológicos.

No contexto da conservação de embriões, essa ação moduladora apresenta potencial para o controle do crescimento embrionário, permitindo a preservação das células em condições controladas (Durazzo et al., 2019). Um método promissor para estudar as substâncias da *P. cincinnata* é o peixe zebra-fish *Danio rerio* modelo de embrião amplamente utilizado para testes de toxicidade e desenvolvimento embrionário, os embriões são modelos eficazes pelo seu rápido e alto desenvolvimento embrionário e a facilidade de observar os efeitos tóxicos e teratogênicos no embrião por sua transparência (Chahardehi, A., Arsad, H., & Lim, V. 2020).

Segundo Lavor et. al (2018) a *Passiflora cincinnata* possui ações antinociceptivas e tem um grande potencial na inibição da liberação de mediadores inflamatórios em camundongos. Sendo assim uma alternativa promissora para estudos mais aprofundado e até mesmo para a criação de novos protocolos em aquicultura e biotecnologia reprodutiva, contribuindo para a sustentabilidade do setor. Ressalta-se que essa biotecnologia precisa ser mais estudada para ser incorporada à rotina dos laboratórios, com foco na formação de bancos de germoplasma e no melhoramento genético, auxiliando assim na produção sustentável na piscicultura.

## 2 CAPÍTULO 2: INTRODUÇÃO

O conhecimento etnomedicinal é transmitido de geração em geração, garantindo que costumes e tradições sejam preservados ao longo dos anos. No entanto, é fundamental a sistematização e categorização científica para garantir o uso seguro. Assim, o levantamento de plantas e a identificação de suas localizações exatas auxiliam na redução do risco de extinção, bem como na descrição de uso por comunidades locais. Estratégias modernas de preservação da biodiversidade, como bancos de sequência e impressão digital, bibliotecas ou bancos de sementes para preservar a diversidade genética e espécies raras, são essenciais para a organização de dados para pesquisas (Aati et al., 2019).

O comércio de produtos à base de plantas medicinais é elevado em todo o mundo, estimando-se uma movimentação financeira de aproximadamente 83 bilhões de dólares. Antecipa-se um crescimento exponencial no comércio de plantas medicinais para os próximos anos. Os medicamentos fitoterápicos, feitos a partir de drogas vegetais e produtos processados de espécies medicinais, compõem cerca de 25% dos medicamentos atuais e 60% das drogas empregadas em terapias anticâncer (Brower, 2008).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta o uso de plantas medicinais (Brasil, 2008). Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde (MS) divulgou

a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), apresentando uma lista com 71 plantas medicinais. O documento ratifica a relevância das plantas medicinais no uso popular em saúde pública no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, 2009). Estudos utilizando a técnica de DNA barcode observaram que produtos à base de plantas medicinais comercializados frequentemente não continham a planta de origem em seu conteúdo, ou eram ausentes os compostos químicos específicos para obter os benefícios esperados, acarretando o uso de espécies desconhecidas e, em alguns casos, espécies sem efeito medicinal comprovado (Palhares et al., 2015). Portanto, pesquisas que elucidem a parte da planta a ser usada, indicação de uso e toxicidade são fundamentais para o uso seguro.

O gênero *Passiflora* é considerado o mais importante da família *Passifloraceae*, destacando-se na flora brasileira pelo seu amplo uso em fitoterapia, sendo o gênero *Passiflora* o mais encontrado no país (Barbosa, 2006). Composto por cerca de 400 espécies (Cronquist, 1981), apresenta um uso tradicional importante como ansiolítico e sedativo (Blumenthal et al., 2000; DerMarderosian & Beutler, 2002). Conhecida como maracujá-do-mato, maracujá-mochila ou maracujá-da-caatinga, a *Passiflora cincinnata* Mast. ocorre nas regiões de cerrado e caatinga, principalmente nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia. Esta espécie selvagem vem demonstrando grande potencial para a produção de sucos e polpas, além de ser utilizada como alimento funcional devido à sua rica composição de fitoquímicos, atraindo grande interesse na pesquisa e na diversificação do seu uso (Siebra et al., 2016).

Estudos sistemáticos realizados com as folhas de *Passiflora* mostram que esta é a parte mais científica, com a identificação de compostos fenólicos como orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina, utilizando técnicas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Gadioli et al., 2016). Os produtos derivados da *Passiflora* são conhecidos por serem uma boa fonte de alcaloides, compostos por fenólicos e poliaminas. Os compostos polifenólicos, destacando-se os flavonoides, são a classe química mais comum de fitoquímicos, possuindo uma vasta gama de benefícios para a promoção da saúde. Um composto flavonoide comum é a vitexina, que possui potencial antiglicante, antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral (Appel et al., 2011; Durazzo et al., 2019; Junqueira et al., 2005; Lephart et al., 2016; Nabavi et al., 2015; Wei et al., 2014; Yang et al., 2013; Zhaoming et al., 2020).

Segundo Lavor (2018), que avaliou a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Passiflora cincinnata* em camundongos, concluiu-se que o gênero possui grande atividade anti-inflamatória e potencial para ser utilizado como biofármaco. Apesar de o setor de pesquisa estar muito avançado, os estudos realizados com *Passiflora cincinnata* ainda são escassos (Araujo et al., 2008).

A *Passiflora cincinnata* tem demonstrado um promissor potencial anticancerígeno devido à presença de compostos bioativos, como flavonoides, alcaloides e saponinas, especialmente a vitexina e isovitexina, os quais, são capazes de inibir o crescimento celular descontrolado e promover a apoptose em células tumorais. Estudos indicam que a vitexina pode interferir em vias de sinalização cruciais para o desenvolvimento de tumores, como a via PI3K/Akt, que é responsável pela proliferação e sobrevivência celular (Lavor et al., 2018),

A *Passiflora cincinnata* demonstrou reduzir a viabilidade de células cancerosas, sem afetar significativamente as células saudáveis, sugerindo um efeito seletivo contra o câncer. Essas propriedades fazem dela uma candidata potencial para ser explorada como coadjuvante em terapias anticancerígenas, especialmente devido à sua ação moduladora no ciclo celular (Araujo et al., 2008, Lavor et al., 2018).

As biotecnologias da reprodução, como a aquicultura de espécies nativas e programas de reintrodução, podem ser utilizadas para enfrentar os desafios da extinção de espécies de peixes e da diminuição da biodiversidade. Essas biotecnologias auxiliam na preservação de estoques genéticos e na recuperação de habitats naturais (Agostinho et al., 2016).

O experimento para a avaliação de toxicidade em embriões de zebrafish (*Danio rerio*) representa uma alternativa segura como modelo experimental viável e com ótima reprodutibilidade para pesquisas científicas. Além disso, colabora na redução do uso de animais em modelos experimentais in vivo (Belanger et al., 2013; Lammer et al., 2009; Nagel, 2002). Os testes de toxicidade para o zebrafish seguem os mesmos critérios estabelecidos para outros modelos animais pela OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) e ISO (Organização Internacional de Normalização), sendo validado em pesquisa da OECD e adotado como OECD TG 236 (Braunbeck et al., 2015; ISO, 2007; OECD, 2013).

O *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae), conhecido como peixe paulistinha ou zebrafish, é um pequeno peixe tropical de água doce de origem asiática, encontrado principalmente na Índia, Bangladesh e Nepal, em regiões de clima de monções caracterizadas por áreas alagadiças. Vive em média três anos e atinge no máximo 5 cm de comprimento. É onívoro e apresenta comportamento pacífico, dócil e ativo. Utilizado apenas com finalidade ornamental por muito tempo, hoje é encontrado em biotérios acadêmicos para fins experimentais (Dai et al., 2014; Lawrence, 2007; Lawrence & Mason, 2012).

O peixe apresenta elevadas taxas de fertilidade, rápido desenvolvimento embrionário, intervalo de tempo intergestacional curto e genoma com aproximadamente 70% de homologia com espécies de mamíferos, sendo sequenciado pelo Instituto Sanger em 2001 (Howe et al., 2013; Postlethwait et al., 2000). Por esses motivos, tem sido amplamente utilizado em diversas

áreas do conhecimento, como ciências da saúde (Horie et al., 2017; Lieschke & Currie, 2007; Perkins et al., 2013), ecotoxicologia (Almond & Trombetta, 2016; Martins et al., 2007) e biologia do desenvolvimento (Elkouby, 2017; Lele & Krone, 1996; Solnica-Krezel et al., 1995). Destacam-se também estudos de genética (Aguirre-Martínez et al., 2017; Ceol & Houvras, 2016; Kint et al., 2013; Varshney et al., 2015).

Kimmel et al. (1995) descreveram todas as fases do desenvolvimento embrionário do zebrafish, desde o estágio de zigoto até a eclosão da larva e peixe adulto, com distinção de todos os estágios de formação do tecido nervoso. É definido que a amostra tenha no mínimo 20 embriões, testados em cinco concentrações diferentes em placas de 24 ou 96 poços, para que possíveis teratogênias sejam observadas em 144 hpf (Beekhuijzen et al., 2015; Lammer et al., 2009; Selderslaghs et al., 2009).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Comitê de Ética**

Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Jataí (UFJ) sob o Protocolo N° 015/23.

#### **3.2 Obtenção e Preparo do Material Vegetal**

As amostras de extrato mole de *Passiflora cincinnata* foram preparadas no Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Bioprodutos (PD&I Bioprodutos) localizado na Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás.

#### **3.3 Coleta de Embriões de Zebrafish**

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Peixes (Labfish), localizado no prédio de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Jataí. O experimento com zebrafish foi realizado com embriões provenientes de peixes adultos mantidos em condições ideais. Os peixes foram mantidos em biotério, conforme descrito por Westerfield (2000). Foram utilizados 40 fêmeas e 20 machos em aquários com sistema de

recirculação de água ( $28,5 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo de luz/escuro (14/10 horas), alimentados quatro vezes ao dia com ração comercial flocular (FlakesFood®) e duas vezes ao dia com artêmias.

Os embriões obtidos da reprodução foram coletados e transferidos para placas de Petri com meio E3, sendo classificados como bons, intermediários, ruins e não fecundados (Valadares et al., 2023). Esse processo foi realizado durante a primeira hora pós fertilização (hpf). Após a seleção os embriões foram transferidos para incubadoras contendo meio E3, com oxigenação constante (Paula et al., 2014). Cada incubadora continha volume total de 300 mL de meio E3 diluído ou não com *P. cincinnata*, sendo que para cada embrião havia 0,39 ml de meio. O meio E3 do tratamento, continha a concentração de 500 mg/L de *P. cincinnata*. Foi realizado uma triplicada do experimento, havendo 3 incubadoras contendo *P. cincinnata* e três incubadoras contendo apenas meio E3, considerados controles. Foram selecionados 117 embriões bons por incubadora, totalizando 702 embriões para realização do procedimento experimental. Durante esse período, foram definidos momentos de avaliação diferentes (Tabela 1), e a cada momento de avaliação, dez embriões foram retirados e transferidos para uma placa de 96 poços contendo 2 mL de meio E3, para identificação de possíveis atrasos do desenvolvimento embrionário.

Tabela 1: Período e fases de desenvolvimento dos embriões (hpf) expostos à 500 mg/ml de *P. cincinnata*, durante 24 horas, com seus respectivos tempos de exposição ao extrato.

| Período de desenvolvimento embrionário | Identificação numéricas das fases de desenvolvimento embrionário avaliados | Fase de Desenvolvimento | Horas pós fertilização (hpf) | Tempo de exposição do embrião à <i>P. cincinnata</i> (horas)          | Descrição                                                                                     |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Clivagem                               |                                                                            | 48 células              | 1 hpf                        | Momento de seleção dos embriões para exposição à <i>P. cincinnata</i> |                                                                                               |
| Clivagem                               | 1                                                                          | 64 células              | 2 hpf                        | 1                                                                     | O zigoto se divide em várias células (blastômeros), sem aumento do volume total.              |
| Blástula                               | 2                                                                          | High ou alto            | 3 hpf                        | 2                                                                     | Formação de uma esfera oca com várias células ao redor de uma cavidade chamada blastocele.    |
| Blastula                               | 3                                                                          | Dome ou domo            | 4 hpf                        | 3                                                                     | As células começam a se reorganizar na superfície da blástula, formando uma cúpula ou "dome". |
| Gastrula                               | 4                                                                          | Anel germinativo        | 5 hpf                        | 5                                                                     | Início do processo de gratulação, onde as três camadas germinativas começam a se formar.      |
| Gastrula                               | 5                                                                          | 80% Epibolia            | 8 hpf                        | 7                                                                     | Movimento celular intenso, com células cobrindo cerca de 80% da superfície do embrião.        |

|             |    |                          |        |      |                                                                                           |
|-------------|----|--------------------------|--------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gastrula    | 6  | Fase de broto neural     | 10 hpf | 9    | Formação de estruturas precursoras dos tecidos e órgãos, como o broto neural.             |
| Segmentação | 7  | Fase 1 somito            | 11 hpf | 9:20 | Aparecimento dos primeiros somitos, estruturas que darão origem aos músculos e esqueleto. |
| Segmentação | 8  | Fase 5 somitos           | 12 hpf | 11   | Formação de 5 somitos, que são blocos de tecido mesodérmico ao longo do eixo do embrião.  |
| Segmentação | 9  | Fase 16 somitos          | 18 hpf | 17   | Formação de 16 somitos, continuando a segmentação do corpo.                               |
| Farínghula  | 10 | Fase de Faringula - Prim | 24 hpf | 23   | Desenvolvimento das estruturas da faringe e início da organogênese, com esboço de órgãos. |

Fonte: adaptado de Kimmel et al. 1995 (Autora, 2024).

Após os tempos de exposição dos embriões à *P. cincinnata*, citados na tabela 1, os embriões foram retirados do extrato, avaliados quanto à sua morfologia, e transferidos para placas de 96 poços, contendo meio E3. Posteriormente, seguiu-se protocolo de avaliação baseados nos testes de embriotoxicidade da OECD (2004), sendo os embriões avaliados a cada 24 horas, durante 120 horas.

As avaliações morfológicas e cronológicas foram baseadas nas descrições realizadas por Kimmel et al. (1995). Para tanto os embriões durante as primeiras 24 horas, eram avaliados de acordo com a tabela 1. Baseando-se nesta tabela foi criado um score de pontuação para a avaliação de desenvolvimento embrionário por 120hpf (horas pós fertilização).

### 3.4 Análise Estatística

Para a análise estatística dos parâmetros de desenvolvimento embrionário, os dados foram inicialmente cadastrados em bancos de dados do MS Excel® e posteriormente exportados para o software estatístico R. Para o teste de significância, foi utilizada a estatística não paramétrica com o teste de Mann-Whitney. Para a verificação de normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro, justificando o uso da estatística não paramétrica.

## 4 RESULTADOS

#### 4.1 *Passiflora cincinnata*

Os resultados obtidos foram analisados considerando as mudanças nos estágios de desenvolvimento embrionário do zebrafish após a exposição ao extrato de *Passiflora cincinnata*. As fases de desenvolvimento foram cuidadosamente monitoradas e registradas, permitindo uma análise detalhada das alterações. A Tabela 2 compreende imagens com o tempo de exposição e os respectivos checkpoints.

Figura 2: Checkpoints e tempo de exposição.

| HORAS PÓS FERTILIZAÇÃO                                 | 2 horas pós fertilização                                                          | 3 horas pós fertilização                                                          | 4 horas pós fertilização                                                          | 5 horas pós fertilização                                                          | 8 horas pós fertilização                                                          | 10 horas pós fertilização                                                            | 12 horas pós fertilização                                                             | 18 horas pós fertilização                                                             | 24 horas pós fertilização                                                             | 25 horas pós fertilização                                                             | 27 horas pós fertilização                                                             | 28 horas pós fertilização                                                           |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Controle</b>                                        |  |  |  |  |  |    |    |    |    |    |    |  |
| <b>Blástula high</b><br>2 horas de exposição           |                                                                                   |  |  |  |  |    |    |    |    |    |                                                                                       |                                                                                     |
| <b>Blástula Dome</b><br>3 horas de exposição           |                                                                                   |                                                                                   |  |  |  |    |    |    |    |    |    |  |
| <b>Gástrula Anel de germe</b><br>4 horas de exposição  |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |  |  |    |    |    |    |    |    |  |
| <b>Gástrula 80% da Epiboly</b><br>7 horas de exposição |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |  |    |    |    |    |    |    |                                                                                     |
| <b>Gástrula Broto</b><br>9 horas de exposição          |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |  |  |  |  |  |  |                                                                                     |
| <b>Segmento 1 somito</b><br>11 horas de exposição      |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                      |  |  |  |  |  |                                                                                     |
| <b>Segmento 5 somito</b><br>17 horas de exposição      |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                      |                                                                                       |  |  |  |  |                                                                                     |

A tabela a seguir detalha o desenvolvimento embrionário em diferentes tempos de exposição, tanto para o grupo de controle quanto para o grupo tratado com *Passiflora cincinnata*.

Tabela 2: Tabela indicando o tempo de exposição dos embriões expostos à *P. cincinnata* comparando as fases de desenvolvimento embrionário do controle e do desenvolvimento embrionário após à exposição.

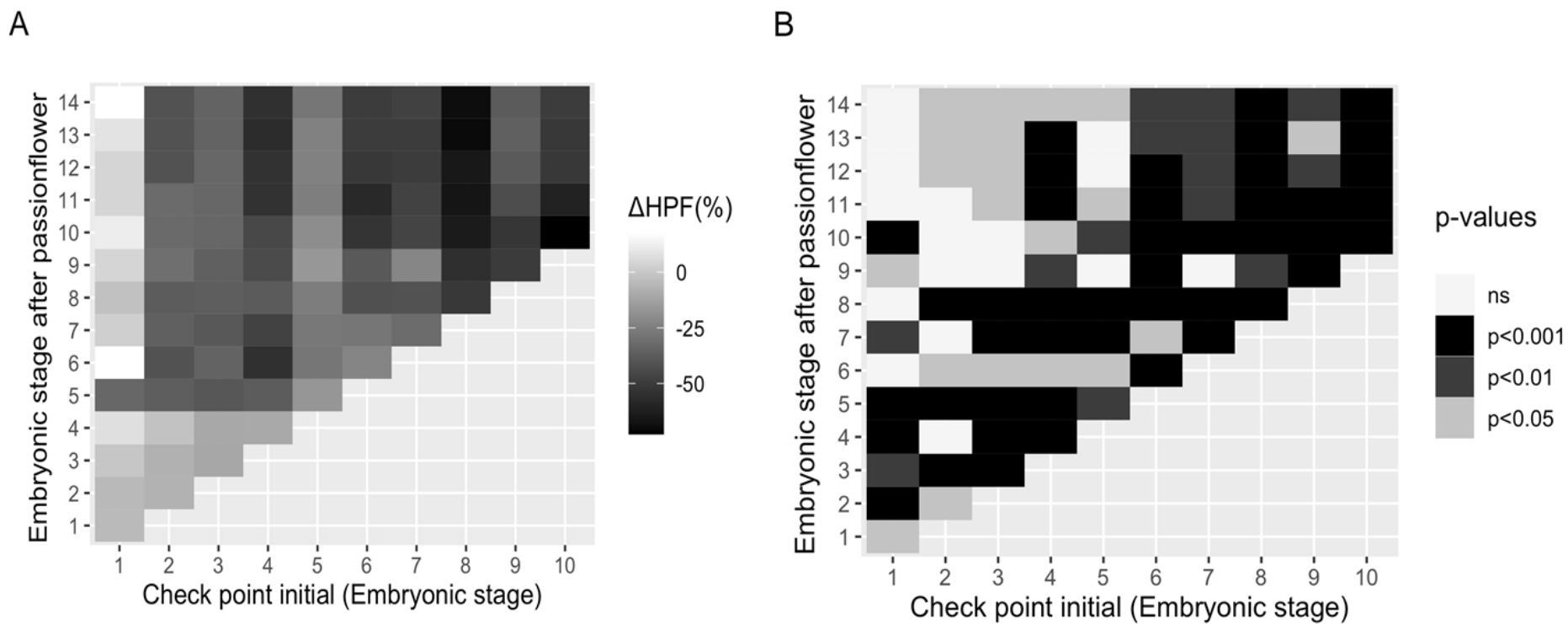
| Número | Tempo de Exposição | Desenvolvimento Embrionário Controle | Desenvolvimento Embrionário durante exposição à <i>P. cincinnata</i> |
|--------|--------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1      | 1 hora             | fase de high                         | Clivagem                                                             |
| 2      | 2,20 horas         | Fase de Blástula High                | Fase de alto (High)                                                  |
| 3      | 3,20 horas         | Fase de Blástula Dome                | Fase de Dome ou domo                                                 |
| 4      | 4,40 horas         | Fase de Anel Germinativo             | Fase de Dome ou domo                                                 |
| 5      | 7,40 horas         | Fase 80% Epibolia                    | Fase 80% Epibolia                                                    |
| 6      | 9,0 horas          | Fase de Broto nervoso                | Fase Broto nervoso                                                   |
| 7      | 9,20 horas         | Fase de 1 Somito                     | Fase de 1 Somito                                                     |
| 8      | 10,40 horas        | Fase de 5 Somitos                    | Fase 1 Somito                                                        |
| a      | 16,50 horas        | Fase 16 Somitos                      | Fase 16 Somitos                                                      |
| 10     | 23,0 horas         | Fase de Faríngula Prim               | Fase de Faríngula Prim                                               |

Fonte: Autora, 2024.

O gráfico A apresenta a diferença no desenvolvimento embrionário ( $\Delta$ HFPPF) ao longo dos checkpoints embrionários iniciais (Figura 2). No eixo X, estão representados os estágios iniciais do embrião, enquanto no eixo Y são apresentados os estágios após a exposição ao extrato. A escala de cinza utilizada no gráfico indica a magnitude das diferenças observadas. Regiões mais escuras representam mudanças mais significativas nos estágios de desenvolvimento embrionário, sugerindo um impacto maior do tratamento com *Passiflora cincinnata*.

Logo, o gráfico B demonstra os valores de p (p-values) resultantes da análise estatística dos dados de desenvolvimento embrionário. Diferentes tonalidades de cinza foram utilizadas para representar os níveis de significância estatística (Figura 2).

Figura 1: A-Diferenças no Desenvolvimento Embrionário ( $\Delta$ HFPF), B-Significância Estatística das Diferenças (p-values).



Fonte: Autora, 2024.

A exposição do embrião as fases de Alto e Dome, não apresentaram um atraso estatisticamente significativo no desenvolvimento embrionário ( $p < 0,001$ ). No entanto, na fase de Gástrula-Anel Germinativo, houve um atraso estatisticamente significativo no desenvolvimento embrionário ( $p < 0,001$ ). Nas fases de Gástrula-80% Epibolia, Gástrula-Broto e Segmentação-1 Somito, também não foi observado um atraso estatisticamente significativo no desenvolvimento embrionário ( $p < 0,001$ ).

Por outro lado, na fase de Segmentação-5 Somitos, foi observado um atraso estatisticamente significativo no desenvolvimento embrionário ( $p < 0,001$ ). Na fase de Segmentação-16 Somitos, não foi observado um atraso estatisticamente significativo no desenvolvimento embrionário ( $p < 0,001$ ). Finalmente, na fase de Pharyngula-Prim, foi observado um atraso estatisticamente significativo no desenvolvimento embrionário ( $p < 0,001$ ).

A tabela e o gráfico demonstram que, em tempos de exposição mais curtos, as fases de desenvolvimento embrionário são semelhantes entre os grupos de controle e tratados. No entanto, à medida que o tempo de exposição aumenta, certas fases mostram diferenças significativas. Por exemplo, nas fases de Gástrula - Anel Germinativo e Segmentação - 5 Somitos, observa-se um atraso no desenvolvimento embrionário no grupo tratado com *Passiflora cincinnata* em comparação ao controle, o qual este atraso é confirmado pela análise estatística, com significância estatística indicada em várias fases.

Essas diferenças sugerem que o extrato de *Passiflora cincinnata* tem um efeito mensurável sobre o desenvolvimento embrionário dos zebrafish, com atrasos significativos em fases específicas do desenvolvimento.

## 5 DISCUSSÃO

*Passiflora incarnata* e *Passiflora cincinnata* são amplamente reconhecidas por suas propriedades medicinais. Em um estudo realizado por Speroni e Minghetti (1998), observou-se que extratos de *Passiflora incarnata* não apresentaram toxicidade em modelos de ratos e camundongos adultos. No entanto, a toxicidade em embriões de zebrafish indica que os efeitos dos compostos podem variar significativamente entre diferentes estágios de desenvolvimento no zebrafish.

A comparação entre *Passiflora incarnata* e *Passiflora cincinnata* revela que elas possuem propriedade farmacológicas bem significativas estudos realizados *in vitro* com *P. Incarnata* mostra que seus extratos tem uma atividade antioxidante e antimicrobiana, destacando assim

seu potencial para uso terapêutico em diversas condições, já a *Passiflora cincinnata*, demonstrou efeitos neuroprotetor em camundongos em um modelo de doença de Parkinson, atrasando o desenvolvimento de sinais motores e prevenindo a perda dopaminérgica. Ambas possuem propriedade benéficas que podem ser mais exploradas (Reis et. al., 2023; Brandão et. al., 2017).

Os resultados dos estudos supracitados mostraram que o extrato de *Passiflora cincinnata* tem um impacto significativo no desenvolvimento embrionário do zebrafish. Os embriões expostos ao extrato apresentaram atrasos em várias fases do desenvolvimento em comparação com o grupo controle, indicando a eficácia do extrato em retardar o desenvolvimento embrionário.

Logo, em uma análise detalhada das fases de desenvolvimento do presente estudo também revelaram que os embriões tratados com *Passiflora cincinnata* apresentaram atrasos significativos nas fases de gástrula e segmentação. Esses atrasos foram estatisticamente significativos, especialmente nas fases de Gástrula-Anel de Germe e Segmentação-5 Somitos, sugerindo um efeito do extrato na proliferação celular e na formação de estruturas embrionárias.

A composição química de *Passiflora cincinnata* inclui flavonoides como vitexina e isovitexina, que são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Esses compostos provavelmente contribuíram para os efeitos observados nos embriões de zebrafish, retardando o desenvolvimento sem causar teratogênias significativas (Durazzo et al., 2019; Junqueira et al., 2005). . A análise estatística dos dados utilizando o teste de Mann-Whitney confirmou a significância dos atrasos no desenvolvimento embrionário em várias fases. Isso reforça a hipótese de que *Passiflora cincinnata* pode ser utilizada para controlar a taxa de desenvolvimento embrionário, o que é crucial para aplicações em biotecnologia e conservação (Vieira, 2015).

A vitexina é um flavonoide que tem atraído interesse devido às suas propriedades biológicas, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais, o qual é conhecida por neutralizar radicais livres, reduzir a inflamação e induzir a apoptose em células cancerígenas (Pereira et al., 2021). No contexto do desenvolvimento embrionário, a vitexina pode influenciar a proliferação e diferenciação celular (Wei et al., 2014).

A vitexina pode interagir com a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário, possivelmente incluindo os genes SOX (Sry-related HMG box). A capacidade da vitexina de modular a expressão gênica pode ocorrer através da regulação de fatores de transcrição ou pela modulação de vias de sinalização que controlam a expressão desses genes (Ganesan et al., 2020).

Os genes SOX são cruciais no desenvolvimento embrionário, influenciando a diferenciação celular e a formação de tecidos. A interação entre os compostos da *Passiflora cincinnata* e a expressão dos genes SOX pode ser uma área promissora para futuras pesquisas, pois esses genes desempenham um papel significativo na morfogênese e na estabilidade do desenvolvimento (De Luca et al., 2012).

Os genes do grupo SOX são uma família de fatores de transcrição que desempenham um papel crucial no desenvolvimento embrionário e na determinação do sexo em vertebrados. Esses genes são conhecidos por sua capacidade de se ligar ao DNA e regular a expressão de outros genes, influenciando processos como diferenciação celular, desenvolvimento de órgãos e manutenção da pluripotência das células-tronco (Hagedorn et al., 1997; Lammer et al., 2009).

Os genes SOX atuam ligando-se a sequências específicas de DNA, conhecidas como caixas HMG, e modulando a transcrição de genes alvo. Essa interação pode ativar ou reprimir a expressão gênica, dependendo do contexto celular e dos cofatores presentes (Goes, 2019).

Estudos *in silico* têm sido úteis para prever as interações entre a vitexina e proteínas-alvo, incluindo fatores de transcrição como os genes SOX. Essas análises computacionais podem identificar possíveis sítios de ligação e prever os efeitos da vitexina na atividade genética, fornecendo uma base para estudos experimentais futuros (Durazzo et al., 2019).

A pesquisa sobre a interação entre os genes SOX e a vitexina é crucial para entender como compostos naturais podem influenciar o desenvolvimento embrionário e a saúde humana. Compreender essas interações pode levar ao desenvolvimento de novas terapias para doenças relacionadas ao desenvolvimento e à utilização de compostos naturais na medicina regenerativa.

## **6 IMPACTO DO TRABALHO NA SOCIEDADE**

Este trabalho, ao explorar o uso de *Passiflora cincinnata* na conservação de embriões, representa uma contribuição significativa para a preservação de espécies em extinção. A aplicação de técnicas que retardam o desenvolvimento embrionário permite a criação de bancos de germoplasma, essenciais para a manutenção da biodiversidade e a recuperação de espécies ameaçadas.

A pesquisa oferece avanços importantes para a piscicultura, especialmente no que diz respeito à criação de peixes nativos. A possibilidade de retardar o desenvolvimento embrionário

permite um melhor gerenciamento dos recursos reprodutivos e pode aumentar a eficiência das incubadoras, contribuindo para uma produção mais sustentável e rentável.

O desenvolvimento de protocolos utilizando extratos de *Passiflora cincinnata* representa uma inovação significativa na biotecnologia reprodutiva. Este avanço pode ser incorporado à rotina dos laboratórios de aquicultura, proporcionando novas ferramentas para o controle do desenvolvimento embrionário e melhoramento genético de espécies aquáticas.

A utilização de *Passiflora cincinnata*, uma planta com propriedades medicinais conhecidas, também reforça a importância da medicina tradicional e dos conhecimentos etnobotânicos, o qual este trabalho contribui para a validação científica de práticas tradicionais, promovendo o uso seguro e eficaz de plantas medicinais. A aplicação de modelos experimentais como o zebrafish para a avaliação de toxicidade e desenvolvimento embrionário auxilia na redução do uso de animais em experimentos. Este aspecto está alinhado com os princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição), promovendo uma pesquisa mais ética e sustentável.

Os avanços proporcionados por este trabalho podem ter um impacto econômico significativo, especialmente no setor de aquicultura, o qual a melhoria na eficiência reprodutiva e na conservação de embriões pode levar a um aumento na produção e na qualidade dos produtos piscícolas, beneficiando economicamente os produtores. Este trabalho fortalece a base de conhecimento científico sobre a *Passiflora cincinnata* e suas aplicações biotecnológicas, de modo que, a pesquisa detalhada sobre seus efeitos no desenvolvimento embrionário abre novas linhas de investigação e incentiva estudos futuros em biotecnologia e conservação.

A realização deste estudo também tem um impacto educacional, proporcionando treinamento e capacitação para pesquisadores e estudantes em técnicas avançadas de biotecnologia, o qual contribui para a formação de profissionais qualificados, capazes de enfrentar os desafios futuros da ciência e tecnologia.

Sendo assim, a aplicação de biotecnologias para a conservação e manejo sustentável de recursos naturais contribui para a sustentabilidade ambiental, o qual o presente estudo promove técnicas que beneficiam a preservação de espécies e a produção sustentável, ajuda a proteger os ecossistemas e a biodiversidade global.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Os resultados deste estudo revelam que o extrato de *Passiflora cincinnata* tem um impacto significativo no desenvolvimento embrionário do zebrafish, sendo capaz de retardar esse

processo em fases críticas sem causar efeitos teratogênicos. Essa capacidade de modulação do desenvolvimento embrionário apresenta uma ferramenta promissora para a conservação de embriões e a melhoria das práticas de aquicultura.

As fases de gástrula e segmentação foram particularmente afetadas pelo extrato, indicando que este atua de forma específica em certos estágios do desenvolvimento embrionário. A análise estatística confirmou a significância desses atrasos, destacando o potencial biotecnológico de *Passiflora cincinnata* na criação de protocolos para a conservação de embriões.

Além disso, a ausência de efeitos teratogênicos reforça a segurança do uso de *Passiflora cincinnata* em aplicações biotecnológicas. Este achado é crucial para o desenvolvimento de métodos de conservação que não comprometam a viabilidade e a saúde dos embriões. A comparação com o grupo controle mostrou que os embriões tratados retomaram seu desenvolvimento normal após a remoção do extrato, o que indica que o efeito do extrato é temporário e reversível. Esse aspecto é particularmente importante para a aplicação prática desses protocolos em ambientes de laboratório e produção.

Este estudo demonstrou que o extrato de *Passiflora cincinnata* pode ser utilizado para retardar o desenvolvimento embrionário de zebrafish, fornecendo uma nova ferramenta biotecnológica para a conservação de embriões. Os resultados indicaram que o extrato pode causar atrasos significativos em fases específicas do desenvolvimento embrionário sem causar teratogênias evidentes, destacando seu potencial uso em laboratórios de aquicultura e conservação.

As descobertas deste trabalho contribuem significativamente para o campo da biotecnologia reprodutiva e conservação de espécies. A utilização de extratos de plantas como a *Passiflora cincinnata* oferece uma alternativa inovadora e ecologicamente sustentável para a criopreservação de embriões, que pode ser adaptada para várias espécies de peixes e potencialmente outros organismos.

Os resultados obtidos têm implicações importantes para a aquicultura, especialmente na criação de peixes nativos. A capacidade de retardar o desenvolvimento embrionário permite um melhor gerenciamento dos recursos reprodutivos e pode aumentar a eficiência das incubadoras, resultando em uma produção mais sustentável e rentável.

Além disso, o estudo reforça a importância da medicina tradicional e dos conhecimentos etnobotânicos, validando cientificamente o uso de *Passiflora cincinnata*. Esta validação promove o uso seguro e eficaz de plantas medicinais, integrando tradições populares com práticas científicas modernas.

Essa abordagem promove uma pesquisa mais ética e sustentável, contribuindo para a proteção dos animais. O impacto econômico desta pesquisa também é significativo, especialmente para o setor de aquicultura. A melhoria na eficiência reprodutiva e na conservação de embriões pode levar a um aumento na produção e na qualidade dos produtos piscícolas, beneficiando economicamente os produtores e impulsionando o setor.

Além disso, o trabalho fortalece a base de conhecimento científico sobre *Passiflora cincinnata* e suas aplicações biotecnológicas. A pesquisa detalhada sobre seus efeitos no desenvolvimento embrionário abre novas linhas de investigação e incentiva estudos futuros em biotecnologia e conservação, ampliando o entendimento científico.

As perspectivas futuras incluem a ampliação dos estudos com *Passiflora cincinnata* para outras espécies e a exploração de seus efeitos em diferentes contextos biológicos. A integração de técnicas *in silico* e *in vitro* pode oferecer uma compreensão mais profunda dos mecanismos de ação do extrato, permitindo a otimização dos protocolos de uso. Além disso, a colaboração com outras áreas da ciência, como a farmacologia e a genética, pode levar ao desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas e biotecnológicas para *Passiflora cincinnata*.

A contribuição deste estudo para o campo da biotecnologia reprodutiva e da conservação de espécies é evidente, oferecendo uma alternativa viável e sustentável para a criopreservação de embriões. Os benefícios potenciais para a aquicultura são significativos, com a possibilidade de melhorar a eficiência reprodutiva e aumentar a produção de peixes nativos de forma sustentável. O estudo também valida o uso tradicional de *Passiflora cincinnata*, integrando conhecimentos etnobotânicos com práticas científicas modernas, o que promove o uso seguro e eficaz de plantas medicinais.

O aprimoramento e a padronização dos métodos de extração e aplicação do extrato também são áreas importantes a serem exploradas, visando garantir a consistência e a eficácia dos resultados em diferentes contextos e aplicações. Assim, este estudo não apenas avança o conhecimento científico e técnico sobre *Passiflora cincinnata*, mas também abre novas possibilidades para a conservação de espécies, a sustentabilidade ambiental e a inovação na biotecnologia reprodutiva, o qual este trabalho destaca a importância da pesquisa interdisciplinar e da integração entre ciência e tradição, oferecendo uma base sólida para futuras investigações e aplicações práticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aati, H., El-Gamal, A., Shaheen, H., & Al-Farsi, S. (2019). Uso Tradicional de nativos etnomedicinais plantas no Reino da Arábia Saudita. *Revista de Etnobiologia e Etnomedicina*, 15(2). <https://doi.org/10.1186/s13002-019-0301-1>
- Araujo, F. P., Silva, N., & Queiroz, M. A. (2008). Divergência genética entre acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. com base em descritores morfoagronômicos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 723-730. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452008000300024>
- Bacchi, E. M., Silva, E. D., & Leite, J. P. V. (2013). Toxicidade aguda do extrato de *Passiflora incarnata* em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(1), 21-25. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000100003>
- Belanger, S. E., Rawlings, J. M., & Braunbeck, T. (2013). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 196-209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- Blumenthal, M., Goldberg, A., & Brinckmann, J. (2000). *Herbal Medicine – Expanded*. American Botanical Council.
- Brandão, M. E. L., Nôga, A. D., Dierschnabel, L. A., Campêlo, C. L. C., Meurer, R. S. Y., Lima, H. R., Engelberth, J. G. C. R., Cavalcante, S. J., Lima, A. C., Marchioro, M., Estevam, S. C., Santos, R. J., Silva, H. R., Ribeiro, M. A. (2017). *Passiflora cincinnata* extract delays the development of motor sings and prevents dopaminergic loss in a mice model of parkinson's disease. 10.1155/2017/8429290
- Chahardehi, A., Arsad, H., & Lim, V. (2020). Peixe-zebra como um modelo animal bem-sucedido para triagem de toxicidade de plantas medicinais. *Plants*, 9. <https://doi.org/10.3390/plants9101345>
- Deepika, B., Gowtham, P., Raghavan, V., Isaac, J. B., Devi, S., Kiran, V., ... & Girigoswami, K. (2024). Harmony in nature's elixir: a comprehensive exploration of ethanol and nano-formulated extracts from *Passiflora incarnata* leaves: unveiling in vitro cytotoxicity, acute and sub-acute toxicity profiles in Swiss albino mice. *Journal of Molecular Histology*, 1-18.
- De Luca, V., Salim, V., Atsumi, S. M., & Yu, F. (2012). Mining the biodiversity of plants: A revolution in the making. *Science*, 336(6089), 1658-1661. <https://doi.org/10.1126/science.1217410>
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry occurrence and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243. <https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Fonseca, J. D., Coelho, M. C., & Santos, T. C. (2020). Efeitos farmacológicos da *Passiflora cincinnata* em modelos experimentais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 30(5), 723-730. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00020-1>
- Ganesan, K., Ramkumar, K. M., & Xu, B. (2020). Vitexin restores pancreatic  $\beta$ -cell function and insulin signaling through Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 888, 173606.
- Ganesan, R., Yoon, K. Y., & Kim, I. S. (2020). Vitexin, a flavonoid, modulates pathways related to cell proliferation, differentiation, and apoptosis: A review. *Life Sciences*, 241, 117147. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117147>

- Goes, C. P. (2019). Regulação pré-e pós-transcricional do gene Scratch2 durante a neurogênese no tubo neural posterior (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Hagedorn, M., Kleinhans, F. W., Freitas, R., Liu, J., Hsu, E., & Wildt, D. E. (1997). New approaches for studying the permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation. *Cryobiology*, 34(4), 335-347. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2010>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253-310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Lavor, É., Leal, A., Fernandes, A., Ribeiro, F., Barbosa, J., Silva, M., Teles, R., Oliveira, L., Silva, J., Rolim, L., Menezes, I., & Almeida, J. (2018). Extrato etanólico das partes aéreas de *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) reduz eventos nociceptivos e inflamatórios em camundongos.. *Fitomedicina: revista internacional de fitoterapia e fitofarmacologia* , 47, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.052> .
- Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., & Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 196-209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.006>
- Pereira, J. C., Martins, A. B., Rocha, M. C. F., Júnior, S. M. C., & Feitosa, C. M. (2021). Espécies medicinais do Brasil com potencial anti-inflamatório ou antioxidante: Uma revisão. *Research, Society and Development*, 10(7), e10310716196-e10310716196.
- Pereira, R. M., & Marques, C. C. (2021). Vitexin as a protective agent: Biological roles in various diseases. *Pharmacological Reports*, 73(3), 733-746. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00237-3>
- Reis, C.C., Freitas P. S., Lorentino, A. M. C., Fagundes, F. S. T., Matta, M. V., Santos, S. L. A., Moreira, L. D., Kunigami, N. C., Jung, P. E., Ribeiro, O. L., (2023). Bioproducts from *Passiflora cincinnata* Seeds: The Brazilian Caatinga Passion Fruit. <https://doi.org/10.3390/foods12132525>
- Speroni, E., & Minghetti, A. (1998). Toxicidade de extratos de *Passiflora* em camundongos. *Planta Medica*, 64(3), 213-214. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957416>
- Vieira, L. M. (2015). Embriogênese somática em *Passiflora cincinnata* Mast. e *P. setacea* DC: caracterização morfo-anatômica, mobilização de reservas e expressão dos genes SERK e BBM.
- Wei, W., Ying, X., Zhang, W., Chen, Y., Leng, A., Jiang, C., & Liu, J. (2014). Effects of vitexin-2 "-O-rhamnoside and vitexin-4 "-O-glucoside on growth and oxidative stress-induced cell apoptosis of human adipose-derived stem cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(7), 988-997. <https://doi.org/10.1111/jphp.12206>