



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VINICIUS YURI BORGES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
TOXICOLÓGICA DO 1-Nitro-2-feniletileno EM *Danio rerio*
(ZEBRAFISH)**

Macapá
2024

VINICIUS YURI BORGES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
TOXICOLÓGICA DO 1-Nitro-2-feniletileno EM *Danio rerio*
(ZEBRAFISH)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Raphaelle Sousa Borges.

Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Custódio de Souza.

Macapá
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP)Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Mário das Graças Carvalho Lima Júnior – CRB-2 / 1451

S237 Santos, Vinicius Yuri Borges dos.

Avaliação da atividade anti-inflamatória e toxicológica do nitroestireno 1-Nitro-2-feniletileno em danio rerio (zebrafish) / Vinicius Yuri Borges dos Santos. - Macapá, 2024.
1 recurso eletrônico. 105 folhas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Macapá, 2024.

Orientadora: Raphaelle Sousa Borges.

Coorientadora: Gisele Custódio de Souza.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. COX. 2. Toxicidade Aguda. 3. Histopatologia. I. Borges, Raphaelle Sousa, orientadora.
II. Souza, Gisele Custódio de, coorientadora. III. Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

CDD 23. ed. – 615

SANTOS, Vinicius Yuri Borges dos. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e toxicológica do 1-Nitro-2-feniletileno em *Danio rerio* (zebrafish)**. Orientadora: Raphaelle Sousa Borges. Coorientadora: Gisele Custódio de Souza. 2024. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2024

VINICIUS YURI BORGES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
TOXICOLÓGICA DO 1-Nitro-2-feniletileno EM *Danio rerio*
(ZEBRAFISH)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Raphaelle Sousa Borges.

Coorientadora: Profa. Dra. Gisele Custódio de Souza

Data de Aprovação: _____/_____/_____

Profa. Dra. Raphaelle Sousa Borges
Orientadora
Universidade Federal do Amapá

Profa. Dra. Gisele Custódio de Souza
Coorientadora
Universidade do Estado do Amapá

Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira
Universidade Federal do Amapá

Profa. Dra. Adriana Maciel Ferreira
Universidade Federal do Amapá

*À todos os professores que com seus conhecimentos construíram
a escada para que eu pudesse chegar até a pós graduação*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio Flávio e Ronilda Borges, que nunca deixaram me faltar nada. Aos meus avós, Clemente Borges e Joaquina Dias (in memoriam) e Benedita Santos e José Buiú (in memoriam) por sempre incentivarem meu processo educacional e por todos os ensinamentos dados.

Aos meus tios, primos e familiares.

Ao grupo de pesquisa em fármacos do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, em nome da Dra. Adriana Maciel, que me deu total suporte desde minha entrada no laboratório e na plataforma zebrafish.

Aos integrantes do biotério plataforma zebrafish da UNIFAP, que contribuíram para a manutenção e acondicionamento dos animais utilizados nos experimentos desta dissertação.

Aos integrantes do Laboratório de Histologia e Biologia Celular da UNIFAP, que auxiliaram no processamento histológico realizado neste estudo;

À minha ex aluna de Iniciação Científica Ana Luiza, que me auxiliou no desenvolvimento dos experimentos desta dissertação.

Aos Alunos de Iniciação Científica do HISTOBIO, que auxiliaram no andamento dos ensaios in vivo.

Aos meus amigos Leide Laura e Alessandro Soares, que me auxiliaram no processo de desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Fabrício Holanda, que realizou contribuições imensuráveis para a realização desta dissertação.

Aos ilustres professores Dr. José Carlos Tavares Carvalho, Dr. Irlon Maciel Ferreira e Dra. Lorane Izabel da Silva Hage Melim, que viabilizaram a realização desde estudo. Deixo registrado a minha eterna gratidão.

À minha orientadora Profa. Dra. Raphaelle Sousa Borges e coorientadora Profa. Dra. Gisele Custódio de Souza, por nunca desistirem e nem deixar de acreditar no meu potencial. Não há palavras no mundo que possam externar meu eterno agradecimento.

À equipe ESF 031 e 052, em nome da minha amiga Márcia Cristina, por terem me concedido o benefício da ausência do meu local de trabalho para a realização desde estudo.

Aos meus fiéis amigos da biomedicina, Adriane, Crislene, Lyvia, Natália, Cláudia e Marinaldo, que desde a graduação me acompanham e torcem pela minha vitória.

À minha ex orientadora e amiga biomédica Gleicyanne Frazão, que desde a graduação me incentiva a voar mais alto.

As minhas colegas de pós-graduação, Keren Hapuque e Aliny Cristiny, sem vocês essa trajetória seria ainda mais difícil.

À todos os professores, técnicos e colaboradores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nome da técnica e secretária Rosemary Koga, por todo o suporte prestado.

A Universidade Federal do Amapá, pelo acolhimento

Ao CNPq (Chamada CNPq Nº 12/2020 - Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação - MAI/DAI. Processo 168076/2022-5) pelo apoio financeiro e viabilização deste estudo.

“Um país que não produz conhecimento, que persegue seus professores e pesquisadores, que corta bolsas de pesquisa e reduz os investimentos em ciência e tecnologia está condenado ao atraso”

(Luiz Inácio Lula da Silva)

Atualmente, a busca por anti-inflamatórios eficazes e de baixa toxicidade é um tema de bastante relevância, visto que cada vez mais esse tipo de medicamento tem seu uso difundido e amplamente recomendado para uma variedade de condições inflamatórias. Este cenário de destaque alavancou pesquisas sobre diversos compostos químicos com potencial terapêutico, como os nitroestirenos. Obter uma solução estável para utilização do 1-Nitro-2-feniletileno, avaliar a toxicidade aguda em zebrafish, avaliar o potencial anti-inflamatório do NPe através do ensaio de inibição de edema abdominal em zebrafish, realizar o estudo histopatológico em zebrafish e prever as possíveis ligações e predileções do fármaco com os alvos COX-1 e COX-2. Para a dissolução do 1-Nitro-2-feniletileno foi utilizada uma solução contendo DMSO como solvente, éster butílico como surfactantes e solução salina como veículo. O ensaio de toxicidade aguda foi realizado em zebrafish. A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada através do ensaio de inibição de edema abdominal em modelo zebrafish. O estudo histopatológico foi realizado em rins, fígado e intestino de zebrafish. Um estudo *in silico* complementar foi realizado através do software GOLD. No ensaio de toxicidade aguda foram utilizadas as doses de 5, 8, 10, 12 e 15 mg/kg, totalizando 120 animais, nenhum animal morreu neste ensaio e o estudo histopatológico não demonstrou alterações significativas nos principais órgãos de metabolização e o NPe foi considerado não tóxico para as doses testadas. No ensaio de inibição de edema abdominal foram utilizadas as doses de 5, 10 e 15 mg/kg. Contrariando a predileção do docking, a dose de 15 mg/kg de NPe demonstrou maior potencial em inibir a formação de edema em relação aos fármacos padrão Ibuprofeno (10 mg/kg) e Dexametasona (0,5 mg/kg). O estudo histopatológico não demonstrou alterações significativas nos principais órgãos de metabolização de inibição de edema abdominal. Este estudo é inovador ao propor uma solução segura para o uso do 1-Nitro-2-feniletileno em zebrafish. O 1-Nitro-2-feniletileno, por ter demonstrado ação anti-inflamatória nos ensaios *in vivo*, também pode dar origem a novos fármacos comerciais devido a este potencial. No entanto, se fazem necessários ensaios complementares em modelos animais diferentes, como Ratos Wistar, uma vez que o zebrafish possui determinadas limitações quanto ao volume a ser administrado no processo de gavagem.

Palavras-Chave: COX-1; COX-2; Toxicidade aguda; Histopatologia.

ABSTRACT

Currently, the search for effective and low-toxicity anti-inflammatory drugs is a very relevant topic, since this type of medication is increasingly being used and widely recommended for a variety of inflammatory conditions. This prominent scenario has boosted research on several chemical compounds with therapeutic potential, such as nitrostyrenes. To obtain a stable solution for use of 1-Nitro-2-phenylethylene, to evaluate acute toxicity in zebrafish, to evaluate the anti-inflammatory potential of NPe through the abdominal edema inhibition assay in zebrafish, to perform a histopathological study in zebrafish and to predict the possible links and predilections of the drug with the COX-1 and COX-2 targets. A solution containing DMSO as a solvent, butyl ester as surfactants and saline solution as a vehicle was used to dissolve 1-Nitro-2-phenylethylene. The acute toxicity assay was performed in zebrafish. The evaluation of anti-inflammatory activity was performed through the abdominal edema inhibition assay in a zebrafish model. The histopathological study was performed in zebrafish kidneys, liver and intestine. A complementary *in silico* study was performed using the GOLD software. In the acute toxicity assay, doses of 5, 8, 10, 12 and 15 mg/kg were used, totaling 120 animals. No animal died in this assay and the histopathological study showed no significant changes in the main metabolizing organs and NPe was considered non-toxic for the doses tested. In the abdominal edema inhibition assay, doses of 5, 10 and 15 mg/kg were used. Contrary to the docking preference, the 15 mg/kg dose of NPe demonstrated greater potential in inhibiting edema formation in relation to the standard drugs Ibuprofen (10 mg/kg) and Dexamethasone (0.5 mg/kg). The histopathological study did not demonstrate significant alterations in the main metabolizing organs of abdominal edema inhibition. This study is innovative in proposing a safe solution for the use of 1-Nitro-2-phenylethylene in zebrafish. 1-Nitro-2-phenylethylene, having demonstrated anti-inflammatory action in *in vivo* assays, may also give rise to new commercial drugs due to this potential. However, complementary tests are necessary in different animal models, such as Wistar rats, since zebrafish have certain limitations regarding the volume to be administered in the gavage process.

Keywords: COX-1; COX-2; Acute toxicity; Histopathology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Folha de Aniba canelilla.....	20
Figura 2 -	Estrutura química do NPE e NPe.....	23
Figura 3 -	Via da cascata do ácido araquidônico.....	26
Figura 4 -	Mecanismo de ativação da via NF-Kb.....	27
Figura 5 -	Exemplares de zebrafish fêmea e macho, respectivamente.....	39
Figura 6 -	Apresentação comercial do NPe.....	47
Figura 7 -	Processo de gavagem em zebrafish.....	50
Figura 8 -	Grupos de zebrafish em avaliação dos parâmetros comportamentais pós gavagem na plataforma zebrafish – LPF/UNIFAP	51
Figura 9 -	Método de anestesia por resfriamento em zebrafish utilizado durante o ensaio de inibição de edema abdominal.....	53
Figura 10 -	Procedimento de indução de inflamação por carragenina i.p. em zebrafish.....	54
Figura 11 -	Histopatologia de intestino de zebrafish.....	63
Figura 12 -	Histopatologia de fígado de zebrafish.....	64
Figura 13 -	Histopatologia de rim de zebrafish.....	65
Figura 14 -	Animais apresentando perda de equilíbrio.....	68
Figura 15 -	Avaliação visual da formação do edema abdominal em zebrafish 5 horas após a indução por carragenina i.p.....	69
Figura 16 -	Percentual de inibição de edema abdominal em zebrafish.....	70
Figura 17 -	Índice de alterações histopatológicas (IAH) em intestino (A), fígado (B) e rins (C) de zebrafish adulto.....	71
Figura 18 -	Histopatologia de intestino de zebrafish de ensaio de atividade anti-inflamatória.....	72
Figura 19 -	Histopatologia de fígado de zebrafish de ensaio de atividade anti- inflamatória.....	74
Figura 20 -	Histopatologia de rins de zebrafish de ensaio de atividade anti- inflamatória.....	76
Figura 21 -	Representação em 2D e 3D da simulação de docking molecular do NPE, NPe e Ibuprofeno, no alvo COX-1.....	81
Figura 22 -	Representação em 2D e 3D da simulação de docking molecular do Ibuprofeno, NPE e NPe, no alvo COX-2.....	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros comportamentais avaliados.....	52
Quadro 2 - Alterações histológicas consideradas para a análise dos rins de zebrafish.....	57
Quadro 3 - Alterações histológicas consideradas para a análise de fígado de zebrafish.....	57
Quadro 4 - Alterações histológicas consideradas para a análise de intestino de zebrafish.....	58
Quadro 5 - Predição farmacocinética do NPE e NPe pelo programa SwissADME.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Separação dos animais em grupo para a realização do ensaio de toxicidade aguda.....	50
Tabela 2 -	Descrição dos grupos para realização da avaliação do potencial anti-inflamatório através do ensaio de inibição de edema abdominal em zebrafish.....	52
Tabela 3 -	Média do Índice de Alteração Histopatológica em intestino, fígado e rins de Zebrafish tratados com NPe.....	63
Tabela 4 -	Avaliação dos parâmetros comportamentais após o processo de indução nas horas 0, 1, 2, 3, 4 e 5.....	68
Tabela 5 -	Predição toxicológica do NPE e NPe pelo programa AdmetSAR...	79
Tabela 6 -	Interações e os tipos de interações realizadas entre os ligantes Ibuprofeno, NPE e NPe, com o alvo COX-1.....	80
Tabela 7 -	Interações e os tipos de interações realizadas entre os ligantes Ibuprofeno, NPE e NPe, com o alvo COX-2.....	82

LISTA DE ABREVIações

5-HPETE	5-Monohidroperoxidoeicosotetraenoico
5-LOX	5-Lipoxigenase
AA	Ácido Araquidônico
COX	Ciclo-oxigenase
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DL ₅₀	Dose Letal Média
EOAC	Oléo Essencial de Aniba canelilla
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IKK	I κ B-quinase
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
I κ B	Moléculas de inibidora de κ B
LOX	Lipoxigenase
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófagos 1
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos 2
NF- κ B	Fator Nuclear κ B
NPe	1-Nitro-2-feniletileno
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂ alfa
PGI ₂	Prostaciclina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
VCAM-1	Proteína 1 de adesão celular vascular
NPE	1-Nitro-2-feniletano
NPe	1-Nitro-2-feniletileno

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. Referencial Teórico.....	19
3.1 Aniba canelilla (H.B.K) <i>Mez</i>	19
3.2 Compostos semissintéticos.....	20
3.3 Nitroestirenos.....	21
3.4 1-Nitro-2-feniletano.....	23
3.5 1-Nitro-2-feniletileno.....	24
3.6 Processos inflamatórios.....	24
3.6.1 Via da cascata de ácido araquidônico.....	25
3.6.2 Via de sinalização do fator nuclear κB (NF- κB)	26
3.6.3 Desenvolvimento da inflamação.....	27
3.6.4 Mediadores químicos da inflamação.....	31
3.6.4.1 Citocinas.....	31
3.6.4.2 Quimiocinas.....	33
3.6.4.3 Ácido araquidônico.....	33
3.6.4.4 Óxido nítrico.....	34
3.6.4.5 Enzimas na síntese de mediadores – PLA2, COX E LOX.....	35
3.6.4.6 O fator de transcrição NF- κB	36
3.6.4.7 O fator de transcrição AP-1.....	37
3.6.4.8 Espécies reativas e estresse oxidativo na inflamação.....	38
3.7 Modelo experimental zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	39
3.7.1 O zebrafish como modelo animal para pesquisas.....	40
3.7.2 Estudos de toxicidade aguda em zebrafish.....	41
3.7.3 Zebrafish como modelo de estudo da inflamação e teste de substâncias anti-inflamatórias.....	43
3.7.4 Carragenina como agente indutor da inflamação.....	45
4. Material e Métodos.....	47
4.1 Local de desenvolvimento e realização dos experimentos.....	47
4.2 Nitroestireno.....	47

4.2.1. Aquisição do 1-Nitro-2-feniletileno.....	47
4.2.2. Obtenção do éster butílico.....	47
4.2.3. Dissolução do 1-Nitro-2-feniletileno.....	48
4.2.4. Estabilidade da solução.....	48
4.3 Considerações éticas.....	48
4.4 Animais experimentais.....	48
4.4.1 Acondicionamento dos animais.....	49
4.4.2 Processo de eutanásia do zebrafish.....	49
4.5 Ensaio de toxicidade aguda em zebrafish.....	49
4.5.1 Preparo dos animais experimentais e determinação da DL50....	50
4.5.2 Avaliações dos parâmetros comportamentais.....	51
4.6 Ensaio de inibição de edema abdominal em zebrafish.....	52
4.6.1 Avaliação dos parâmetros comportamentais.....	54
4.6.2 Peso corporal e formação do edema.....	54
4.7 Estudo histopatológico pós ensaio <i>in vivo</i>	55
4.7.1 Preparo do tecido para análise histopatológica.....	55
4.7.2 Avaliação das alterações histopatológicas.....	55
4.7.3 Análise estatística.....	59
4.8 Estudo <i>in silico</i>	59
4.8.1 Análise farmacocinética e de toxicidade.....	59
4.8.2 Docking Molecular.....	59
5 Resultados e discussão.....	61
5.1 Ensaio de Toxicidade Aguda.....	61
5.1.1 Determinação da DL50.....	61
5.1.2 Análise histopatológica do ensaio de toxicidade aguda.....	62
5.2 Ensaio de inibição de edema abdominal em zebrafish.....	66
5.2.1 Análise histopatológica do ensaio de inibição de edema abdominal.....	70
5.3 Docking molecular.....	77
5.3.1 Análise farmacocinética e toxicológica.....	77
5.3.2 Docking molecular: COX-1 E COX-2.....	79
5.4 Discussão.....	85
6 Considerações finais.....	89
Referências.....	90
Apêndices e Anexos.....	99

1 INTRODUÇÃO

Processos inflamatórios são respostas fisiológicas do organismo contra danos e lesões sofridas por agentes biológicos infecciosos como bactérias, vírus, parasitas e veneno ou quando há alguma lesão física, como calor, radiação ou trauma. Para que esse processo inflamatório seja desencadeado é necessário que esta lesão ative uma via inflamatória. As vias mais comuns são a via da Cascata do ácido araquidônico, que ocorre através das Ciclooxygenases (COX) e da lipo-oxigenase (LOX) e a via NF-Kb, que atua no núcleo da célula ligando-se ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e mediando a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Comercialmente existem dois tipos de fármacos anti-inflamatórios no mercado, são eles os anti-inflamatórios não ésteroides (AINES) e os anti-inflamatórios ésteróides (AIES), ambos podem ser facilmente administrados via oral. Os AINES atuam através da inibição da atuação e expressão da COX, e os AIES agem inibindo a produção de fosfolipase e das interleucinas presentes no mecanismo da LOX. Por inibirem a atuação da COX os AINES impedem a produção de prostaglandina ocasionando uma superprodução de ácido clorídrico, como resultado este ácido começa a atingir as paredes do estômago podendo levar ao desenvolvimento de úlceras, enquanto os AIES atuam diminuindo o influxo e a atividade dos leucócitos e demais células de defesa, comprometendo o sistema imunológico do paciente e desregulando inúmeros processos fisiológicos.

Diante deste cenário a busca por novos fármacos cresceu, fazendo surgirem novas pesquisas abordando práticas utilizadas na medicina popular, como o uso de plantas medicinais. Este é o caso da Aniba canelilla (H.B.K) Mez, uma planta aromática presente na região amazônica. Na medicina popular acredita-se que as folhas e cascas da planta através da decocção apresentam atividade analgésica, digestiva, antibacteriana e anti-inflamatória. Estudos *in vivo* comprovam que o Óleo Essencial de Aniba canelilla possui propriedade anti-inflamatória, onde os autores atribuem esta ação ao principal constituinte. Em outro estudo outro autor além de obter o óleo essencial de Aniba canelilla realizou a sua caracterização, onde foi evidenciado que o 1-Nitro-2-feniletano representa aproximadamente 70% deste óleo.

O 1-Nitro-2-feniletano é um nitrocomposto da família dos estirenos que vem

a ser considerado similar ao 1-Nitro-2-feniletano, sendo diferenciados em sua estrutura química por apenas uma dupla ligação. Acredita-se que assim como o feniletano o feniletileno também tenha atividade anti-inflamatória, podendo ser considerada até superior que a atividade do feniletano devido a sua dupla ligação.

Neste estudo o alvo principal será a atividade anti-inflamatória e os possíveis mecanismos de ação envolvidos na metabolização do 1-Nitro-2-feniletileno utilizando o modelo animal zebrafish, que foi escolhido devido a sua homologia genética em relação ao ser humano. Além disso, este estudo também busca comparar se essa atividade anti-inflamatória tem o mesmo potencial que um fármaco já comercializado, neste caso, o ibuprofeno.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a atividade toxicológica e antiinflamatória do 1-Nitro-2-feniletileno em zebrafish.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Estudar um veículo para realizar a dissolução do 1-Nitro-2-feniletileno de forma segura para sua aplicação em zebrafish;
- II. Avaliar a toxicidade do 1-Nitro-2-feniletileno através da obtenção da DL50 em zebrafish (*Danio rerio*) adultos;
- II. Identificar as alterações comportamentais de zebrafish adultos após a exposição a diferentes doses de 1-Nitro-2-feniletileno;
- III. Avaliar a atividade anti-inflamatória do 1-Nitro-2-feniletileno através do ensaio de edema abdominal induzido por carragenina via intraperitoneal em zebrafish;
- IV. Estudar as possíveis alterações histopatológicas do fígado, intestino e rins de zebrafish após o tratamento com 1-Nitro-2-feniletileno;
- V. Realizar o estudo *in silico* utilizando docking molecular através do software GOLD para propor um mecanismo de ação para o 1-Nitro-2-feniletileno;

3.1 Aniba canelilla (H.B.K) Mez

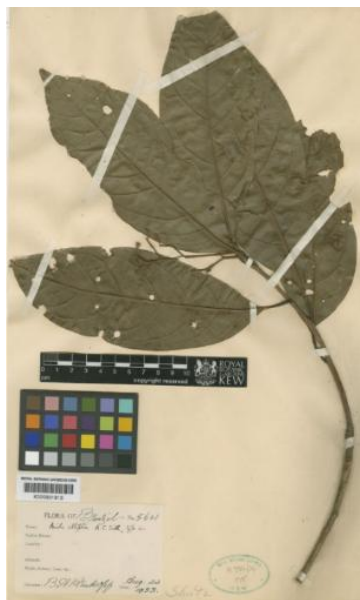
Aniba canelilla (H.B.K) Mez, conhecida popularmente como “Preciosa”, ou ainda “Casca-Preciosa”, é uma planta aromática amplamente distribuída na região amazônica e pertencente a família *Lauraceae*, sua árvore pode atingir até 35 metros de altura e apresenta tronco retiniano com diametro entre 40 a 60 cm (SIQUEIRA *et al.*, 2010). Os primeiros relatos envolvendo a casa-preciosa remotam ao período em que o Brasil estava sendo descoberto, por volta de 1.500, quando navegadores portugueses e espanhóis adentraram as margens do rio Amazonas em busca de Canela (*Cinnamomum verum*), porém se depararam com inúmeras árvores de Aniba canelilla que, por conta do aroma e folhagem (Figura 1), foram confundidas com caneleiras (PINTO, 1995).

Na medicina popular a decocção da casca dessa planta para consumo oral é utilizada como analgésico, digestivo, antibacteriano, antisséptico e anti-inflamatório. (JUNIOR *et al.*, 2020). Também pode ser utilizada através da obtenção do óleo essencial de Aniba canelilla (EOAC), onde apresenta rendimento de 1% do peso da casca da planta seca através do processo de hidrodestilação e tem como principal constituinte o 1-Nitro-2-feniletano (aproximadamente 70%), que de acordo com LIMA *et al.* (2004) é o constituinte responsável pela atividade anti-inflamatória do óleo essencial. Através de ensaios *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos em ratos normotensos também foi possível detectar que o EOAC é capaz de causar bradicardia e hipotensão (SILVA *et al.*, 2007).

O 1-Nitro-2-feniletano (NPE) é o principal constituinte do EOAC, ele pode ser encontrado nas folhas, caule e casca da Aniba canelilla. Sua concentração pode variar de acordo com a estação do ano e condições climáticas, sendo encontrado em maior quantidade nos períodos chuvosos (LIMA, 2007). A estrutura química do NPE é formado por um benzeno seguido de uma cadeia aberta insaturada ligada a uma molécula de nitrogênio e uma molécula de oxigênio, o que o torna um nitrocomposto. Através de testes *in vivo* Vale *et al.* (2013) demonstrou que o EOAC foi capaz de inibir o edema provocado por dextrana e carragenina em patas de rato e

de óleo de cróton em patas de camundongos nas concentrações de 25 e 50mg/kg no período de 1, 2, 3, 4 e 5 horas, apresentando maior atividade anti-inflamatória no período de 2 horas.

Figura 1 - Folha de Aniba canelilla



Fonte: Kubitzki & Renner, 1982.

3.2 Compostos semissintéticos

As modificações estruturais de produtos naturais desempenham um papel crucial em várias áreas, à medida que a pesquisa científica avança. Ficou evidente que produtos naturais e seus derivados semissintéticos são fontes valiosas de novos medicamentos com diversas atividades biológicas e farmacológicas (NEWMAN; GORDON, 2016; EMMA, et al., 2016). A transformação de produtos naturais em seus derivados semissintéticos tem como objetivo aprimorar a seletividade e a eficácia terapêutica, melhorar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, além de criar compostos patenteáveis.

Outros exemplos de compostos semissintéticos com atividade biológica foram descritos por Bhat et al. (2009). Eles avaliaram a atividade anti-inflamatória de vinte e três derivados sintéticos do pinitol, dos quais três compostos demonstraram a capacidade de suprimir a citocina TNF- α , inibindo 50% de sua expressão. Esses compostos foram destacados devido à sua atividade inibitória potente, comparada ao padrão rolipram, quando testados em neutrófilos tratados *in vitro* na concentração de 1.0 μ g/mL.

Em um estudo conduzido por Park, Jun e Kim (2014), foram sintetizados derivados da licochalcona B, conhecidos como (E)-3-(3,4-dihidroxi-2-metoxifenil) -1-(2,4-dihidroxi-fenil) prop-2-en-1-one (DPP). Esses derivados foram utilizados em ensaios *in vitro* utilizando macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 induzidos por LPS. Notavelmente, o composto DPP, quando administrado na concentração de 20 μ M, demonstrou uma inibição dose-dependente na produção de NO $\cdot$ (óxido nítrico) e citocinas pró-inflamatórias. Esse efeito foi alcançado por meio da inibição do fator de ativação nuclear NF- κ B em células RAW 264.7 induzidas por LPS. NF- κ B

Como mencionado anteriormente, vários compostos semissintéticos já foram identificados devido à sua atividade anti-inflamatória. Um exemplo notável é a 1,8-naftiridina-3-carboxamida, a partir da qual foram realizadas diversas sínteses moleculares e subsequentes ensaios *in vitro* para comprovar sua capacidade anti-inflamatória. Nesse contexto, seis desses compostos demonstraram uma inibição superior a 50% na produção de IL-1 β quando testados na concentração de 1 μ g/mL. Além disso, cinco desses compostos também apresentaram uma inibição superior a 50% na produção de IL-6, tanto na concentração de 1 μ g/mL quanto de 0.1 μ g/mL (KUMAR et al., 2009).

3.3 Nitroestirenos

A partir da década de 1940 os nitrocompostos foram sintetizados e submetidos a avaliações para diversas patologias (ROZENSKI et al., 1995). Até hoje, o uso de nitrocompostos como agentes quimioterápicos, especialmente com atividade antimicrobiana, permanece relevante, exemplificado pelo metronidazol (GODMMAN et al., 2000). Além disso, alguns metabólitos de nitro aromáticos, como a hidroxilamina, podem interferir na rota metabólica de determinados agentes antifúngicos (BARREIRO et al., 2001).

Nitrocompostos de diversas classes terapêuticas têm encontrado aplicação em uma ampla gama de contextos, incluindo: Antianginosos (nitroglicerina, tetranitrato de eritrila, dintrato de isossorbida); Anti-hipertensivos (nifedipina, nitredipina, niguldipina); Imunossupressores (azatioprina); Anticoagulantes (acenocumarol); Antiparasitários (metronidazol, tinidazol, benzinidazol, nifurtimox, dimetridazol, 4-nitromegazol, nitrofurazona, furazolidona); Sedativos hipnóticos (clonazepam, flunitazepam, nitrazepam); Anti-inflamatórios (nimesulida); Anti-histamínicos H-2

(granitidina, nizatidina); Antibacterianos (clorafenicol, azidanfenicol, nirofural, nifuroxazida); Antineoplásicos (nitacrina, nitroacridina) (VIODÉ, 1998; KATZUNG, 2022).

A biorredução enzimática do grupo nitro é fundamental para a atividade biológica da maioria dos nitrocompostos com ação antineoplásica, antiparasitária e antibacteriana (VIODÉ et al., 1998; MAYA et al., 2007). Esse processo é essencial para que esses compostos exerçam seus efeitos terapêuticos. A redução do grupo nitro nos nitrocompostos pode levar à formação de intermediários reativos ou ao esgotamento do sistema de redução de equivalentes (VIODÉ, 1998).

A redução do grupo nitro em aminocompostos pode envolver diferentes intermediários e derivados reativos, como o ânion-radical, nitroso, hidroxilamina e cátion-radical amino. A redução completa do grupo nitro até o grupo amino requer a transferência de seis elétrons, embora a hidroxilamina seja o produto final da biorredução (MORENO et al., 1988).

Em meio anaeróbio, durante o processo de redução enzimática do grupo nitro, os principais intermediários ou metabólitos formados são o radical ânion-radical nitro e a hidroxilamina. O radical ânion-radical nitro ($\text{Ar-NO}^{\cdot-}$) e a hidroxilamina (Ar-NHOH) podem interagir com o DNA celular. No entanto, há evidências de que outros intermediários também possam apresentar atividade biológica. Por exemplo, o radical $\text{Ar-NO}_2\text{H}^{+\cdot}$ pode causar toxicidade ao DNA, enquanto o derivado nitroso (Ar-NO) pode atuar na inativação de enzimas detoxificantes, agindo como um aceptor de grupos tióis dessas enzimas (VIODÉ et al., 1998).

Em meio aeróbio, o nitro radical ânion gerado durante o processo de redução enzimática interage com o oxigênio molecular presente no meio, em uma etapa metabólica conhecida como ciclo fútil, resultando na formação do ânion-radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Esse radical superóxido, por sua vez, pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por enzimas como a superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio pode causar danos em membranas biológicas e reagir com enzimas ferredoxinas, levando à liberação de espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$), que são tóxicos para células bacterianas e parasitárias (VIODÉ et al., 1998; MAYA et al., 2007).

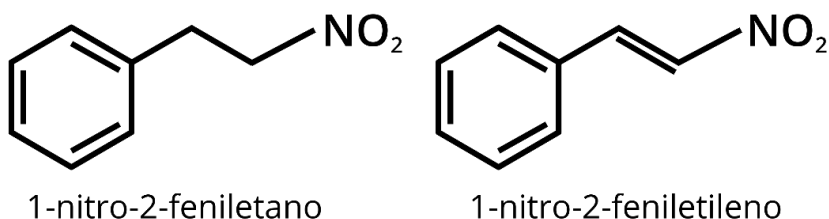
A redução do grupo nitro, dependendo do ambiente celular, pode prosseguir além da formação do radical nitro ânion ($\text{NO}^{\cdot-}$), alcançando o estágio da hidroxilamina

e, finalmente, da amina. Em presença de oxigênio, o radical nitro-ânion pode ser revertido para a forma do grupo nitro, formando novamente o radical superóxido. A produção de radicais livres resultantes do processo de biorredução do grupo nitro pode levar à peroxidação de membranas biológicas, inibição de enzimas e danos ao DNA (THOCHER, 1997).

3.4 1-Nitro-2-feniletano

O 1-Nitro-2-feniletano (NPE) é o principal constituinte do EOAC, ele pode ser encontrado nas folhas, caule e casca da Aniba canelilla. Sua concentração pode variar de acordo com a estação do ano e condições climáticas, sendo encontrado em maior quantidade nos períodos chuvosos (LIMA, 2007). A estrutura química do NPE é formado por um benzeno seguido de uma cadeia aberta insaturada ligada a uma molécula de nitrogênio e uma molécula de oxigênio (Fig. 2), o que o torna um nitrocomposto.

Figura 2 - Estrutura química do NPE e NPe.



Fonte: Sugimoto *et al.*, 2017; Autor, 2022.

Através de testes *in vivo* Vale *et al.* (2013) demonstrou que o EOAC foi capaz de inibir o edema provocado por dextrana e carragenina em patas de rato e de óleo de cróton em patas de camundongos nas concentrações de 25 e 50mg/kg no período de 1, 2, 3, 4 e 5 horas, apresentando maior atividade anti-inflamatória no período de 2 horas.

Pertence à classe de compostos nitro denominada nitroestirenos, esses compostos apresentam um grupo NO₂, que é um grupo retirador de elétrons. Em seu estado natural, o nitrofeniletieno tende a assumir predominantemente a configuração E (trans) em relação à ligação dupla na cadeia de carbono, com relação ao grupo nitro e ao grupo fenil (CALHEIROS *et al.*, 2004).

Os nitrocompostos, em especial os derivados nitro-heterocíclicos, têm sido

objeto de estudo como agentes antimicrobianos desde a década de 1940. Observou-se que os derivados 5-nitro-furânicos substituídos possuem uma notável atividade antibacteriana (DODD et al., 1944). Recentemente, a citotoxicidade do nitrofeniletieno e seus análogos foi avaliada em relação aos macrófagos peritoneais de camundongos (SANTOS, 2012).

3.5 1-Nitro-2-feniletieno

O NPe é um composto que pode ser obtido de forma sintética ou através da reação de Claisen-Schmidt a partir do OEAC. Sua estrutura química é similar a estrutura química do NPE (Figura 2), ambos são nitrocompostos que possuem um anel benzenico com duplas ligações alternadas e que são diferenciados através de uma segunda ligação, que no caso do NPe é uma ligação saturada. Essa diferença também reflete na troca do sufixo “ano” pelo sufixo “eno”. Diversos estudos publicados relatam seu potencial anti-inflamatório, como no estudo de Sugimoto *et al.* (2017), onde o composto de NPe sintetizado foi capaz de evitar a ativação de macrófagos e reduziu a ativação das vias NF- κ B e ERK *in vitro*.

3.6 Processos inflamatórios

Processos inflamatórios são respostas de defesa do sistema imunológico inato que ocorrem após o organismo sofrer danos celulares derivados de um ataque sofrido por microorganismos, agentes físicos ou químicos (LIMA, 2007). Durante esta resposta acontecem diversas alterações fisiológicas, como o aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular da microcirculação na região afetada, formação de edema, dor no local acometido, acúmulo de leucócitos e reparação tecidual (LUO *et al.*, 2021). O processo inflamatório ocorre em duas fases, ele se inicia com a inflamação aguda e posteriormente pode evoluir para uma inflamação crônica. A primeira fase trata-se de uma resposta imediata a um determinado agente danoso, onde há a participação de mediadores químicos no local da lesão e tem como característica o aumento do fluxo sanguíneo para que haja o transporte das proteínas plasmáticas. Já o processo crônico é a evolução da inflamação aguda onde o dano tecidual, ocasionado por parte do agente, já ocorreu e há uma tentativa de repação de danos por parte do sistema imunológico. A diferenciação destas duas fases pode ser realizado através do estudo histopatológico, onde é possível visualizar a presença

de células mononucleares infiltradas, o dano tecidual e a tentativa de reparação através da substituição do tecido danificado por células do tecido conjuntivo (CHITSAZ *et al.*, 2021).

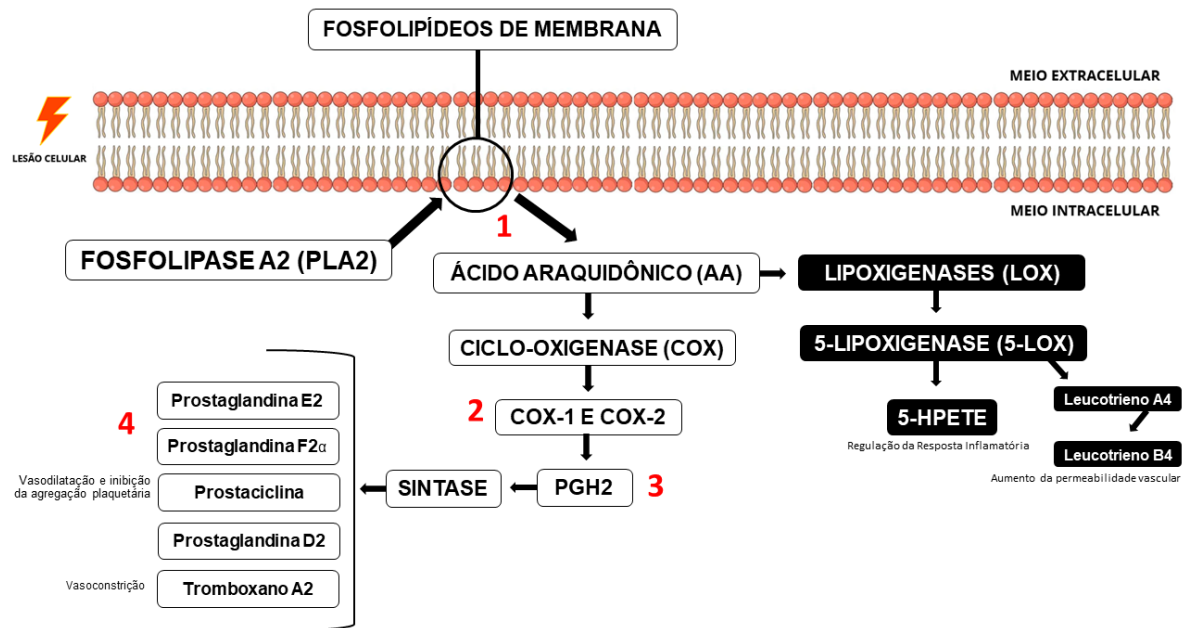
As alterações adscritas tanto no processo agudo quanto no crônico são responsáveis pelas manifestações dos cinco sinais cardinais do processo inflamatório, são estas alterações que estimulam a dor, o calor, o rubor, o tumor e a perda da função (CARVALHO *et al.*, 2017).

Para que haja um processo inflamatório se faz necessário uma via de ação, onde ocorre a atividade de diversos mediadores. As principais vias de interesse encontradas são a cascata de ácido araquidônico e a via de sinalização NF- κ B.

3.6.1 Via da Cascata de ácido araquidônico

A cascata de ácido araquidônico possui três pilares: A Fosfolipase A₂ (PLA₂), a Ciclo-oxigenase (COX) e a Lipoxigenase (LOX). A PLA₂ é responsável pela conversão dos fosfolipídios presente nas membranas celulares em Ácido Araquidônico (AA) (Figura 3, Passo 1), que posteriormente poderá ser metabolizado pelas isoenzimas COX-1 e COX-2 pertencentes a classe das COX (Passo 2). Estas por sua vez convertem o AA em Prostaglandina H₂ (PGH₂) (Passo 3) para que possa sofrer sintase e dividir-se em Prostaglandina E₂ (PGE₂), Prostaglandina F₂ alfa (PGF₂), Prostaciclina (PGI₂), Prostaglandina D₂ (PGD₂) e Tromboxano A₂ (TXA₂) (Passo 4) (GONÇALVES *et al.*, 2021, WANG *et al.*, 2022). Como via alternativa a COX o AA também pode ser metabolizado via Lipoxigenase (LOX), que através da 5-LOX é capaz de converter o AA em 5-HPETE (BAKER *et al.*, 2011).

Figura 3 - Via da cascata do Ácido Araquidônico.



Fonte: Autor, 2022; BORGES *et al.*, 2018.

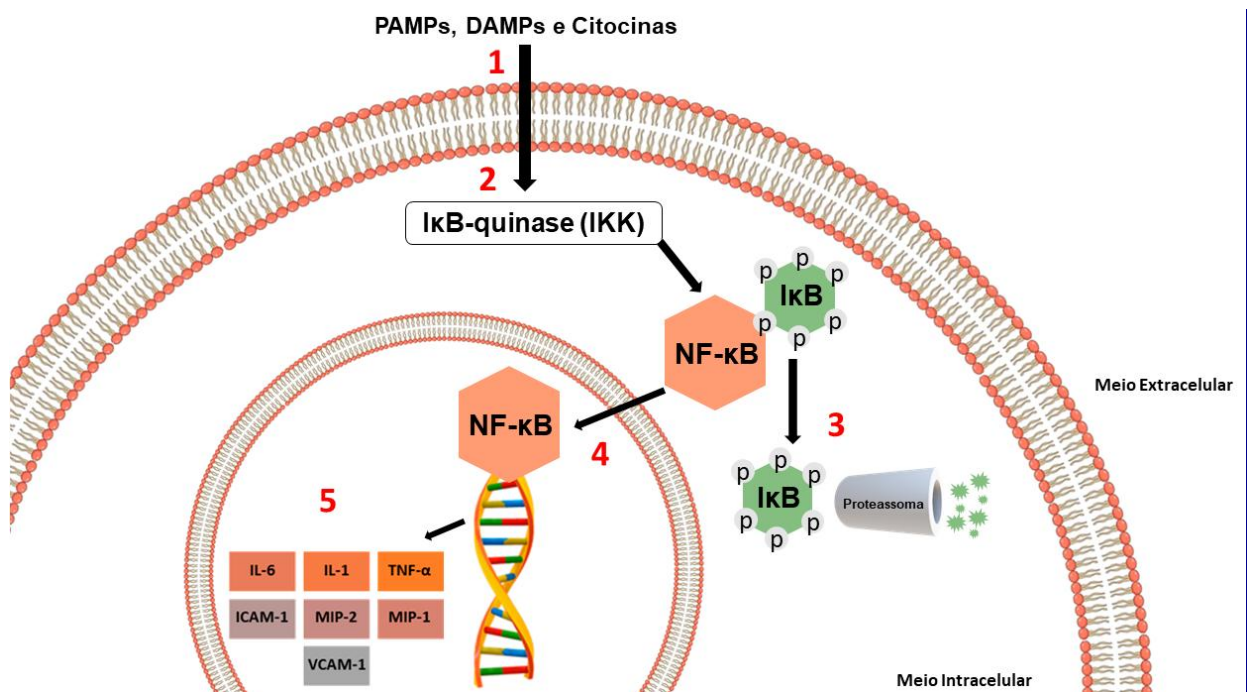
As prostaglandinas no geral se manifestam de diferentes maneiras, a PGI₂, por exemplo, estimula a vasodilatação e a inibição da agregação plaquetária, enquanto a TXA₂ promove a vasoconstrição e promove a agregação plaquetária, enquanto a PGE₂ aumenta a permeabilidade vascular, aumenta a infiltração leucocitária e é responsável pela febre. A PGI₂ e a TXA₂ apesar de serem derivados do mesmo produto são consideradas antagonistas e de fundamental importância pois ao se contraporem ambas mantêm a homeostase intravascular (POLUHA e GROSSMANN, 2018).

3.6.2 Via de sinalização do fator nuclear κ B (NF- κ B)

Diferente da cascata do ácido araquidônico a NF- κ B ocorre principalmente no interior do núcleo da célula produzindo citocinas. Para despertar essa via se faz necessária a indução através de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e infecções bacterianas ou virais que podem se manifestar através de PAMP's e DAMP's (Figura 4, Passo 1) (ATTIQ *et al.*, 2021). Após o receptor de PAMP's e DAMP's se ligarem as moléculas ocorre a ativação da I κ B-quinase (IKK) através da fosforilação (Passo 2). Esta enzima por sua vez irá marcar as moléculas de inibidora de κ B (I κ B) através da poliubiquitinação (p), que transportam essa molécula para

serem fosforiladas através do proteassoma (Passo 3). Livre das moléculas inibidoras o NF- κ B consegue fazer o transloco até o núcleo da célula (Passo 4), onde o NF- κ B liga-se ao DNA da célula e atua como mediador para transcrição de diversos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF- α , MIP-1, MIP-2, ICAM-1 e VCAM-1 (Passo 5) (BORGES *et al.*, 2018; HOESEL e SCHMID, 2013; BAKER *et al.*, 2011).

Figura 4 - Mecanismo de ativação da via NF- κ B.



Fonte: Autor, 2022; BORGES *et al.*, 2018.

3.6.3 Desenvolvimento da inflamação.

A evolução da inflamação, de acordo com Bogliolo e Brasileiro Filho (2011), ocorre em uma sequência de eventos que incluem os seguintes estágios:

I. Irritação: Esse estágio é desencadeado por uma agressão que leva à liberação de moléculas de alarme, como PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos).

II. Fenômenos vasculares: Durante esta fase, ocorrem alterações na circulação local, incluindo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que permitem a entrada de células e proteínas do sistema imunológico no local da inflamação.

III. Fenômenos exudativos: Neste estágio, ocorre a exsudação de plasma e células, especialmente leucócitos, do leito vascular para o interstício, onde desempenham um papel crucial na defesa contra patógenos.

IV. Fenômenos alterativos: Pode haver degeneração e/ou necrose do tecido lesado, dependendo da gravidade da lesão.

V. Fenômenos resolutivos: Após a mitigação da irritação, ocorre uma diminuição na atividade inflamatória, muitas vezes mediada por mecanismos anti-inflamatórios intrínsecos.

VI. Fenômenos reparativos: Nesta fase, o tecido lesado é reparado por meio de regeneração ou cicatrização, dependendo da capacidade de regeneração do tecido afetado.

Essa sequência de eventos representa a resposta do corpo à irritação ou lesão e é crucial para a restauração da homeostase e a recuperação do tecido afetado.

I. Irritação

A inflamação é a resposta inicial e não específica do organismo a estímulos que podem ser mecânicos, químicos ou microbianos. Os agentes inflamatórios carregam ou promovem a síntese e liberação de moléculas sinalizadoras de agressão, conhecidas como PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos). Após a irritação, o organismo identifica esses sinais moleculares (PAMPs ou DAMPs) da agressão por meio de receptores coletivamente chamados de Receptores Reconhecedores de Padrão (PRRs), como descrito por Bogliolo e Brasileiro (2011).

Quando os PRRs são ativados pelos PAMPs ou DAMPs, ocorre uma transdução de sinal que desencadeia eventos intracelulares, resultando na liberação de mediadores da inflamação, que desempenham um papel crucial no controle da atividade inflamatória, conforme destacado por Abbas, Lichtman e Pillai (2012). Além disso, microrganismos também podem ativar diretamente o Sistema Complemento, um sistema de proteínas do sistema imunológico, que também contribui para a biossíntese de mediadores inflamatórios, como mencionado por Rhen e Cidlowski (2005).

II. Fenômenos vasculares

Os fenômenos vasculares na inflamação são marcados por dois eventos principais: mudanças no fluxo sanguíneo e vasodilatação, juntamente com alterações na permeabilidade vascular. Essas mudanças facilitam o movimento de proteínas plasmáticas e células sanguíneas da circulação para o local da inflamação, como

observado por Ryan e Majno (1977). Esses fenômenos vasculares são os responsáveis pelos sinais cardinais de inflamação, que incluem RUBOR (vermelhidão) e CALOR (aumento da temperatura local) (LIBBY, 2007).

A vasodilatação inicialmente ocorre devido à ação da histamina e ao reflexo axonal mediado pela substância P nas terminações nervosas. Essa vasodilatação é mantida posteriormente por substâncias como as prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), fator de agregação plaquetária (PAF) liberado por células ativadas e óxido nítrico (NO) produzido pelo endotélio vascular. Esse processo resulta em um aumento significativo do fluxo sanguíneo para a área afetada (BOGLIOLO & BRASILEIRO, 2011).

Por outro lado, o aumento na permeabilidade vascular é consequência da formação de poros nas células endoteliais, que ocorre devido à contração do citoesqueleto dessas células sob a ação da histamina, substância P, prostaglandinas e leucotrienos (ROBBINS et al., 2005). Essa maior permeabilidade permite a passagem de proteínas plasmáticas e células sanguíneas para o local da inflamação, contribuindo para a resposta inflamatória.

III. Fenômenos exsudativos

Os fenômenos exsudativos são caracterizados pela exsudação plasmática e celular do leito vascular para o interstício, sendo essenciais na resposta inflamatória. A saída de proteínas do plasma para o interstício aumenta a pressão oncótica, o que favorece a retenção de água local, resultando na formação do edema inflamatório, que é um dos sinais cardinais da inflamação conhecido como TUMOR (LIBBY, 2007).

A exsudação plasmática possui características específicas que incluem a saída de anticorpos e proteínas do complemento, que desempenham funções líticas e opsonizadoras contra os microrganismos. Além disso, o fibrinogênio exsudado polimeriza-se e forma a fibrina, que serve como substrato para o transporte de leucócitos. Também permite a saída de proteínas com ação inibidora sobre proteases e com propriedades antioxidantes, reduzindo o potencial lesivo da inflamação (BOGLIOLO & BRASILEIRO, 2011).

A exsudação celular compreende várias etapas: a) Saída de leucócitos dos vasos sanguíneos para o sítio inflamatório; b) Síntese de moléculas de adesão, como as selectinas e a Molécula de Aderência Intracelular (ICAM-1), sob a influência de

citocinas como o TNF- α e a IL-1; c) Interação das moléculas de adesão presentes no endotélio vascular com as integrinas presentes na superfície dos leucócitos, resultando na marginação dessas células para a periferia dos vasos (HALL, 2011). Esse processo é crucial para a migração eficaz dos leucócitos para o local da inflamação e seu papel na resposta inflamatória.

Após a marginação dos leucócitos na parede dos vasos sanguíneos, ocorrem várias etapas importantes no processo de migração dessas células para o local da inflamação. Essas etapas incluem o rolamento, a ativação, a ligação forte, o espraiamento e a diapedese, e todas elas envolvem a participação das moléculas de adesão (LEY *et al.* (2007).

A ativação dos leucócitos representa um aumento na afinidade das integrinas presentes na superfície dessas células pelos seus ligantes na superfície do endotélio vascular. Isso é mediado, em parte, pelas quimiocinas liberadas no local da irritação. As quimiocinas direcionam a saída dos leucócitos dos vasos e sua migração pelo interstício em direção ao local de maior concentração dessas substâncias, em um fenômeno chamado quimiotaxia (BOGLIOLO & BRASILEIRO, 2011).

Uma vez no local inflamatório, os leucócitos podem desempenhar várias funções importantes, como a fagocitose de patógenos, a liberação de outros mediadores inflamatórios, a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a degranulação, entre outras. Essas ações dos leucócitos são fundamentais para a resposta inflamatória e para a eliminação de agentes agressores.

IV. Fenômenos alterativos e resolutivos.

As degenerações e necroses são alterações que podem ocorrer como resultado direto ou indireto da ação do agente inflamatório e podem surgir tanto no início quanto durante o curso da inflamação. Quando a irritação cessa, há uma redução na produção geral de mediadores pró-inflamatórios, e os mediadores anti-inflamatórios podem então desempenhar um papel crucial na condução ao término da inflamação, processo conhecido como resolução (BOGLIOLO & BRASILEIRO, 2011).

A resolução da inflamação é um aspecto importante da resposta inflamatória, uma vez que ajuda a restaurar a homeostase e a normalidade dos tecidos afetados após a resposta inflamatória ter cumprido sua função de combater agentes agressores e promover a reparação dos danos teciduais.

3.6.4 Mediadores químicos da inflamação

Os mediadores químicos da inflamação são gerados por meio de duas vias distintas. Na primeira via, esses mediadores são pré-formados e armazenados em grânulos dentro das células, sendo posteriormente sintetizados no local da inflamação quando ocorre um estímulo. Diversas células têm a capacidade de produzir e liberar uma variedade de mediadores químicos no local da inflamação, incluindo macrófagos teciduais, mastócitos, células endoteliais e leucócitos que migram da corrente sanguínea para o sítio inflamado. Por exemplo, os macrófagos liberam citocinas, enquanto os mastócitos liberam histamina e serotonina (ROBBINS *et al.*, 2005; KAIN *et al.*, 2014). Na segunda via, os mediadores químicos da inflamação são originados a partir de precursores proteicos que são sintetizados no fígado e circulam no plasma sanguíneo. Isso inclui componentes dos sistemas do Complemento, das Cininas e da Coagulação/Fibrinólise.

Os mediadores químicos da inflamação compreendem uma variedade de substâncias, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO), enzimas lisossômicas encontradas nos leucócitos, neuropeptídeos como a substância P, citocinas como o fator de necrose tumoral, interleucina-1 e quimiocinas, aminas vasoativas como histamina e serotonina, além dos metabólitos do ácido araquidônico, tais como prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas (KAIN *et al.*, 2014).

É crucial ressaltar que a inflamação é desencadeada por mediadores pró-inflamatórios, e o processo de resolução da inflamação, que ocorre após a fase de irritação inicial, também é controlado por mediadores anti-inflamatórios. Além disso, a inflamação está intrinsecamente ligada a outros fenômenos vasculares, exsudativos, resolutivos e reparativos no organismo (BOGLIOLO; BRASILEITO FILHO, 2011).

Conforme Robbins *et al.* (2005), os mediadores pró-inflamatórios mais significativos são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1), que são produzidos dentro dos macrófagos, entre outras células. A nível sistêmico, esses dois mediadores desempenham um papel fundamental nas reações da fase aguda, manifestando-se através de sintomas como sonolência, diminuição do apetite, febre e aumento da síntese de proteínas da fase aguda pelo fígado, entre outros.

3.6.4.1 Citocinas

As citocinas são proteínas liberadas por várias células, incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e adipócitos. Elas desempenham papéis importantes na regulação da resposta inflamatória e podem ser divididas em citocinas pró-inflamatórias (Th1), que promovem a eliminação de lesões, e citocinas anti-inflamatórias (Th2), que inibem o agravamento do processo inflamatório (CALDER, 2015).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória fundamental e faz parte da família das citocinas. Ele desempenha um papel essencial na progressão de processos inflamatórios crônicos e na regulação da resposta do hospedeiro a desafios microbianos durante infecções. Além disso, o TNF favorece a regulação positiva das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), a produção de interferon γ (IFN- γ) e a expressão de receptores de interleucina-2 (IL-2R) (HOP, 2017).

A Interleucina-1 (IL-1) é produzida por diversas células, como macrófagos, monócitos, fibroblastos, células dendríticas, linfócitos B, células NK e células epiteliais. Ela desempenha um papel crucial na indução da resposta inflamatória, especialmente em relação à infecção aguda (CONTASSOT, 2012). Existem três tipos principais de ligantes IL-1: IL-1 α , IL-1 β (ambos com efeitos pró-inflamatórios similares) e o antagonista do receptor IL-1 (IL-1RA), que atua como um inibidor competitivo do receptor, impedindo as ações pró-inflamatórias.

A família IL-1 possui dois tipos de receptores, o tipo 1 e o tipo 2. O receptor de IL-1 do tipo 1 é responsável pela transdução de sinais intracelulares após a ligação com a IL-1, enquanto o receptor de IL-1 do tipo 2 liga-se à IL-1 sem produzir efeitos, reduzindo a disponibilidade geral para iniciar uma resposta inflamatória (TOMINAGA, 2004). O equilíbrio entre essas moléculas e receptores desempenha um papel importante na homeostase e pode estar associado a distúrbios temporomandibulares (SORENSEN, 2018).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica sintetizada por diversas células, incluindo células sinoviais, monócitos, macrófagos e fibroblastos (NISHIMOTO, 2000). Ela é detectada no plasma em resposta a lesões teciduais, com concentrações plasmáticas detectáveis aproximadamente 60 minutos após a lesão, atingindo o pico entre 4 e 6 horas e persistindo por até 10 dias. A IL-6 desempenha papéis na maturação e

ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e na diferenciação e manutenção de linfócitos T citotóxicos e células matadoras naturais (LIN, 2000). Além disso, a IL-6 é importante na transição da inflamação aguda para crônica (YAMAMOTO, 2000).

3.6.4.2 Quimiocinas

As quimiocinas pertencem a uma família de citocinas pró-inflamatórias e são classificadas em quatro subfamílias: α (CXC), β (CC), δ (CX3C) e γ (XC). Essas citocinas desempenham um papel crucial na sinalização, orientando a migração de células inflamatórias, como parte da resposta imune (AHMED, 2017).

Além de sua função na sinalização, as quimiocinas desempenham um papel importante na regulação da circulação homeostática de leucócitos nos tecidos. Elas coordenam a circulação de linfócitos entre o sangue e os tecidos linfáticos, levando-os aos linfonodos, onde ocorre a ativação das células em resposta a antígenos. Posteriormente, os linfócitos de memória migram para os tecidos lesados para fornecer imunidade. Portanto, as quimiocinas atuam como poderosos quimioatratores para eosinófilos e como fatores liberadores de histamina, desempenhando um papel significativo em reações inflamatórias alérgicas (LUSTER, 1998).

3.6.4.3 Ácido araquidônico

O ácido linoleico dá origem ao ácido araquidônico (ARA), que está presente nos fosfolípidios da membrana celular. A ação da enzima fosfolipase A2 leva à liberação do ácido araquidônico das membranas celulares. Além disso, o ácido araquidônico também pode ser produzido a partir do diacilglicerol por meio da ação da enzima diacilglicerol lipase (SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

A liberação do ácido araquidônico da membrana celular ocorre em resposta a estímulos que requerem a ação dos eicosanoides, derivados da cascata do ARA. Estes estímulos direcionam o ARA para a produção de eicosanoides por meio de processos de sinalização intracelular (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

A atividade catalítica da fosfolipase A2 é regulada por dois fatores principais: a fosforilação da enzima e os níveis de cálcio intracelular. Estímulos externos que resultam na liberação de cálcio do retículo endoplasmático ou na fosforilação da fosfolipase A2 ativam a cascata do ácido araquidônico (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

A cascata do ácido araquidônico é uma via metabólica que utiliza o ácido araquidônico para a síntese de eicosanoides, como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Esta cascata se inicia com a ação da fosfolipase A2 nos fosfolípidios para liberar o ácido araquidônico. O ácido araquidônico é então metabolizado por duas vias principais, a ciclooxygenase (COX) e a lipooxygenase (LOX).

Na resposta inflamatória, o ARA é convertido em prostaglandinas pela COX-2 (induzida), que é sintetizada por células especializadas. A COX-1 (constitutiva) também é produzida e desempenha um papel regulatório importante em várias funções fisiológicas do corpo (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

As prostaglandinas desempenham um papel essencial na geração da resposta inflamatória e têm diversas ações fisiológicas e patológicas. Elas estão envolvidas na regulação da vasodilatação ou vasoconstrição, contração ou relaxamento brônquico ou uterino, ovulação, metabolismo ósseo, aumento do fluxo sanguíneo renal, inibição da secreção gástrica, resposta imunológica, hiperalgesia, regulação da atividade quimiotática celular, resposta endócrina e angiogênese (COUTINHO, 2009).

Entre os leucotrienos, o LTB₄ é o mais estudado como alvo terapêutico na inflamação. Ele desempenha um papel fundamental na patogênese de diversas doenças inflamatórias, especialmente nas doenças alérgicas. O LTB₄ é produzido por leucócitos e promove a adesão e ativação de outros leucócitos no endotélio, facilitando sua passagem para os tecidos (Moreira, 2002).

3.6.4.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, sendo caracterizado como um radical livre gasoso, inorgânico e incolor, composto por sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, com um elétron desemparelhado. Sua síntese ocorre pela oxidação de um dos dois nitrogênios guanidinos da L-arginina, convertendo-a em L-citrulina, uma reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (MARLETTA, 1993; MONCADA, 1991).

O NO possui duas isoformas principais: a NOS constitutiva (c-NOS), que depende de íons cálcio e da calmodulina e desempenha um papel na sinalização celular, e a NOS endotelial (e-NOS ou tipo III), que está presente nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e nas plaquetas (Moncada, 1991). Quando os receptores na membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis

ou pelo aumento do atrito causado pelas células circulantes (shear-stress), isso leva ao relaxamento muscular, ativando a e-NOS presente nessas células e resultando na produção de NO (BUSCONI, 1993).

Por outro lado, o NO produzido pela ativação da i-NOS (NOS induzida) possui atividade citotóxica e citostática, o que leva à destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. O NO, devido a sua citotoxicidade, age diretamente ou reage com outros compostos liberados durante processos inflamatórios (Nava, 1995). Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam NO e intermediários reativos do oxigênio simultaneamente (Beckman, 1996). O NO desempenha um papel importante no combate a várias doenças, incluindo asma, artrite reumatoide, lesões ateroscleróticas e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (HAMID, 1993; MANNICK, 1996).

3.6.4.5 Enzimas na síntese de mediadores – PLA₂, COX E LOX

As enzimas envolvidas na síntese de mediadores incluem a fosfolipase A2 (PLA₂), a ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX). A fosfolipase A2 (PLA₂) desempenha um papel fundamental na clivagem do ácido araquidônico a partir dos fosfolípidios da membrana celular. Em seguida, as enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) utilizam o ácido araquidônico como substrato para produzir eicosanoides, que incluem prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Esses eicosanoides são mediadores importantes da inflamação. (BEGUM *et al.*, 2013).

A ciclooxigenase (COX) possui duas principais isoenzimas, COX-1 e COX-2, que desempenham um papel crucial na conversão do ácido araquidônico em Prostaglandina G₂ (PGG₂) e, subsequentemente, em Prostaglandina H₂ (PGH₂). Essas etapas são cruciais para a síntese das prostaglandinas e tromboxanos, que possuem atividade biológica e contribuem significativamente para a resposta inflamatória, como exemplificado por Wang e Dubois (2010). Além disso, as prostaglandinas, como PGI₂, PGE₂, PGD₂, têm a capacidade de promover a vasodilatação, enquanto os tromboxanos, como o tromboxano A₂, causam vasoconstrição. A nível sistêmico, as prostaglandinas também estão envolvidas na sensação de dor e na indução da febre (ROBBINS *et al.*, 2005).

A COX-1 é considerada uma enzima de atividade constitutiva, o que significa que ela está ativa no organismo mesmo na ausência de estímulos inflamatórios. Ela

desempenha um papel importante na manutenção da homeostase do organismo, regulando processos como a proteção da mucosa gástrica e a regulação do fluxo sanguíneo renal (WANG; DUBOIS, 2010).

Por outro lado, a COX-2 é uma enzima de atividade induzida por estímulos associados à inflamação. Sua produção é aumentada em resposta a estímulos inflamatórios, como lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A COX-2 está envolvida na síntese de prostaglandinas que contribuem para a resposta inflamatória, incluindo a dor e o inchaço (WANG; DUBOIS, 2010).

A COX-1 desempenha papéis fisiológicos importantes e bem estabelecidos no organismo. Ela está envolvida na produção de prostaciclina, que tem propriedades antitrombogênicas quando liberadas pelo endotélio vascular, ajudando a prevenir a formação de coágulos sanguíneos indesejados. Além disso, quando as prostaciclina são liberadas na mucosa gástrica, elas desempenham um papel citoprotetor, ajudando a proteger o estômago contra danos causados por ácido gástrico e outras substâncias irritantes (SINZINGER *et al.*, 1997).

Também é importante mencionar que a COX-1 presente nas plaquetas é responsável pela síntese do tromboxano A₂, que desempenha um papel essencial na prevenção de hemorragias espontâneas, uma vez que o tromboxano A₂ promove a agregação plaquetária e a vasoconstrição, contribuindo assim para a formação de coágulos sanguíneos em resposta a lesões vasculares. Essas funções da COX-1 são essenciais para a manutenção da homeostase e da integridade do organismo (SINZINGER *et al.*, 1997).

De acordo com Poeckel *et al.* (2008), a 5-Lipoxigenase (5-LOX) tem a capacidade de converter o ácido araquidônico em leucotrienos. Entre esses leucotrienos, o C₄, o D₄ e o E₄ são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, enquanto o leucotrieno B₄ desempenha um papel importante na quimiotaxia e na adesão dos leucócitos (ROBBINS *et al.*, 2005).

3.6.4.6 O fator de transcrição NF- κ B

A transcrição de genes relacionados à inflamação é regulada pelo fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B), cuja ativação em macrófagos desencadeia uma série de eventos inflamatórios, como destacado por Baker, Hayden e Ghosh

(2011). Alguns dos produtos dos genes ativados por NF- κ B incluem: Proteínas de adesão celular, que atuam na transmigração de leucócitos através do endotélio; Proteínas de adesão celular, que atuam na transmigração de leucócitos através do endotélio; Mediadores do sistema imunológico e das vias metabólicas da inflamação, como citocinas e quimiocinas; Proteínas de resposta ao estresse.

O NF- κ B também influencia genes relacionados à apoptose (morte celular programada) e à proliferação celular, como mencionado por Heras et al. (2009). O NF- κ B é composto por duas subunidades, ambas contendo o domínio homólogo REL, que é responsável por sua ligação ao DNA e pela transcrição de seus produtos. No entanto, normalmente, uma molécula inibidora chamada I κ B (Inibidor de κ B) se associa ao dímero do NF- κ B, impedindo sua ligação ao DNA e, assim, reprimindo sua atividade de transcrição. Além disso, o I κ B também retém o NF- κ B no citoplasma, mantendo-o inativo (HOESEL & SCHMID, 2013).

De acordo com Baker, Hayden e Ghosh (2011), a ativação do NF- κ B é desencadeada por moléculas como produtos microbianos (PAMPs), DAMPs ou citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1. Após o reconhecimento do ligante pelo receptor, ocorre uma transdução de sinal que resulta na fosforilação da enzima IKK. A enzima IKK, por sua vez, fosforila a proteína κ B (I κ B), que está inibindo o NF- κ B. Essa fosforilação leva à poliubiquitinação do I κ B e à sua subsequente degradação no proteossoma. Sem o inibidor I κ B, o NF- κ B transloca-se para o núcleo, onde pode ativar a transcrição de genes relacionados à inflamação.

É crucial destacar que, entre outros produtos, o NF- κ B também desempenha um papel na regulação da própria COX-2, discutida anteriormente. Portanto, a inibição do NF- κ B pode também resultar na inibição da COX-2, tornando-se um alvo importante para o controle da inflamação.

3.6.4.7 O fator de transcrição AP-1

Conforme Rhen e Cidlowski (2005), a transcrição de citocinas, receptores de citocinas, proteínas quimiotáticas, moléculas de adesão, collagenases e metaloproteinases é regulada pelo fator de transcrição AP-1. Assim como o NF- κ B, o AP-1 desempenha um papel importante na síntese da COX-2, (SUBBARAMAIAH *et al.*, 2002). Além de seu papel na regulação da resposta inflamatória, o AP-1 também está envolvido na transformação celular, na proliferação e na apoptose (SHAULIAN &

KARIN, 2002). Portanto, o AP-1 desempenha uma função multifacetada em processos celulares e patológicos.

3.6.4.8 Espécies reativas e estresse oxidativo na inflamação

As Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) são produtos do metabolismo celular (POLLITT *et al.*, 1978). Elas são sintetizadas principalmente através da via da NADPH-oxidase e também são geradas durante a cadeia respiratória mitocondrial durante o metabolismo das células aeróbicas. Essas substâncias, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH\cdot$) e peróxidos orgânicos, são produzidas como resultado da redução biológica do oxigênio molecular.

É importante destacar que as ROS desempenham um papel fisiológico significativo na ativação de vias metabólicas em resposta a mudanças nas condições intra e extracelulares (JABS, 1999). Além disso, essas substâncias podem ser liberadas por macrófagos ativados e neutrófilos em resposta a estímulos como bactérias, imunocomplexos, citocinas e outros estímulos inflamatórios, contribuindo assim para a resposta do sistema imunológico a ameaças potenciais.

Conforme Poyton, Ball e Castello (2009), em condições de hipóxia, a cadeia respiratória mitocondrial pode gerar óxido nítrico (NO), que por sua vez pode resultar na formação de Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS), em adição às Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Ambas as ROS e RNS são radicais livres, moléculas que possuem elétrons desemparelhados e, portanto, são altamente reativas.

Em circunstâncias normais de saúde, existe um equilíbrio entre a produção e a eliminação de radicais livres, conhecidos como oxidantes, no organismo. No entanto, quando esse equilíbrio é perturbado, esses radicais livres podem causar danos a biomoléculas e células. Para mitigar o potencial dano, o corpo possui um complexo sistema antioxidante, que inclui enzimas como a Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase, Glutathione Redutase e Catalase, bem como moléculas não enzimáticas como a Glutathione e as vitaminas C e D, que ajudam a neutralizar os efeitos prejudiciais dos radicais livres (REUTER *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo pode ser caracterizado como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade dos mecanismos antioxidantes para neutralizá-los, resultando em um excesso de oxidantes em relação aos antioxidantes.

Esse desequilíbrio pode causar danos às células e, potencialmente, afetar todo o organismo (DURACKOVA & KOVÁ, 2010).

Durante o processo inflamatório, mastócitos e leucócitos são recrutados para o local da inflamação, resultando em um fenômeno conhecido como "Explosão Respiratória" (respiratory burst). Isso ocorre devido à maior demanda por oxigênio no local inflamado, o que leva a uma maior liberação e acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS) (REUTER *et al.* (2010). Embora essas espécies reativas desempenhem um papel importante na defesa contra patógenos, é importante notar que sua ação não é específica e pode causar danos aos tecidos do hospedeiro (GERONIKAKI & GAVALAS, 2006).

3.7 Modelo experimental zebrafish (*Danio rerio*)

O *Danio rerio* (Figura 5), também conhecido como peixe-zebra, é uma espécie de peixe originária do subcontinente asiático, em países como Índia, Bangladesh e Nepal. Sua classificação científica é a seguinte: **Reino:** Animalia; **Filo:** Chordata; **Classe:** Actinopterygii; **Ordem:** Cypriniformes; **Família:** Cyprinidae; **Gênero:** *Danio*; **Espécie:** *D. rerio*. Essa classificação taxonômica é comumente utilizada na literatura científica para identificar e descrever essa espécie de peixe (SEGNER; 2009; DAMMSKI *et al.* 2011; SOUZA *et al.* 2016). Na fase adulta, o zebrafish pode variar de 4 a 5 centímetros de comprimento. Uma característica notável é a sua rápida maturidade sexual, que ocorre em cerca de quatro a cinco meses de vida, tornando-o uma escolha vantajosa para estudos de toxicidade aguda e reprodutiva (SEGNER; 2009; DAMMSKI *et al.* 2011; SOUZA *et al.* 2016). Para reproduzir com sucesso o *Danio rerio* em laboratório, é comum utilizar uma fêmea em contato com dois machos, mantidos separadamente em aquários para fins de reprodução. A fêmea pode desovar a cada 2-3 dias, e cada ninhada pode conter centenas de ovos. Semelhante a outros vertebrados, o processo de reprodução do *Danio rerio* é sexual, com fertilização externa ocorrendo em meio aquático (SPENCE *et al.*, 2008).

Figura 5 - Exemplares de *Zebrafish* fêmea e macho, respectivamente.



Fonte: Autor, 2024.

Os ovos do *Danio rerio*, após a fertilização, têm um tamanho de cerca de 0,7 mm. Eles são transparentes e apresentam o vitelo separado em células distintas. Essa característica torna os embriões acessíveis para manipulação e monitoramento ao longo do processo de desenvolvimento (SPENCE *et al.*, 2008).

3.7.1 O zebrafish como modelo animal para pesquisas

Nos últimos anos, o zebrafish emergiu como o animal mais amplamente utilizado em laboratórios, ganhando destaque em experimentos e pesquisas científicas. Muitos dos resultados dessas pesquisas são compartilhados na comunidade ZFIN, que significa Zebrafish Information Network (SPENCE *et al.*, 2008).

O Zebrafish está se tornando uma alternativa ao uso de roedores devido a várias características vantajosas. Uma delas é o seu tamanho diminuto, o que reduz a quantidade de amostras necessárias para os testes. Além disso, a fertilização é externa, e a fase embrionária é transparente, o que permite a realização de testes de toxicidade de compostos ao longo de todo o período de desenvolvimento dos órgãos. As fêmeas do Zebrafish são capazes de produzir cerca de 100 ovos por dia. Seu ciclo de vida é relativamente curto, variando de 60 a 90 dias até atingirem a idade adulta. (DOOLEY *et al.*, 2000; SCHMIDT *et al.*, 2013).

O zebrafish é um modelo animal amplamente utilizado em pesquisas que abrangem diversas áreas, com foco especial em estudos genéticos e investigações relacionadas à biologia do desenvolvimento. Esse peixe tem se destacado como uma ferramenta valiosa para entender uma variedade de doenças e processos biológicos. Referências como Wésterfield *et al.* (1998) e Howe *et al.* (2013) atestam a relevância e o uso desse modelo em pesquisas científicas.

O Zebrafish apresenta uma impressionante semelhança genética com os humanos, com cerca de 70% de seus genes sendo ortólogos aos do *Homo sapiens*. Além disso, seu funcionamento em relação aos principais processos fisiológicos é altamente semelhante ao dos humanos, incluindo sistemas de órgãos-chave, como o sistema digestivo, nervoso e cardiovascular (HSU *et al.*, 2007). Essa semelhança substancial torna o zebrafish uma escolha valiosa para estudos farmacológicos, uma vez que suas respostas a agentes farmacológicos tendem a ser equivalentes às dos humanos (PETERSON *et al.*, 2015).

3.7.2 Estudos de toxicidade aguda em zebrafish

Os primeiros estudos realizados com o zebrafish concentraram-se em áreas específicas, incluindo a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diversas substâncias, sejam elas de origem natural ou sintética. Essas pesquisas, foram essenciais para esclarecer as diferenças nesses parâmetros quando comparadas aos mamíferos. O zebrafish provou ser um modelo valioso para investigar o comportamento dessas substâncias no organismo e entender suas implicações, fornecendo informações cruciais para a pesquisa biomédica (BARROS et al., 2008; SCHOLZ et al., 2008),

Conforme mencionado por Souza et al. (2016), a avaliação da toxicidade de novos fármacos desempenha um papel crucial no desenvolvimento de tratamentos médicos. O *Danio rerio*, em suas várias fases de desenvolvimento, tem sido amplamente utilizado para determinar a toxicidade média letal de substâncias, bem como para avaliar a toxicidade em órgãos específicos. Isso destaca a versatilidade desse modelo animal na realização de estudos de toxicidade, fornecendo informações valiosas para a avaliação da segurança de medicamentos e compostos químicos.

A avaliação da toxicidade de substâncias, sejam elas de origem sintética ou natural, pode ser facilmente realizada em *Danio rerio* por meio da observação da atividade locomotora (SOUZA et al., 2016). Essa aplicabilidade já havia sido mencionada em uma revisão anterior de Barros et al. (2008), e desde então, várias substâncias foram testadas para esse propósito. Essa abordagem fornece uma maneira eficaz de avaliar o impacto das substâncias testadas no comportamento do peixe-zebra, oferecendo informações importantes sobre sua toxicidade (RIBEIRO, 2013; SANTOS et al., 2016; BORGES et al., 2018).

A avaliação da toxicidade de órgãos específicos, seja por diferentes vias de administração, como a via oral ou por imersão, é um passo fundamental na pesquisa toxicológica. Por meio de análises histológicas, é possível determinar se houve ou não danos aos órgãos. Essas análises histológicas proporcionam informações cruciais sobre o impacto das substâncias testadas em órgãos específicos do *Danio rerio*, ajudando a compreender melhor os efeitos tóxicos e os mecanismos subjacentes (SOUZA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017; SANTOS et al., 2018; BORGES et al., 2018).

Em um estudo realizado por Souza et al. (2016), que avaliou a toxicidade aguda

da nanoemulsão de álcool perílico (NPOH) em zebrafish, foi observado que as concentrações testadas (25, 35, 50 e 125 µg/l) administradas por via oral causaram toxicidade. Isso se manifestou através de alterações comportamentais, morte e significativas alterações histológicas nos tecidos das brânquias, fígado e rins dos peixes.

Os resultados desse estudo demonstram que a toxicidade da NPOH está em conformidade com os padrões de toxicidade observados para nanoformulações de fármacos e xenobióticos, como mencionado em estudos anteriores por Ispas et al. (2009), Fent et al. (2010), Griffitt et al. (2010), Bilberg et al. (2012) e Clemente et al. (2013). Essa pesquisa ressalta a importância de avaliar os efeitos tóxicos de nanoformulações em organismos modelo, como o zebrafish, para compreender melhor seus impactos na saúde e no meio ambiente. (ISPAS et al., 2009; FENT et al., 2010; GRIFFITT et al., 2010; BILBERG et al., 2012)

De acordo com Souza et al. (2016), apesar de o *Danio rerio* ser um excelente modelo para avaliação toxicológica, a sua utilização em testes desse tipo ainda tem sido relativamente escassa. Alguns estudos anteriores, como os de Zhang et al. (2003), McGrath (2008) e Chen et al. (2011), avaliaram os efeitos das nanopartículas de dióxido de titânio (NPTiO₂) sobre o crescimento e alguns parâmetros histológicos desse peixe. Além disso, Griffitt et al. (2010) investigaram a toxicidade das nanopartículas de alumínio em zebrafish. Esses estudos contribuíram para expandir o conhecimento sobre os efeitos de nanopartículas e outros xenobióticos em peixes, destacando a utilidade desse modelo em pesquisas toxicológicas.

A exposição do zebrafish a nanopartículas de prata e cobre tem demonstrado toxicidade, indução do estresse oxidativo, apoptose e alterações histológicas nas brânquias. Essas alterações histopatológicas nas brânquias são consideradas como um indicativo de toxicidade respiratória. Esses estudos ressaltam os efeitos negativos das nanopartículas de prata e cobre sobre o zebrafish e a importância de investigar os potenciais riscos associados à exposição a esses materiais (GRIFFITT et al., 2007; GRIFFITT et al., 2008; CHOI et al., 2010; BILBERG et al., 2012).

Estudos inovadores têm introduzido uma nova via de administração para avaliar a toxicidade de possíveis fármacos: o tratamento por via oral (gavagem). Essa abordagem tem se mostrado eficiente na avaliação do potencial tóxico de substâncias naturais ou químicas. Além disso, esses estudos também têm incluído a avaliação da

histopatologia dos tecidos hepático, renal e intestinal como parte das análises. Essa abordagem proporciona uma compreensão mais abrangente dos efeitos tóxicos das substâncias testadas no *Danio rerio* (COLLIMORE et al., 2013; SAMPAIO et al., 2018; BORGES et al., 2018).

3.7.3 Zebrafish como modelo de estudo da inflamação e teste de substâncias anti-inflamatórias

Na literatura, vários estudos relatam o uso do zebrafish como modelo animal experimental para avaliar a atividade anti-inflamatória de diferentes compostos, um estudo envolvendo embriões de zebrafish com a nadadeira caudal seccionada e incubados em LPS examinou o efeito anti-inflamatório de diversos compostos por meio da redução da migração de leucócitos (CORDERO-MALDONADO et al., 2013)

Esses compostos incluíam fármacos com atividade anti-inflamatória conhecida, como os ésteroides (dexametasona, prednisolona), bem como substâncias naturais com atividade anti-inflamatória conhecida, como o ácido cafeico e a luteolina. No modelo utilizado, todos os compostos reduziram significativamente a migração de leucócitos de maneira proporcional à dose administrada. Esse tipo de pesquisa contribui para a identificação de novos compostos com potencial anti-inflamatório e para a compreensão dos mecanismos subjacentes à inflamação.

Lee et al. (2013) conduziu um estudo utilizando embriões de zebrafish com a nadadeira caudal seccionada e embriões estimulados com LPS para investigar a atividade anti-inflamatória do Fucoïdano. O estudo relatou uma significativa diminuição na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Óxido Nítrico (NO) em resposta ao tratamento com Fucoïdano. Esses resultados sugerem que o Fucoïdano possui propriedades anti-inflamatórias, pois reduziu a produção desses mediadores inflamatórios. Esse tipo de pesquisa é valioso para a identificação de compostos naturais com potencial terapêutico no tratamento de condições inflamatórias.

Os estudos mencionados são relevantes para a compreensão da atividade anti-inflamatória em Zebrafish e suas implicações na regeneração e tratamento de inflamações. Borges et al. (2018) explorou o potencial anti-inflamatório de nanoemulsões derivadas do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em zebrafish, usando o edema abdominal e alterações teciduais como indicadores. Isso sugere que essas nanoemulsões podem ter um efeito positivo na redução da inflamação.

Por outro lado, Xu et al. (2019) investigaram o papel da inflamação na regeneração cardíaca em zebrafish. Eles induziram inflamação severa no ventrículo e administraram pequenas doses de fármacos anti-inflamatórios, como a dexametasona e inibidores de MMP9/MMP13. Esses tratamentos promoveram a regeneração do coração e atenuaram a reação inflamatória. Isso destaca a importância de compreender como a inflamação pode afetar processos de regeneração em modelos animais como Zebrafish e como intervenções anti-inflamatórias podem ser benéficas nesse contexto.

O estudo de Zhang et al. (2019), que avaliou o efeito anti-inflamatório da Polifilina VII 8PP7 em Zebrafish, é mais um exemplo do uso desse modelo animal para investigar intervenções anti-inflamatórias. Nesse estudo, eles induziram a inflamação usando lipopolissacarídeo (LPS) e sulfato de cobre (CuSO₄) e avaliaram os efeitos observando o edema e o inchaço em diferentes partes dos embriões e em Zebrafish adultos.

A utilização do Zebrafish em estudos como esse permite uma abordagem mais completa na avaliação de compostos anti-inflamatórios e fornece informações valiosas sobre os efeitos desses compostos em diferentes estágios de desenvolvimento, desde embriões até adultos. Isso pode ser útil para identificar candidatos a medicamentos anti-inflamatórios ou compreender melhor os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória.

O estudo de Kao et al. (2010) é mais um exemplo do uso do modelo animal Zebrafish para avaliar o efeito anti-inflamatório de um composto, neste caso, o extrato de semente de uva previamente infectado com *S. aureus*. A administração intramuscular desse extrato foi realizada na posição da segunda linha lateral, logo abaixo da barbatana dorsal.

Esse tipo de abordagem permite investigar como os compostos afetam a resposta inflamatória em um sistema vivo, fornecendo informações valiosas sobre sua eficácia potencial como agentes anti-inflamatórios. O zebrafish, devido às suas características únicas e facilidade de manipulação, tem se tornado uma escolha popular em pesquisas relacionadas à inflamação e à busca por novos compostos terapêuticos.

O estudo de Burgan et al. (2016) utilizou o zebrafish como modelo animal para avaliar a capacidade anti-inflamatória da prednisolona e do Ácido 5-amino salicílico

(5-ASA) em um contexto de inflamação intestinal induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS). Isso demonstra a versatilidade desse modelo animal em investigar diferentes aspectos da inflamação e avaliar a eficácia de agentes anti-inflamatórios potenciais.

A capacidade de reproduzir condições inflamatórias específicas em um sistema vivo como o Zebrafish oferece uma oportunidade valiosa para estudar os mecanismos da inflamação e testar possíveis terapias. Além disso, como mencionado anteriormente, o Zebrafish compartilha semelhanças com os sistemas biológicos de mamíferos, o que o torna um modelo relevante para essas investigações.

O modelo de inflamação proposto por Huang et al. (2014) e posteriormente adaptado por Carvalho et al. (2017) e aplicado por Borges et al. (2018) aponta uma abordagem valiosa para avaliar a formação de edema inflamatório intraperitoneal em Zebrafish adultos. Esse modelo oferece uma oportunidade de estudar a inflamação em um contexto mais relevante para adultos, o que pode ser útil em estudos de inflamação crônica ou de longo prazo.

A indução do edema abdominal inflamatório por carragenina, com a avaliação de parâmetros como níveis de proteínas pró-inflamatórias, infiltração de leucócitos e efeitos de agentes anti-inflamatórios, permite a investigação de possíveis terapias ou substâncias com potencial anti-inflamatório. Essa abordagem demonstra a versatilidade do Zebrafish como um modelo animal para estudar uma variedade de condições de inflamação e avaliar a eficácia de compostos anti-inflamatórios.

3.7.4 Carragenina como agente indutor da inflamação

Conhecida majoritariamente em três tipos, sendo estes kappa, iota e lambda, a carragenina é um polissacarídeo extraído de algas vermelhas cuja aplicação vem sendo feita em indústrias alimentícias, de cosméticos e no ramo farmacêutico. Dentro da indústria alimentícia destaca-se a carragenina iota, cujo principal uso é como espessante e estabilizante de alimentos, devido seu potencial gelificante (TOBACMAN, 2001). Já na indústria farmacêutica destaca-se a carragenina kappa, que comparada com a carragenina iota possui uma atividade inflamatória maior. Dentro da pesquisa por novos fármacos a carragenina kappa se destaca como um potente indutor de inflamação aguda, sendo aplicado com sucesso em metodologias realizadas por BORGES et al. (2018) e Carvalho et al. (2017). O seu amplo uso se

deve a sua capacidade em induzir respostas inflamatórias em locais localizados, mediante a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como as interleucinas e prostaglandinas (WEINER, 1991).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de desenvolvimento e realização dos experimentos

Este estudo foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, no Laboratório de Histologia e Biologia Celular e no Laboratório de Química Farmacêutica e Medicinal (Vinculados ao departamento de ciências biológicas e da saúde) e no Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada (Vinculado ao departamento de ciências exatas e tecnológicas), todos vinculados a Universidade Federal do Amapá e situados na Rodovia Josmar Chaves Pinto, km 2, Bairro Jardim Marco Zero.

4.2 Nitroestireno

4.2.1. Aquisição do 1-Nitro-2-feniletileno

O NPe (trans- β -Nitrostireno, Sigma Co., São Paulo, Brasil) foi adquirido da empresa Sigma-Aldric / Merck Brasil (Código N26806-5G).

Figura 6 - Apresentação comercial do NPe.



Fonte: Autor, 2023.

4.2.2. Obtenção do éster butílico

Para a dissolução foi utilizado éster butílico como surfactante. A obtenção ocorreu a partir do óleo da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) conforme metodologia estabelecido por Marinho et al. (2023).

4.2.3 Dissolução do 1-Nitro-2-feniletileno

O composto é comercializado em forma de cristais sólidos de cor amarelo claro em temperatura ambiente que, devido sua composição química, é extremamente apolar e hidrofóbico, não tolerando qualquer tipo de contato com água e soluções aquosas. Sua solubilização só é possível através do uso de dimetilsulfóxido (DMSO), um veículo aprótico, anfipático e tóxico em concentrações elevadas. Durante a realização deste estudo foram testadas diversas formas de aplicar o composto, como a fabricação de uma nanoemulsão com fibroína da seda seguindo a metodologia de Marinho et al. (2023), no entanto sem eficácia. Fora testada também a dissolução em Tween 20 e 80, no entanto sem sucesso. Por conta disto, foi necessário realizar um estudo a parte para desenvolver uma técnica própria.

Devido sua característica apolar e hidrofóbica sua dissolução ocorreu primeiramente através de Dimetilsulfóxido (DMSO) equivalente a 5% de da solução final (SF), em seguida fora adicionado o equivalente a 15% da SF de Éster Butílico (Ou éster da castanha, como também pode ser conhecido) e por último adicionado o equivalente a 80% da SF de solução salina. Durante a realização dos experimentos fora testado outras metodologias de obtenção do composto, como a de Silva (2016), no entanto nenhuma metodologia já publicada foi considerada segura para uso em zebrafish

4.2.4. Estabilidade da Solução

A solução foi preparada de acordo com a metodologia descrita acima e armazenada por seis meses em local seco, sem contato direto com a irradiação solar ou umidade e se manteve estável e em padrões adequados.

4.3 Considerações Éticas

Este estudo foi submetido ao comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Amapá (CEUA/UNIFAP) obtendo certificado de aprovação (Anexo I) sob o protocolo 005/2021.

Para a realização do estudo foram aplicadas metodologias previamente aprovadas pelo CEUA e já aplicadas em outros estudos.

4.4 Animais experimentais

Para avaliar a atividade anti-inflamatória e a toxicidade neste estudo foram utilizados espécimes de zebrafish (*Danio rerio*) da linhagem selvagem e adultos (comprimento padrão de $28,1 \pm 0,2$ milímetros pesando $0,35 \pm 0,70$ g) adquiridos da empresa Psicultura Power Fish (Betta Psicultura), localizada em Itaguaí-RJ-Brasil. Após o recebimento os animais foram mantidos em quarentena por 40 dias na Plataforma *Zebrafish* do Laboratório de Pesquisa em Fármacos do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Amapá. Após a quarentena os animais foram mantidos em um sistema unificado de tanques, no qual as condições da água foram controladas por 2 meses antes dos ensaios, conforme descrito por Carvalho *et al.* (2017).

4.4.1 Acondicionamento dos animais

A manutenção da plataforma na qual os animais foram mantidos foi realizada diariamente antes e durante a realização dos ensaios *in vivo*, observando parâmetros ambientais como pH e temperatura. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro no período de 12/12h, pH variando entre 6,8 a 8,5, temperatura entre 16 a 38°C, sendo alimentados 3x ao dia através de alimentador automático contendo ração comercial para peixes da marca Nutriflakes®, além disso, os parâmetros comportamentais dos animais também eram acompanhados diariamente. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas para o cuidado dos animais estabelecidas pelo CONCEA.

4.4.2 Processo de eutanásia do zebrafish

O processo de eutanásia dos animais experimentais após os ensaios decorreu conforme recomendado pelo CONCEA, onde foram aplicadas as técnicas preconizadas pelo Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa (2019) da Universidade Federal de São Paulo, aprovado pelo CEUA/UNIFESP. Para a realização da eutanásia os animais foram imersos em solução aquosa contendo um agente anestésico (Lidocaína) para realizar o processo de perda de equilíbrio do animal. Em seguida foi empregado um meio mecânico (água em baixa temperatura (8-10 °c) para a parada do opérculo. Após o a parada fora contado o período de 3 minutos, caso não houvesse mais movimentos estava constatada a morte do animal.

4.5 Ensaio de toxicidade aguda em zebrafish

4.5.1 Preparo dos animais experimentais e determinação da DL50

24h antes da realização dos experimentos, os animais foram pesados em balança analítica (Balança Analítica WebLabor Mod. M214Ai) e distribuídos individualmente em aquários contendo água do sistema divididos em 8 grupos (n=5 animais/grupo) na mesma faixa de peso em triplicata (Figura 3). Nesse período os animais foram privados de alimentação e de contato com outros animais para evitar alterações comportamentais ou até mesmo o canibalismo. Após esse período, os animais foram submetidos ao processo de gavagem utilizando a metodologia estabelecida por Carvalho et al. (2017), onde o volume da dosagem de cada grupo foi calculado de acordo com o peso de cada animal para a posterior administração (Figura 7) utilizando uma micropipeta. Para isso os animais foram divididos em grupos conforme mostra a tabela 1.

Figura 7 - Processo de gavagem em *zebrafish*.



Fonte: Autor, 2024.

Tabela 1 - Separação dos animais em grupo para a realização do ensaio de toxicidade aguda.

GRUPO		SOLUÇÃO	ANIMAIS POR GRUPO	ANIMAIS TOTAIS
G1		Veículo - Solução Salina	5	15
G2		Veículo - Éster Butílico a 15%	5	15
G3		DMSO a 5%	5	15
G4		5 mg/kg	5	15
G5		8 mg/kg	5	15

G6	10 mg/kg	5	15
G7	12 mg/kg	5	15
G8	15 mg/kg	5	15
Total			120

Fonte: Autor, 2023.

4.5.2 Avaliações dos parâmetros comportamentais

Para a avaliação dos parâmetros comportamentais foi desenvolvida uma ficha adaptando os parâmetros previamente estabelecidos por Souza *et al.* (2016). Os animais foram observados nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 24h após o processo (Figura 8).

Figura 8 - Grupos de *zebrafish* em avaliação dos parâmetros comportamentais pós gavagem na plataforma *zebrafish* – LPF/UNIFAP.



Fonte: Autor, 2023.

Através da ficha (Apêndice 1) foi possível dividir as alterações comportamentais em quatro estágios, conforme mostra o quadro 1.

Quadro 1 - Parâmetros comportamentais avaliados

ESTÁGIO	PARÂMETRO AVALIADO
ESTÁGIO I	Aumento da Atividade Natatória
	Tremores na Cauda
ESTÁGIO II	Natação Circular
	Perda de Equilíbrio

ESTÁGIO III	Perda de Motilidade
	Repouso
	Morte
OUTRAS ALTERAÇÕES	Agressão ou Canibalismo
	Perda de Coloração
	Hiperventilação do Opérculo

Fonte: Adaptado de Souza *et al.*

4.6 Ensaio de inibição de edema abdominal em zebrafish

Para a realização do ensaio de inibição de edema abdominal os animais foram divididos em grupos (n=5/grupo em triplicata) (Tabela 2), pesados em balança analítica (Balança Analítica WebLabor Mod. M214Ai) e isolados em reservatórios individuais. Os animais foram divididos em 8 grupos no total (n=15/grupo), onde o **Grupo 1** representou o controle negativo e os animais foram tratados com solução salina (2 µl) e submetidos a injeção de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (20 µl) via intraperitoneal (i.p), **Grupo 2** onde foi realizado o controle positivo e os animais foram tratados com solução salina (2 µl) e submetidos a injeção de Carragenina + PBS (20 µl) via i.p., **Grupo 3** que representou o grupo controle veículo, onde os animais foram tratados com Éster Butílico a 15% e DMSO a 5% (2 µl) e submetidos a injeção de Carragenina + PBS (20 µl) via i.p., **Grupo 4** que representou o grupo padrão onde os animais foram tratados com Ibuprofeno 10 mg/kg e submetidos a injeção de Carragenina + PBS (20 µl) via i.p., **Grupo 5** que representou o grupo padrão onde os animais foram tratados com dexametasona 0,5 mg/kg e submetidos a injeção de Carragenina + PBS (20 µl) via i.p. **Grupo 6** que representou o grupo Tratamento 1 onde os animais foram tratados com NPe a 05 mg/kg e submetidos a injeção de Carragenina + PBS (20 µl) via i.p., **Grupo 7** que representou o grupo Tratamento 2 onde os animais foram tratados com NPe a 10 mg/kg e submetidos a injeção de Carragenina + PBS (20 µl) via i.p., e o **Grupo 8** que representou o grupo Tratamento 3 onde os animais foram tratados com NPe a 15 mg/kg e submetidos a injeção de Carragenina + PBS (20 µl) via i.p., conforme a tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos grupos para realização da avaliação do potencial anti-inflamatório através do ensaio de inibição de edema abdominal em *zebrafish*.

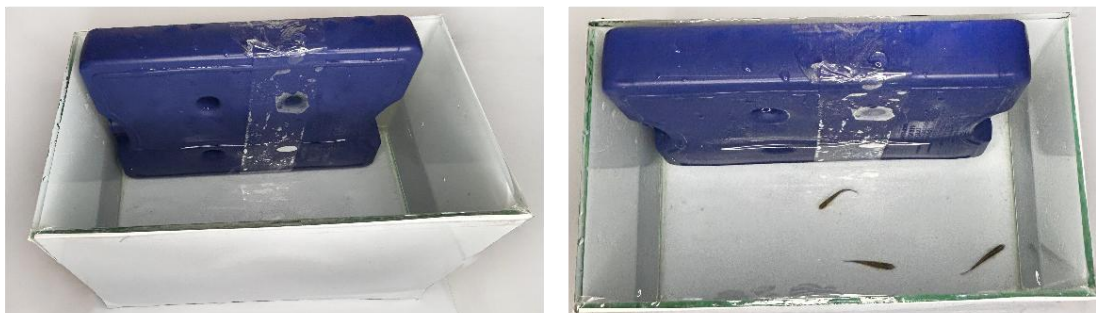
GRUPO	DESCRIÇÃO	VIA ORAL	VIA INTRAPERITONEAL
G1	Grupo controle Negativo	Solução Salina (2 µl)	PBS (20 µl)
G2	Grupo controle Positivo	Solução Salina (2 µl)	Carragenina + PBS (20 µl)

G3	Grupo controle Veículo	Éster Butílico a 15% e DMSO a 5% (2 µl)	Carragenina + PBS (20 µl)
G4	Grupo Padrão 1 (AINE)	Ibuprofeno 10 mg/kg	Carragenina + PBS (20 µl)
G5	Grupo Padrão 2 (AIE)	Dexametasona 0,5 mg/kg	Carragenina + PBS (20 µl)
G6	Grupo Tratamento 1	NPe 5 mg/kg	Carragenina + PBS (20 µl)
G7	Grupo Tratamento 2	NPe 10 mg/kg	Carragenina + PBS (20 µl)
G8	Grupo Tratamento 3	NPe 15 mg/kg	Carragenina + PBS (20 µl)

Fonte: Autor, 2023.

Para determinar a atividade anti-inflamatória, foi avaliada a capacidade do NPe em inibir a formação de edema abdominal induzido em *zebrafish*. Para isso, após 1 hora dos animais serem tratados com os grupos dispostos acima ocorreu o processo de anestesia em água em baixa temperatura (8-10°C) (Figura 9), em seguida houve a indução da inflamação através da administração de 20µL de Carragenina (Sigma Co, Lote 65H1096) em PBS por via intraperitoneal (i.p) (Figura 10), de acordo com a metodologia proposta por Borges *et al.* (2018). As dosagens de 05, 10 e 15 mg/kg foram escolhidas por serem consideradas adequadas no ensaio de toxicidade aguda previamente realizada.

Figura 9 - Método de anestesia por resfriamento em *zebrafish* utilizado durante o ensaio de inibição de edema abdominal.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 10 - Procedimento de indução de inflamação por carragenina i.p. em *zebrafish*.



Fonte: Autor, 2024.

4.6.1 Avaliação dos parâmetros comportamentais

Após a administração da carragenina, os animais foram observados nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas. Os parâmetros comportamentais avaliados foram adaptados conforme descritos por Souza *et. al.* (2016) e se deram da mesma maneira que as avaliações do ensaio de toxicidade descrito anteriormente.

4.6.2 Peso corporal e formação do edema

Após a finalização do processo de avaliação dos parâmetros comportamentais, todos os animais foram pesados novamente utilizando balança analítica e os valores do peso inicial e o peso final foram utilizados para calcular o índice de aumento do peso corporal dos animais, que neste ensaio foi marcador para a formação de edema inflamatório. Para realizar o cálculo foi utilizado a fórmula $\text{Peso final} - \text{Peso Inicial} = \text{Peso Total do Edema}$. Após a segunda pesagem, os animais foram eutanasiados em água em baixa temperatura e armazenados em Solução de Bouin para posterior processamento histológico.

4.7 Estudo histopatológico pós ensaio *in vivo*

4.7.1 Preparo do tecido para análise histopatológica

Após o processo de eutanásia, os tecidos dos animais foram processados de acordo com as técnicas descritas por Souza et al. (2016), Carvalho et al. (2017) e pelo protocolo do Laboratório de Histologia e Biologia Celular da UNIFAP - HISTOBIO. Logo após o processo de eutanásia, os tecidos foram prontamente imersos em Solução de Bouin durante 24h para a realização do processo de fixação, em seguida, o tecido foi imerso em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, Sigma Co., São Paulo, Brasil) durante o período de 48h para descalcificação, logo após esse período os animais foram retirados do EDTA e segmentados em plano sagital e adicionados a um cassete de uso histológico. Após isso as peças percorreram pelo álcool 70%, 80%, 90%, 100% I e 100% II para a realização do processo de desidratação, permanecendo durante 1 hora em cada concentração. Posteriormente, esse tecido foi submerso em Xilol I e Xilol II para realizar o processo de diafinização ou clareamento, permanecendo 40 minutos em cada Xilol, sendo logo em seguida submerso em Parafina I e Parafina II para a realização do processo de impregnação, permanecendo 1 e 2 horas, consecutivamente. Em seguida esse tecido foi incluso em parafina utilizando a Central de Inclusão (Central de Inclusão CI 2014, Lupetec®, Brasil) pertencente ao laboratório HISTOBIO. Após a obtenção do bloco houve a realização dos seccionamentos histológicos através do uso de um micrótomo (Rotary Microtome Cut 6062, Slee Medical, Alemanha) na espessura de 5µm, em seguida os cortes foram transferidos para lâminas de microscopia em vidro e corados com Hematoxilina e Eosina (hematoxilina Harris da Laborclin e eosina-Inlab Co.).

4.7.2 Avaliação das alterações histopatológicas

Para a avaliação das alterações histológicas foram selecionados como órgãos de interesse rins, fígado e intestino devido ao processo de metabolização e farmacocinética dos compostos presentes neste estudo. Após passarem pelo processamento histológico de obtenção da lâmina esses órgãos foram analisados por microscopia óptica (Microscópio Biológico Binocular CralTech) e as fotografias foram obtidas através da câmera digital (Scope-Imagem 9.0 USB, Bioimager Inc., EUA). As alterações observadas foram classificadas de acordo com gravidade e ocorrência, permitindo o cálculo do Índice de Alterações Histológicas (IAH), conforme descrito por

Poleksic & MitrovicTutundzic (1994), para isso, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^{na} ai + 10 \sum_{i=1}^{nb} bi + 10^2 \sum_{i=1}^{nc} ci}{N}$$

Onde:

a: primeiro estágio muda

b: segunda etapa muda

c: alterações do terceiro estágio

na: número de alterações consideradas como primeiro estágio

nb: número de alterações consideradas como segunda etapa

nc: número de alterações consideradas como a terceira etapa

N: número de peixes analisados por tratamento

Para a avaliação das alterações histológicas foram seguidos critérios previamente estabelecidos em Poleksic e MitrovicTutundzic (1994), Rigolin-Sá (1998) e Takashima e Hibiya (1995) e amplamente aplicadas em estudos como Souza *et. al.* (2016) e Carvalho *et. al.* (2017). Para isso foram atribuídos os seguintes estágios para as alterações em rins, fígado e intestino de zebrafish conforme quadros 2, 3 e 4:

Quadro 2 - Alterações histológicas consideradas para a análise dos rins de *zebrafish*.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
A) Alterações do tecido linfóide	
Perda do contorno celular ou contorno celular atípico	I
B) Alterações nos glomérulos e túbulos renais	
Baixa degeneração da hialina tubular	I
Degeneração grave da hialina tubular	II
Hipertrofia das células tubulares	I
Desorganização tubular	I
Desorganização glomerular	I
Degeneração tubular	II
Degeneração gomerular	II
Aumento no espaço da cápsula de Bowman	I
Diminuição do espaço da cápsula de Bowman	I
Dilatação dos capilares glomerulares	I
Degeneração citoplasmática das células tubulares	II

Degeneração nuclear das células tubulares	II
Presença de túbulos regenerados ou néfrons “novos”	I
Presença de vários grânulos PAS positivos em tubular epitélio	I
Obstrução tubular	I
Aumento do lúmen tubular	I
Presença de tecido linfóide na cápsula de Bowman	II
Diminuição da frequência relativa do glomérulo	I
C) Alteração nos vasos sanguíneos	
Dilatação dos vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura de vasos sanguíneos	II
D) Estágio terminal	
Necrose	III

Fonte: Alterações baseadas em Poleksic e MitrovicTutundzic (1994), Rigolin-Sá (1998) e Takashima e Hibiya (1995).

Quadro 3 - Alterações histológicas consideradas para a análise de fígado de *zebrafish*

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
A) Alteração no hepatócitos	
Desarranjo do cordão hepático	I
Perda ou atipia do contorno celular	I
Perda ou atipia do contorno nuclear	I
Aumento do volume celular	I
Aumento do volume nuclear	I
Atrofia nuclear	II
Intensa vacuolização citoplasmática	I
Vacuolização nuclear	II
Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos	I
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Rompimento celular	II
Diminuição do glicogênio	I
Estagnação biliar	I
B) Alterações nos vasos sanguíneos	
Aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos	I

Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
Aumento do volume relativo dos vasos	I
C) Alterações nos canalículos biliares	
Degeneração dos canalículos biliares	II
D) Estágio terminal	
Necrose (focal ou total)	III

Fonte: Alterações baseadas em Poleksic e MitrovicTutundzic (1994), Rigolin-Sá (1998) e Takashima e Hibiya (1995).

Quadro 4 - Alterações histológicas consideradas para a análise de intestino de *zebrafish*.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	ESTÁGIO
Degeneração da camada muscular	I
Dilatação dos vasos presentes nas vilosidades	I
Descolamento do revestimento epitelial do ápice das vilosidades intestinais	I
Hipertrofia das células epiteliais	I
Hiperplasia de células caliciformes	I
Infiltração linfocítica estromal	I
Infiltração de leucócitos	I
Edema	I
Presença de parasitas	I
Degeneração celular	II
Atrofia vilosa	II
Hemorragia na lâmina própria	II
Vacuolização de enterócitos	II
Necrose	III

Fonte: Alterações baseadas em Carvalho et al., (2017).

4.7.3 Análise estatística

Para a realização da análise estatística todos os dados obtidos na avaliação da atividade anti-inflamatória foram expressas com média $\pm$ padrão e analisados através do *software* GraphPad Prism versão 8.0 utilizando ANOVA (one-way), seguido do teste post hoc de Tukey-Kramer, onde os valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.8 Estudo *in silico*

4.8.1 Análise farmacocinética e de toxicidade

Para essa etapa do estudo utilizou-se o servidor online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) com a finalidade de predizer as propriedades farmacocinéticas das moléculas a partir da estrutura molecular. Foram analisados os descritores: absorção do trato gastrointestinal, substrato P-gp, e inibição das enzimas CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Na avaliação toxicológica, utilizou-se o servidor admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>), que permite a partir da estrutura molecular correlacionar, informações relacionadas à hepatotoxicidade e nefrotoxicidade

4.8.2 Docking Molecular

De forma a estabelecer as interações entre os alvos e os ligantes, foi realizado o estudo de docking molecular. Para tanto, utilizou-se o programa GOLD 2020.1 (Genetic Optimisation for Ligand Docking), por meio do algoritmo genético, que permite predizer as interações entre o ligante e os alvos de interesse, além de informar o grau de afinidade pelo alvo (ORTEGA-CARRASCO; LLEDÓS; MARÉCHAL, 2014).

Tanto as moléculas propostas, NPE e NPe, quanto a molécula de referência ibuprofeno (Pubchem CID: 3672) foram otimizadas no *software* HyperChem com o emprego do método semi-empírico do tipo RM1 (Recife model 1) (GUTOWSKA; MACHOY; MACHALIŃSKI, 2005), para otimizar a geometria de cada estrutura e diminuir a energia envolvida, para impedir possíveis erros no cálculo.

Ao todo, foram realizados o estudo de docking molecular em dois alvos distintos: Ciclooxygenase 1 (COX-1) e Ciclooxygenase 2 (COX-2). As estruturas cristalográficas de cada alvo foram obtidas por meio do banco de dados Protein Data Bank (PDB). A macromolécula COX-1 (PDB ID: 3N8X), está complexada com a

nimesulida, e possui resolução de 2.75 Å. Em relação a COX-2 (PDB ID:5IKQ), que possui resolução de 2.41Å, está complexada ao ácido meclofenâmico.

De forma a estabelecer se o programa consegue reproduzir o resultado experimental de cada alvo, é necessário o processo de validação ou redocking, no qual foi obtido pelo estudo desenvolvido por Borges et al. (2018). Essa etapa fornece dados importantes para a realização da etapa posterior (docking) que são as coordenadas de origem, raio de validação e o valor de RMSD (Root Mean Square Derivation), sendo este último importante para estabelecer se o alvo foi validado ou não, no qual, valores menores que 2Å são considerados os mais aceitos, uma vez que indica que ocorreu um correto encaixe do ligante em uma orientação espacial favorável na proteína, quando comparado com o estudo experimental (HEVENER et al., 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de Toxicidade Aguda

Realizado o processo de gavagem em todos os animais fora observado de maneira imediata a existência de alterações nos parâmetros comportamentais sendo estas consideradas genéricas em todos os grupos, como o aumento na atividade natatória por exemplo. No entanto, com o decorrer das horas de observação os parâmetros estabilizaram e todos os animais retornaram ao seu comportamento considerado normal.

Decorrida as 24 horas de observação foi constatado que nenhum animal evoluiu ao óbito, sendo estes observados novamente sem apresentar mudanças comportamentais. Após todos os procedimentos necessários serem realizados estes animais foram anestesiados e eutanasiados conforme metodologia descrita anteriormente. O tecido foi acondicionado em solução de Bouin para processamento histológico posterior.

5.1.1 Determinação da DL50

Nesse ensaio foram utilizadas as dosagens de 5, 8, 10, 12 e 15 mg/kg e os animais foram observados por um período de 24h, no entanto não foi registrado nenhum óbito. Por conta disto, não foi possível determinar com precisão a DL50, sendo necessário um estudo complementar para determinar qual a dosagem máxima segura para uso terapêutico deste fármaco.

Embora não tenha sido possível determinar a DL50 neste estudo o mesmo pode ser considerado relevante, pois conseguiu avaliar a toxicidade das dosagens de 12 e 15 mg/kg, que até então não havia sido relatado na literatura. Durante levantamento bibliográfico fora encontrado como maior dose testada 10 mg/kg, conforme relatado em Silva (2016), que realizou a avaliação desta dosagem seguindo metodologias similares a aplica neste estudo.

O desenvolvimento de um veículo capaz de solubilizar de maneira homogênea este nitroestireno sem comprometer seu uso terapêutico e sem provocar atividade tóxica é considerado uma modernização dos parâmetros descritos atualmente.

5.1.2 Análise Histopatológica do Ensaio de Toxicidade Aguda

O tratamento por via oral do zebrafish com NPe apresentou poucas alterações histopatológicas no intestino, fígado e rins. A partir da sistematização dessas alterações, foi possível calcular o Índice de Alterações Histopatológicas (IAH), representado na tabela 3 e figuras 11, 12 e 13.

Tabela 3 - Média do Índice de Alteração Histopatológica em intestino, fígado e rins de Zebrafish tratados com NPe.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Intestino	0.0±0.0	0.13±0.57	0.0±0.0	3.6±0.57	4.3±0.57	4.3±1.1	4.3±0.57	4.6±1.5
Fígado	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	2.0±1.1	3.3±0.5	2.0±1.7	2.6±1.1	3.6±0.5
Rins	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

Fonte: Autor, 2024.

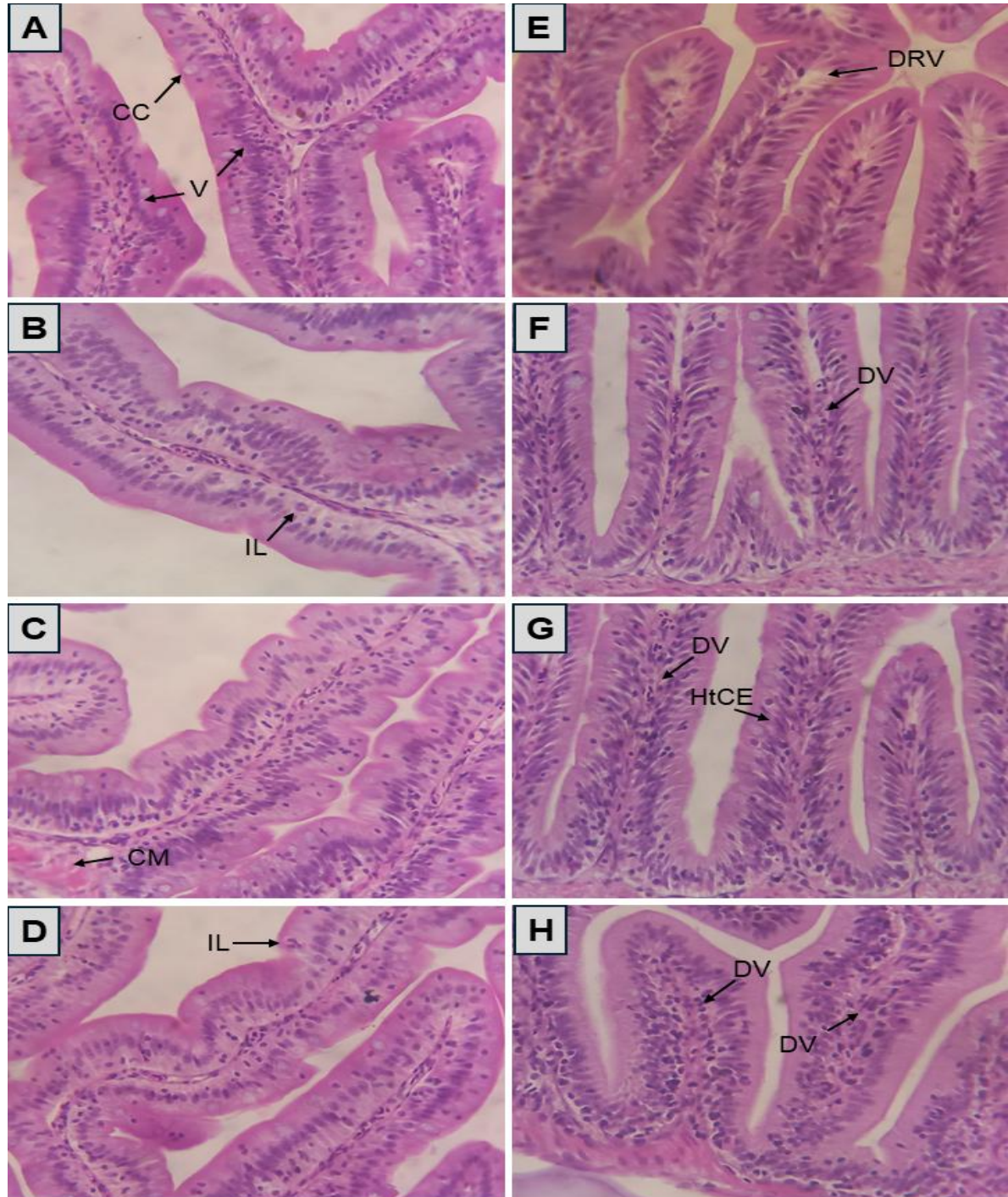
O intestino do zebrafish possui vilosidades constituídas por células epiteliais e células caliciformes que são protegidas por uma eficiente barreira mucosa (Carvalho et al., 2017). Neste estudo, todas as alterações registradas foram de nível I, como a infiltração leucocitária, dilatação dos vasos presente nas vilosidades, hipertrofia das células epiteliais e o desprendimento do revestimento no ápice das vilosidades (Fig. 11). Assim, o índice de alteração histopatológica (Tabela 3) calculado mostrou que essas alterações não são capazes de alterar o funcionamento normal do órgão.

Estudos afirmam que o tratamento do zebrafish com diferentes substâncias podem causar danos ao tecido intestinal e ao desenvolvimento celular, o que pode perturbar a fisiologia do órgão (Carvalho et al., 2017; Takashima; Hibiya, 1984).

De forma similar ao intestino, as alterações histopatológicas observadas no fígado desses animais apresentou índice que classificou esse órgão como normal, pois essas alterações não são capazes de alterar o funcionamento normal do órgão (Tabela 3). As principais alterações registradas foram a vacuolização citoplasmática, atipia nuclear e aumento do volume celular (Figura 12).

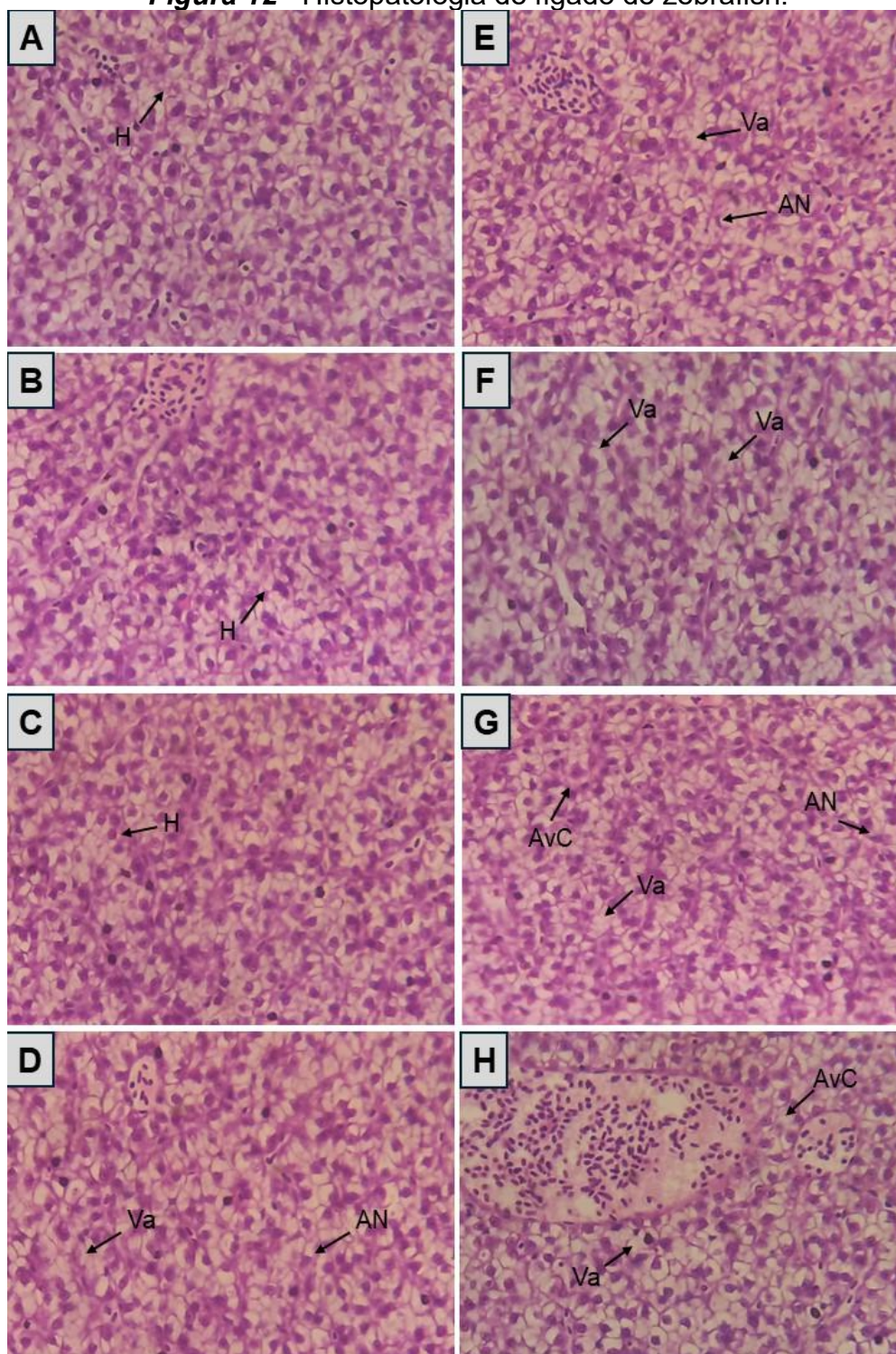
A vacuolização citoplasmática observada nesse estudo, é uma alteração muito relatada em diversos estudos de toxicidade aguda (Souza et al., 2016, Carvalho et al., 2017, Borges et al., 2018, Souza et al., 2019 e Hyacienth et al., 2020) estando associada à redução dos estoques de glicogênio nos hepatócitos e ao acúmulo de lipídios combinados com agentes tóxicos, o que pode alterar o funcionamento normal do órgão. Nesse estudo, essa alteração não foi capaz de alterar o funcionamento normal do órgão.

Figura 11 - Histopatologia de intestino de zebrafish.



Nota: Em A, observa-se intestino de animal tratado com solução salina, onde 34 fdd observa-se células caliciformes (CC) e vilosidades (V); Em B, intestino de animal tratado veículo Éster Butílico, onde observa-se infiltração linfocitária (IL); Em C, intestino de animais tratados com DMSO, onde observa-se, camada muscular (CM); Em D intestino de animal tratado com a dose de 5 mg/kg, onde observa-se, infiltração linfocitária (IL); Em E, intestino de animais tratados com a dose de 8 mg/kg, onde observa-se o desprendimento do revestimento no ápice das vilosidades (DRV); Em F, intestino de animais tratados com a dose de 10 mg/kg, onde observa-se a dilatação dos vasos (DV); Em G, intestino de animais tratados com a dose de 12 mg/kg, onde observa-se a dilatação dos vasos (DV) e a hipertrofia das células epiteliais (HtCE); Em H, intestino de animal tratado com a dose de 15 mg/kg, onde observa-se dilatação dos vasos (DV). (40X, H&E). Fonte: Autor, 2024.

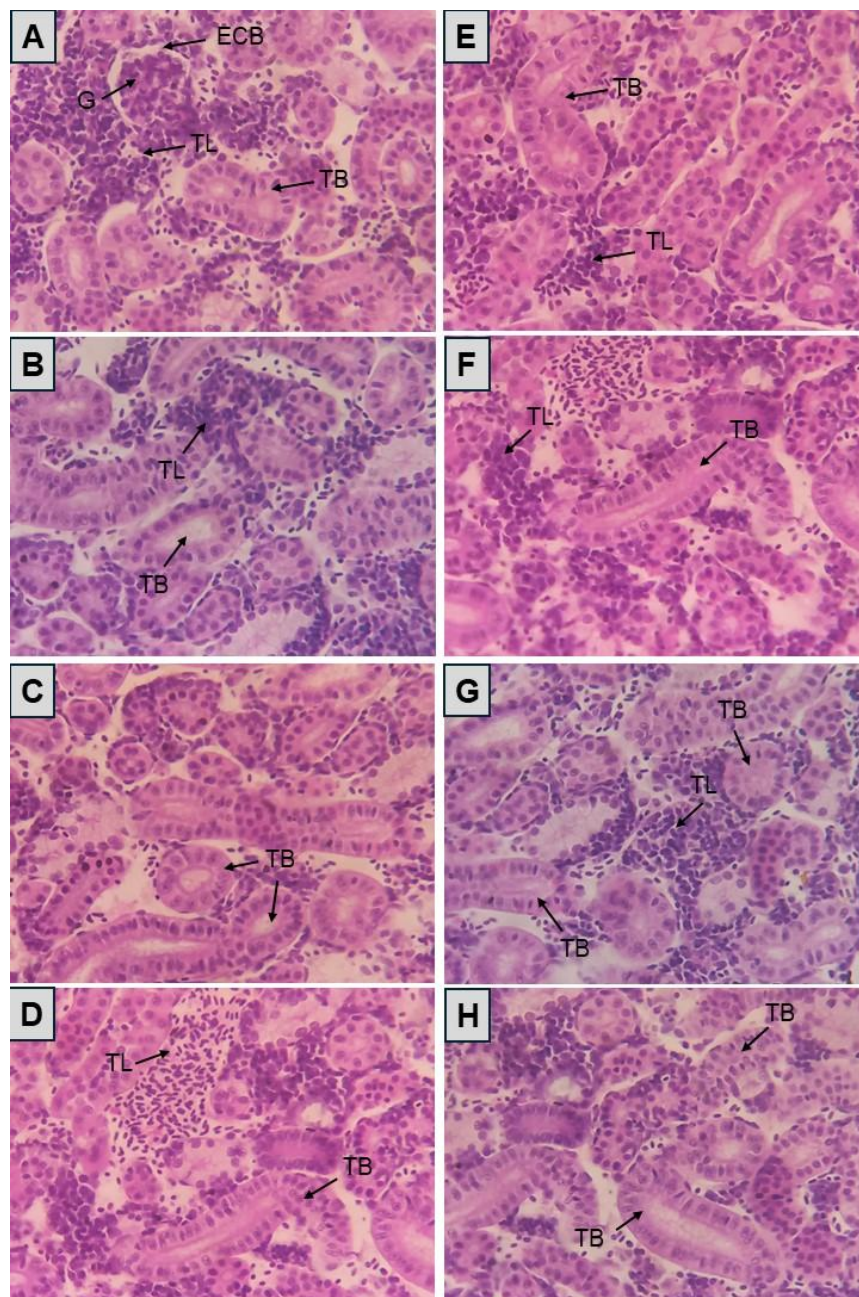
Figura 12 - Histopatologia de fígado de zebrafish.



Nota: Em A (solução salina), B (Éster Butílico) e C (DMSO) observa-se tecido hepático com hepatócitos (H) normais; Em D fígado de animal tratado com a dose de 5 mg/kg, onde observa-se a vacuolização citoplasmática (Va) e atipia nuclear (AN); Em E, fígado de animais tratados com a dose de 8 mg/kg, onde observa-se a vacuolização citoplasmática (Va) e atipia nuclear (AN); Em F, fígado de animais tratados com a dose de 10 mg/kg, onde observa-se a a vacuolização citoplasmática (Va); Em G, fígado de animais tratados com a dose de 12 mg/kg, onde observa-se a vacuolização citoplasmática (Va), atipia nuclear (AN) e aumento do volume celular (AvC); Em H, fígado de animal tratado com a dose de 15 mg/kg, onde observa-se a vacuolização citoplasmática (Va) e atipia nuclear (AN). (40X, H&E). Fonte: Autor, 2024.

O rim do zebrafish possui néfrons responsáveis pela filtração dos resíduos sanguíneos e pela absorção de sal e água. Apresenta o corpúsculo renal, o túbulo contorcido proximal e distal (Souza et al., 2019). O rim do zebrafish desempenha a importante função de excretar o volume de água que entra no animal pela boca. Também realiza a filtração de resíduos e a absorção de sal e água (Holden, Layfield, Matthews, 2012; Takashima; Hibiya, 1984). É um dos órgãos mais afetados por substâncias tóxicas, de acordo com Carvalho et al. (2017). Neste estudo, não foi registrado alteração em nenhum grupo de tratamento, demonstrando ausência de toxicidade de NPe para este órgão.

Figura 13 - Histopatologia de rim de zebrafish.



Nota: Em A, rins de animais tratado com solução salina; Em B, rins de animais tratados com Éster Butílico; Em C, rins de animais tratados com DMSO; Em D rins de animais tratados com a dose de 5 mg/kg; Em E, rins de animais tratados com a dose de 8 mg/kg; Em F, rins de animais tratados com a dose de 10 mg/kg; Em G, rins de animais tratados com a dose de 12 mg/kg; Em H, rins de animais tratado com a dose de 15 mg/kg. Observa-se: glomérulo (G), espaço da cápsula de Bowman (ECB), túbulos (TB) e tecido linfóide (TL). (40X, H&E). Fonte: Autor, 2024.

5.2 Ensaio de inibição de edema abdominal em zebrafish

Neste estudo o NPe também teve sua capacidade anti-edematogênica avaliada. Durante este ensaio todos os animais em todos os grupos, incluindo os controles, apresentaram perda de equilíbrio e hiperventilação do opérculo (Tab. 4 e Fig. 14) após a indução v.i. por carragenina, tal alteração é decorrente do próprio procedimento devido sua característica invasiva (Borges et al. 2018; Carvalho et al. 2017), no entanto aos poucos recuperaram-se e retornaram ao seu comportamento normal. Após as 5 horas de avaliação dos parâmetros comportamentais os animais foram pesados novamente, fotografados (Fig. 15) e eutanasiados conforme as diretrizes do CONCEA.

A partir do peso corporal inicial e final foi possível obter o índice de inibição de edema abdominal (Fig. 16), onde se obteve o resultado de 100% de inibição no Grupo 1 (Controle Negativo) que recebeu solução salina (v.o.) + PBS (i.p.), 0% de inibição no Grupo 2 (Controle Positivo) que recebeu salina (v.o.) e Carragenina + PBS (i.p.), 12% de inibição no Grupo 3 (Veículo) que recebeu Éster Butílico a 15% + DMSO a 5% (v.o.) e Carragenina + PBS (i.p.), 69,23% de inibição no Grupo 4 (Padrão AINE) que recebeu Ibuprofeno 10 mg/kg (v.o.) e Carragenina + PBS (i.p.), 64,61% de inibição no Grupo 5 (Padrão AIE) que recebeu 0,5 mg/kg de Dexametasona (v.o.) e Carragenina + PBS (i.p.), 47,69% de inibição no Grupo 6 (Tratamento 1) que recebeu NPe 5 mg/kg (v.o.) e Carragenina + PBS (i.p.), 52,31% de inibição no Grupo 7 (Tratamento 2) que recebeu NPe 10 mg/kg (v.o.) e Carragenina + PBS (i.p.) e 78,46% de inibição no Grupo 8 (Tratamento 3) que recebeu NPe 15 mg/kg (v.o.) e Carragenina + PBS. Através desta análise comparativa é possível determinar que o NPe, na concentração de 15 mg/kg, foi capaz de inibir a formação de edema induzido por carragenina em zebrafish, com uma ação superior a dos fármacos padrões comercializados atualmente. Além disto, as dosagens de 5 e 10 mg/kg de NPe também foram capazes de inibir a formação de edema, no entanto com um desempenho inferior ao da dose de 15 mg/kg.

Tabela 4 - Avaliação dos parâmetros comportamentais após o processo de indução nas horas 0, 1, 2, 3, 4 e 5.

ESTÁGIO	HORA	G1 Controle Negativo	G2 Controle Positivo	G3 - Veículo	G4 Ibuprofeno 10 /kg	G5 Dexametasona mg/kg	G6 5mg/kg	G7 10mg/kg	G8 15mg/kg
I	0h	-	-	-	B 5%				
II	0h	B 100%	B 100%	B 100%	B 100%	B 100%	B 100%	B 100%	B 100%
III	0h	-	-	-					
IV	0h	C 100%	C 100%	C 100%	C 100%	C 100%	C 100%	C 100%	C 100%
I	1h	-	-	-					
II	1h	-	-	-	-	-	-	-	-
III	1h	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	1h	-	-	-	-	-	-	-	-
I	2h	-	-	-	-	-	-	-	-
II	2h	-	-	-	-	-	-	-	-
III	2h	-	-	-	-	-	A 30%	-	-
IV	2h	-	-	-	-	-	-	-	-
I	3h	-	-	-	-	-	-	-	-
II	3h	-	-	-	-	-	-	-	-
III	3h	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	3h	-	-	-	-	-	-	-	-

I	3h	-	-	-	-	-	-	-	-
II	3h	-	-	-	-	-	-	-	-
III	3h	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	3h	-	-	-	-	-	-	-	-

I	4h	-	-	-	-	-	-	-	-
II	4h	-	-	-	-	-	-	-	-
III	4h	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	4h	-	-	-	-	-	-	-	-

I	5h	-	-	-	-	-	-	-	-
II	5h	-	-	-	-	-	-	-	-
III	5h	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	5h	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota: Estágio I: A) Aumento da atividade natatória, B) Tremores na cauda. Estágio II: A) Natação circular, B) Perda de equilíbrio. Estágio III: A) Perda de Motilidade, B) Repouso. C) Morte. Outras Alterações Comportamentais (Estágio IV): A) Agressão ou Canibalismo, B) Perda de Coloração, C) Hiperventilação do opérculo. Fonte: Autor, 2024.

Figura 14 - Animais apresentando perda de equilíbrio.



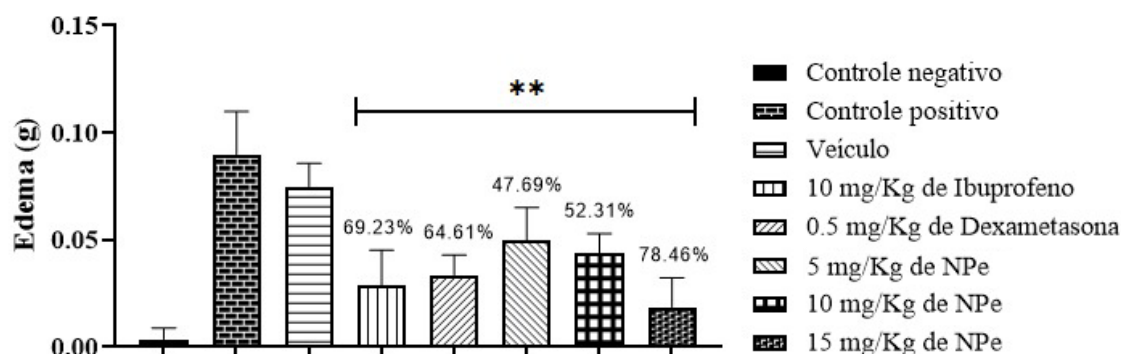
Fonte: Autor, 2024.

Figura 15 - Avaliação visual da formação do edema abdominal em *zebrafish* 5 horas após a indução por carragenina i.p.



Nota: G1: Animais tratados via oral com Salina e submetidos a injeção intraperitoneal contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS). G2: Animais tratados via oral com Salina e submetidos a injeção intraperitoneal contendo Carragenina + PBS (20ca µl). G3: Animais tratados via oral com Salina e submetidos a injeção intraperitoneal contendo Carragenina + PBS (20 µl). G4: Animais tratados via oral com Ibuprofeno na dose 10mg/kg e submetidos a injeção intraperitoneal contendo Carragenina + PBS (20 µl). G5: Animais tratados via oral com Ibuprofeno na dose 10mg/kg e submetidos a injeção intraperitoneal contendo Carragenina + PBS (20 µl). G6: Animais tratados via oral com NPe na dose 5mg/kg e submetidos a injeção intraperitoneal contendo Carragenina + PBS (20 µl). G7: Animais tratados via oral com NPe na dose 10mg/kg e submetidos a injeção intraperitoneal contendo Carragenina + PBS (20 µl). G8: Animais tratados via oral com NPe na dose 15mg/kg e submetidos a injeção intraperitoneal contendo Carragenina + PBS (20 µl). Fonte: Autor (2024).

Figura 16 - Percentual de inibição de edema abdominal em zebrafish



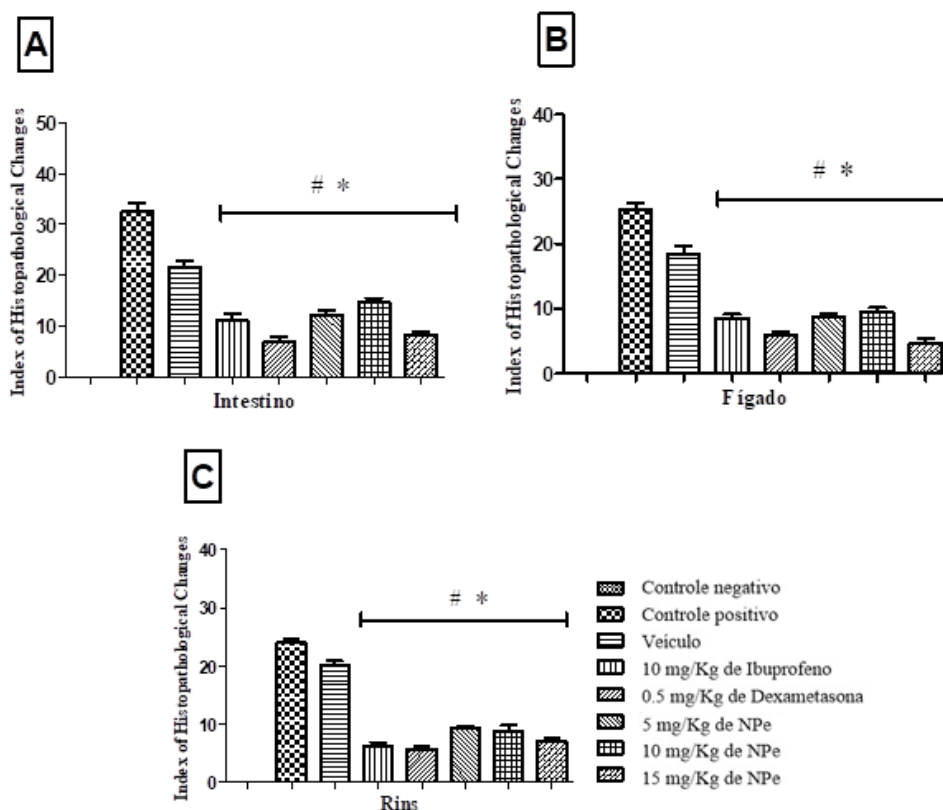
Nota: Avaliação do efeito anti-inflamatório dos grupos controles (solução salina, DMSO e Veículo, v.o.), Ibuprofeno (10 mg/kg), Dexametasona (0,5 mg/kg) e NPe (5, 10 e 15 mg/kg, v.o) no teste de edema abdominal induzido por carragenina. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (n=15/grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Tukey. Fonte: Autor, 2024.

5.2.1 Análise Histopatológica do Ensaio de Inibição de Edema Abdominal em zebrafish

Estudos afirmam que a avaliação histopatológica é um parâmetro importante para avaliar o efeito protetor de diferentes substâncias na ação inflamatória da carragenina (Ekambaram et al., 2017, Borges et al., 2018, Quitian-Useche et al., 2021). Esses autores relatam que a injeção de um agente inflamatório na região abdominal do zebrafish, pode provocar reações em órgãos vitais, como o intestino, fígado e rins.

No estudo histopatológico do intestino, os animais tratados com PBS (i.p.) e solução salina (v.o.) (0.0 ± 0.0) e as doses de 0,5 mg/kg de Dexametasona e 15 mg/kg de NPe (v.o.) (6.75 ± 2.36 e 8.2 ± 1.25 , respectivamente), apresentaram valores de IAH que variaram entre 0 e 10, indicando normalidade no tecido intestinal (Fig. 17). Os grupos que receberam carragenina (i.p.) e 10 mg/kg de Ibuprofeno (v.o.) (11.0 ± 2.94), carragenina (i.p.) e 5 mg/kg de NPe (12.2 ± 1.50) e a dose de 10 mg/kg de NPe (14.7 ± 1.50), apresentaram IAH que variou entre 11 e 20, indicando que o órgão apresentou alterações de leves a moderadas (Fig. 18). Já nos animais tratados com carragenina (i.p.) e 2 μ l de Salina (v.o.) e carragenina (i.p.) e 2 μ l de Veículo (v.o.) o IAH no intestino foi elevado (32.5 ± 3.51 e 21.5 ± 2.38 , respectivamente), indicando esse órgão com alterações de moderadas a graves. As principais alterações registradas, estão descritas na figura 18.

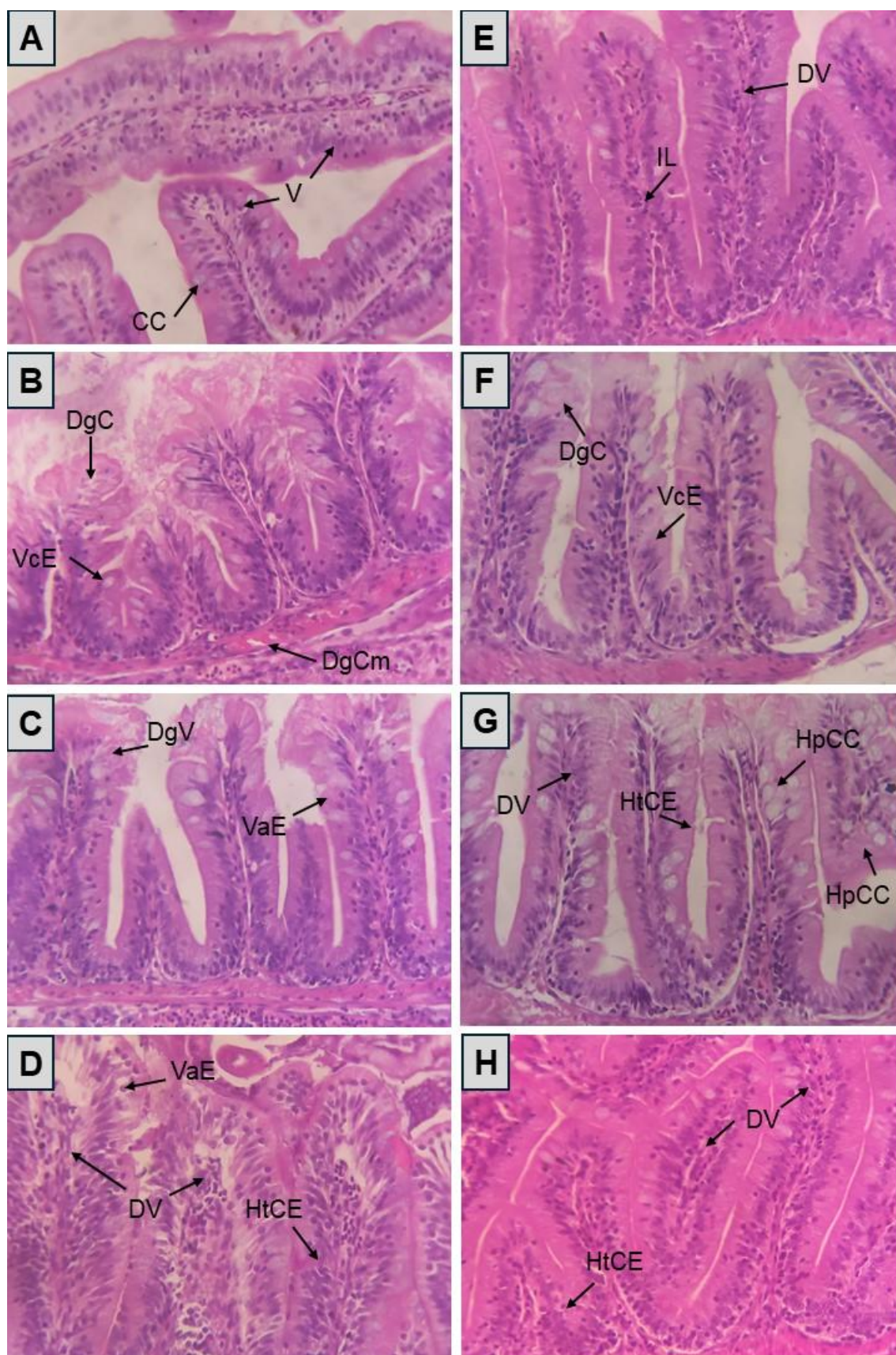
Figura 17 - Índice de alterações histopatológicas (IAH)



Nota: intestino (A), fígado (B) e rins (C) de Zebrafish adulto, na avaliação do efeito dos grupos controles (solução salina, DMSO e Veículo, v.o.), Ibuprofeno (10 mg/kg), Dexametasona (0,5 mg/kg) e NPe (5, 10 e 15 mg/kg, v.o) sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por carragenina. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (n=12/grupo). A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Tukey. Fonte: Autor. 2024.

Como se observa na figura 18, a vacuolização das células epiteliais e a degeneração vilosa foram alterações bastante observadas. De acordo com Carvalho et al., (2017), essas alterações podem ser decorrentes da injeção intraperitoneal nos animais, pois essa técnica ainda é considerada uma técnica invasiva, que pode lesionar o intestino, ocasionando inflamação na lâmina própria intestinal e infiltração leucocitária no tecido epitelial. Nesse estudo, essas alterações não foram observadas nos animais tratados com as doses de 0,5 mg/kg de Dexametasona e 15 mg/kg do NPe, indicando efeito protetor dessas substâncias nesse órgão.

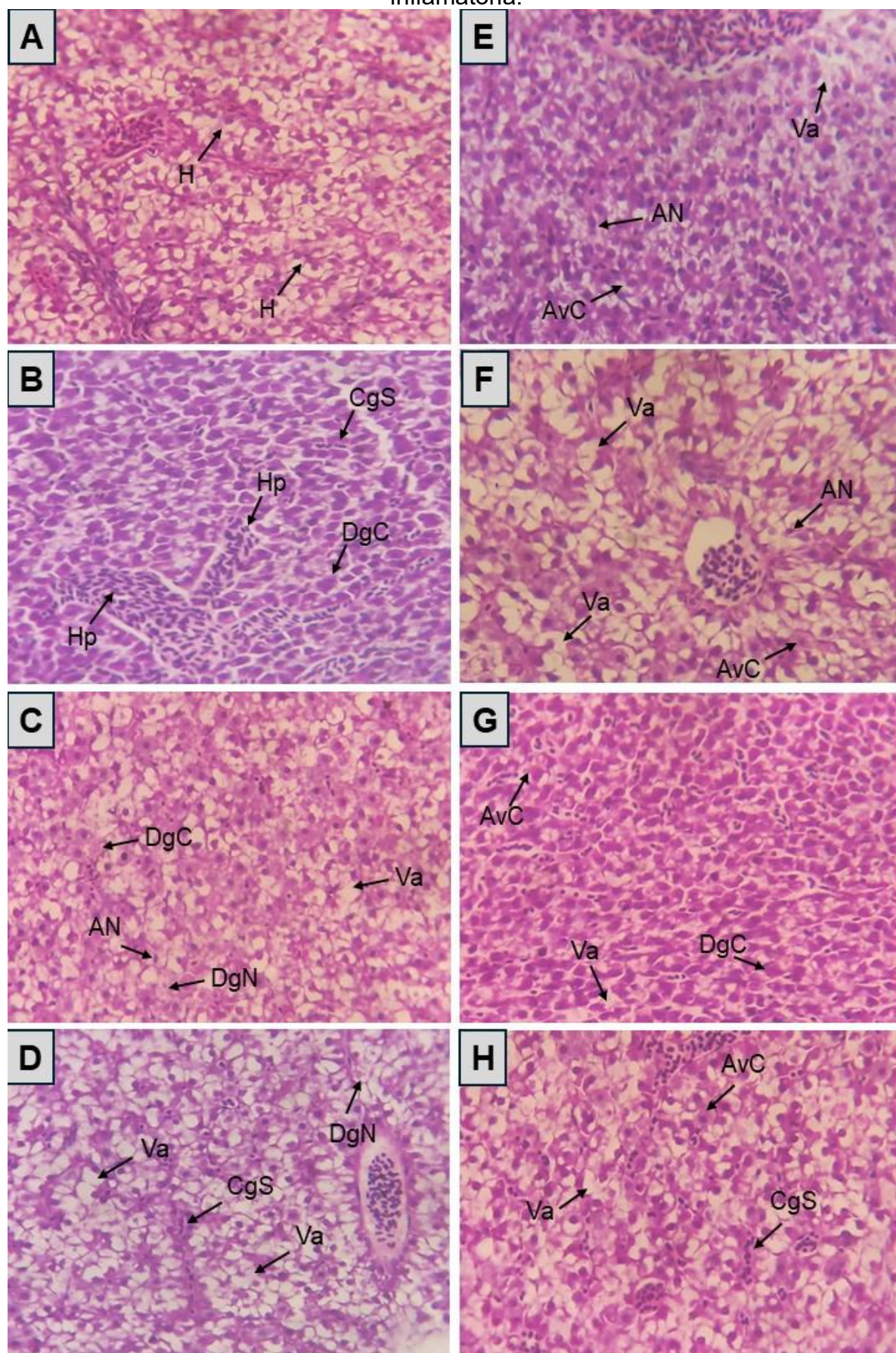
Figura 18 - Histopatologia de intestino de zebrafish de ensaio de atividade anti-inflamatória.



Nota: Em A, observa-se intestino de animal tratado com solução salina, onde observa-se células caliciformes (CC) e vilosidades (V); Em B, intestino de animais tratados com DMSO, onde observa-se a degeneração celular (DgC), vacuolização dos enterócitos (VcE), Degeneração da Camada Muscular (DgCm); Em C, intestino de animais tratados com Éster Butílico, onde observa-se a degeneração das vilosidades (DgV) e vacuolização dos enterócitos (VaC); Em D intestino de animal tratado com a dose de 10 mg/kg de Ibuprofeno, onde observa-se, vacuolização dos enterócitos (VaE), dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DV) e hipertrofia das células epiteliais (HtCE); Em E, intestino de animais tratados com a dose de 0,5 mg/kg de Dexametasona, onde observa-se o infiltração leucocitária (IL) e dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DV); Em F, intestino de animais tratados com a dose de 5 mg/kg de NPe, onde observa-se a degeneração celular (DgC), vacuolização dos enterócitos (VcE); Em G, intestino de animais tratados com a dose de 10 mg/kg de NPe, onde observa-se a dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DV) e a hipertrofia das células epiteliais (HtCE) e hiperplasia das células caliciformes (HpCC); Em H, intestino de animal tratado com a dose de 15 mg/kg de NPe, onde observa-se dilatação dos vasos (DV), hipertrofia das células epiteliais (HtCE). (40X, H&E). Fonte: Autor. 2024.

No estudo histopatológico do fígado, observou-se que apenas o grupo tratado com carragenina (i.p.) e 2 µl de salina (v.o.) (25.2 ± 2.36) apresentaram alterações de moderadas a graves. O grupo tratado com carragenina (i.p.) e 2 µl de Veículo (18.5 ± 2.38) apresentou alterações de leves a moderadas. Os demais grupos, controle e de tratamento, apresentaram IAH entre 0 e 10, indicando que o órgão permaneceu funcionalmente normal. As principais alterações registradas, estão descritas na figura 19.

Figura 19 - Histopatologia de fígado de zebrafish de ensaio de atividade anti-inflamatória.

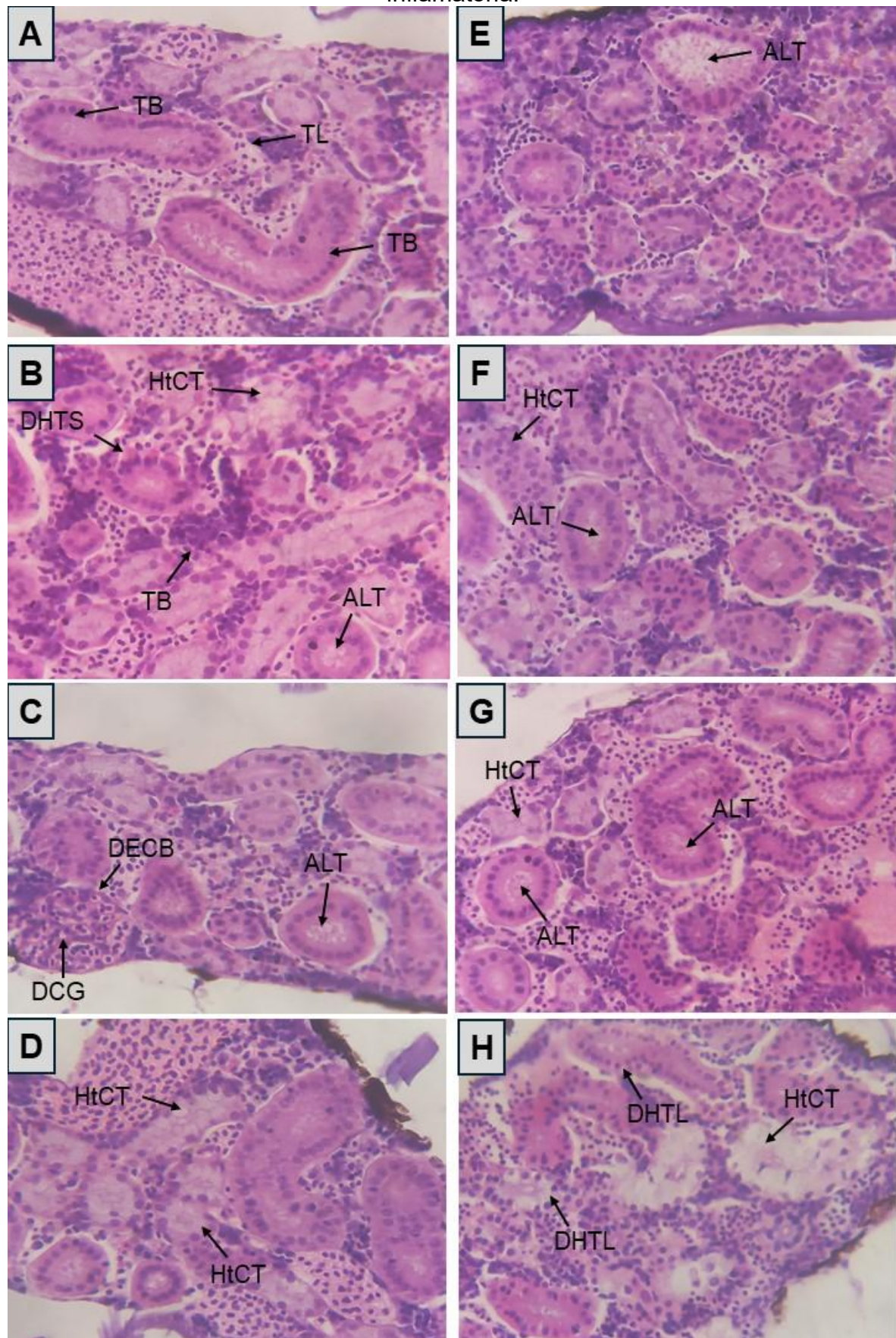


Nota: Em A, observa-se fígado de animal tratado com solução salina, onde observa-se hepatócitos normais; Em B, fígado de animais tratados com salina e com indução de inflamação, onde observa-se a degeneração celular (DgC) e hiperemia (Hp); Em C, fígado de animais tratados com DMSO e Éster Butílico, onde observa-se a degeneração celular (DgC), degeneração nuclear (DgN), vacuolização celular (Va) e atipia nuclear (AN); Em D fígado de animais tratado com a dose de 10 mg/kg de Ibuprofeno, onde observa-se, vacuolização dos celular (Va), degeneração nuclear (DgN) e congestão sinusoidal (CgS); Em E, fígado de animais tratados com a dose de 0,5 mg/kg de Dexametasona, onde observa-se a vacuolização dos celular (Va), atipia nuclear (AN) e aumento do volume celular (AvC); Em F, fígado de animais tratados com a dose de 5 mg/kg de NPe, onde observa-se a vacuolização dos celular (Va), atipia nuclear (AN) e aumento do volume celular (AvC); Em G, fígado de animais tratados com a dose de 10 mg/kg de NPe, onde observa-se a vacuolização dos celular (Va), atipia nuclear (AN) e degeneração celular (DgC); Em H, fígado de animal tratado com a dose de 15 mg/kg de NPe, onde observa-se a vacuolização celular (Va), congestão sinusoidal (CgS) e aumento do volume celular (AvC). (40X, H&E). Fonte: Autor, 2024.

O mesmo padrão de índice de alterações histopatológicas encontrada no fígado foi observada nos rins. Apenas o grupo tratado com carragenina (i.p.) e 2 µl de DMSO (v.o.) (24 ± 1.41) apresentaram alterações de moderadas a graves (Figura 20). O grupo tratado com carragenina (i.p.) e 2 µl de Veículo (20 ± 1.63) apresentou alterações de leves a moderadas. Os demais grupos de tratamento, apresentaram IAH entre 0 e 10, indicando que o órgão permaneceu funcionalmente normal. As principais alterações registradas, estão descritas na figura 20.

Já está bem descrito que a anatomia glomerular e a função dos rins do zebrafish são similares aos dos humanos (Dammski e Muller, 2011). São órgãos diretamente relacionados ao metabolismo de fármacos, responsáveis pela filtração e eliminação de seus metabólitos (Ferreira et al. 2019). Atuam no controle da homeostase, na eliminação da água que entra no peixe pela boca, e na excreção de substancias através da filtração glomerular, secreção tubular ativa e reabsorção tubular passiva (Borges et al. 2018, Ferreira et al. 2019, Holden et al. 2013, Hiacyent et al., 2020).

Figura 20 - Histopatologia de rins de zebrafish de ensaio de atividade anti-inflamatória.



Nota: Em A, observa-se rins de animal tratado com solução salina, onde observa-se túbulos (TB) e tecido linfóide (TL); Em B, rins de animais tratados com DMSO, onde observa-se a degeneração hialina tubular severa (DHTS), hipertrofia das células tubulares (HtCT) e aumento do lúmen tubular (ALT); Em C, rins de animais tratados com Éster Butílico, onde observa-se a diminuição do espaço da capsula de Bowman (DECB), dilatação dos capilares do glomérulo (DCG), aumento do lúmen tubular (ALT); Em D, rins de animais tratado com a dose de 10 mg/kg de Ibuprofeno, onde observa-se a hipertrofia das células tubulares (HtCT); Em E, rins de animais tratados com a dose de 0,5 mg/kg de Dexametasona, onde observa-se o aumento do lúmen tubular (ALT); Em F, rins de animais tratados com a dose de 5 mg/kg de NPe, onde observa-se a hipertrofia das células tubulares (HtCT) e aumento do lúmen tubular (ALT); Em G, rins de animais tratados com a dose de 10 mg/kg de NPe, onde observa-se hipertrofia das células tubulares (HtCT) e aumento do lúmen tubular (ALT); Em H, rins de animal tratado com a dose de 15 mg/kg de NPe, onde observa-se a hipertrofia das células tubulares (HtCT) e a degeneração hialina tubular leve (DHTL). (40X, H&E). Fonte: Autor, 2024.

As alterações mais frequentes em todos os grupos, foram observadas nos glomérulos e túbulos renais. Os rins do zebrafish ao excretar substâncias tóxicas desencadeiam disfunções metabólicas que indiretamente podem causar alterações tubulares (Carvalho et al. 2017). O aumento do lúmen tubular, é uma alteração estrutural observada neste estudo, que segundo Carvalho et al. (2017) pode estar relacionada à hiper Cromasia, eosinofilia e apoptose celular. Estas condições levam à proliferação desordenada das células tubulares, que ocorre quando em contato com substâncias tóxicas, como mecanismo compensatório. Assim, a degeneração hialina tubular leve e severa, caracterizada pelo aumento da quantidade de grânulos eosinofílicos no citoplasma das células tubulares, pode estar relacionada à reabsorção do excesso de proteínas sintetizadas pelos glomérulos (Carvalho et al. 2017).

5.3 Docking molecular

5.3.1 Análise farmacocinética e toxicológica

A farmacocinética compreende as etapas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de uma substância. Para tanto, alguns estudos computacionais permitem a predição, a partir da estrutura molecular, de como ocorrerá essas etapas no organismo. Nesse sentido, utilizou-se o servidor online SwissADME para avaliação dos descritores: absorção do trato gastrointestinal, substrato da P-gp, e inibidor de algumas enzimas participantes da família do citocromo P450 (Quadro 5).

Quadro 5 - Predição farmacocinética do NPE e NPe pelo programa SwissADME

DESCRIÇÃO	1-Nitro-2-Feniletano	1-Nitro-2-Feniletileno
Absorção trato gastrointestinal	Alta	Alta

Substrato P-gp	Negativo	Negativo
Inibidor CYP1A2	Positivo	Positivo
Inibidor CYP2C19	Negativo	Negativo
Inibidor CYP2C9	Negativo	Negativo
Inibidor CYP2D6	Negativo	Negativo
Inibidor CYP3A4	Negativo	Negativo

Fonte: Autor, 2024

De acordo com o modelo BOILED-Egg (*Brain Or Intestinal Estimated permeation*), que correlaciona dados o WlogP e TPSA (Área da Superfície Polar Topológica) da estrutura, ou seja, correlaciona a lipofilicidade e polaridade (DAINA; ZOETE, 2016), a predição para as duas substâncias foram dadas como alta, ou seja, alta probabilidade de serem bem absorvidas, se utilizadas via administração oral.

Outro descritor bastante importante é quanto à capacidade de uma substância ser substrato da proteína P-gp. Esta proteína, também conhecida por proteína 1 de resistência a múltiplas drogas (MDR1), é um transportador de efluxo de alta distribuição tecidual capaz de reconhecer vários xenobióticos, servindo como uma barreira fisiológica, interferindo com isso, na biodisponibilidade de diferentes substâncias, podendo até mesmo diminuir a eficácia terapêutica de diferentes drogas (ELMELIEGY et al., 2020; LAKSHMI; MOHANA; SRIVALLI, 2012). No resultado fornecido pelo servidor swissADME, ambas as moléculas testes deram negativo para serem substratos da P-gp.

Outro fator importante a ser avaliado no que diz respeito à farmacocinética, refere-se à capacidade de inibição de algumas enzimas, mais precisamente de enzimas pertencentes à família do citocromo P450, das quais algumas possuem maior participação nos processos de metabolização, sendo que são importantes 1A2, 3A4, 2C9, 2C19 e 2D6. Em relação aos resultados, pode-se perceber que apenas para a CYP1A2 que deu a probabilidade de as substâncias inibirem, e com isso terem maior disponibilidade, se considerando essa via metabólica enzimática.

Para a avaliação toxicológica, é muito importante prever possível toxicidade das substâncias. Para isso, foi realizada em dois órgãos alvos, fígados e rins, com o emprego do servidor online admetSAR 2.0, que integra mais de 40 modelos preditivos e diversas informações integradas (YANG et al., 2019). Os resultados podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 - Predição toxicológica do NPE e NPe pelo programa AdmetSAR

DESCRIÇÃO	NPE	NPe
Hepatotoxicidade	Positivo (81,25%)	Positivo (66,77%)
Nefrotoxicidade	Positivo (51,14%)	Positivo (51,03%)

Fonte: Autor, 2024

Os resultados estão expressos em positivo ou negativo, seguida da probabilidade. Conforme observado na tabela 5, para todos os descritores e, também, para ambas as moléculas testes, indicam probabilidade de as substâncias serem hepatotóxicas e nefrotóxicas. Porém, é importante ressaltar que são cálculos preditivos, a partir da estrutura molecular, do possível efeito causado por substâncias exógenas havendo a necessidade de confirmação experimental.

5.3.2 Docking molecular: COX-1 E COX-2

Na etapa de validação do alvo COX-1, o valor de RMSD obtido foi de 0,87 Å. Este valor permite identificar e explorar o espaço conformacional de um alvo e de como o ligante se comporta nessa região, ao ser comparado com o dado teórico, no qual quanto menor, maior o indicativo de compatibilidade. As coordenadas de origem obtidas para esse alvo foram: x = -21,43; y = -50,79; z = 1,42, em um raio de validação de 10 Å (BORGES et al., 2018).

No *docking* molecular das substâncias testes NPE e NPe, foi possível observar resultados muito semelhantes, no qual a maior diferença foi quanto a interação do NPE com o aminoácido Phe518 (interação π - π Stacked), com distância de 5,23 Å enquanto que o NPe interagiu com o resíduo Met522, por meio de uma interação π -sulfur, com distância de 5,94 Å (Tabela 6). Além dessas interações, foram presentes ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, sendo esta última em decorrência da presença do anel aromático, em ambas a moléculas testes.

Tabela 6 - Interações e os tipos de interações realizadas entre os ligantes Ibuprofeno, NPE e NPe, com o alvo COX-1.

Ligante	Aminoácido	Átomo do ligante	Interação	Tipo	Distância (Å)	Score
Ibuprofeno	ARG120	O2	Ligação de Hidrogênio	Convencional	1,82	63,07

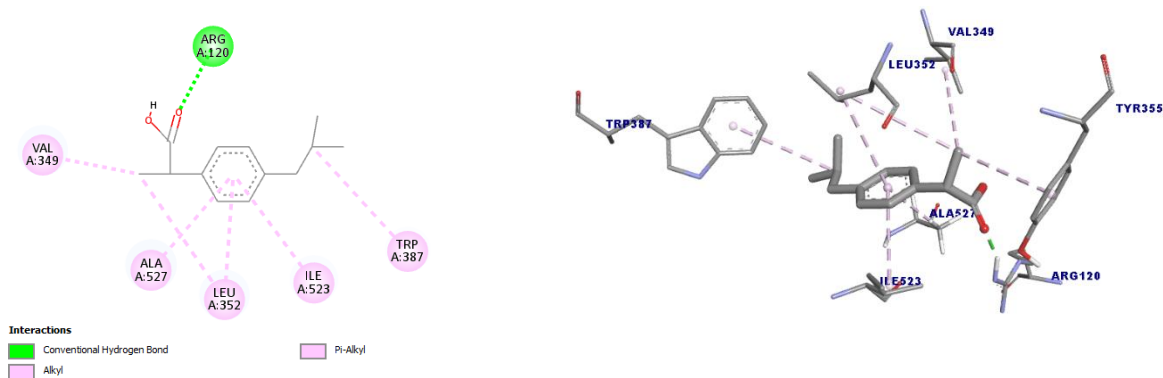
	VAL349	C14	Hidrofóbica	Alquil	4,81	
	LEU352	C14	Hidrofóbica	Alquil	5,40	
	TYR355	C14	Hidrofóbica	π -alquil	4,70	
	TRP387	C3	Hidrofóbica	π -alquil	5,31	
	LEU352	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,85	
	ILE523	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,91	
	ALA527	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,02	
	ARG120	O1	Ligação de Hidrogênio	Convencional	2,09	
	TYR355	O1	Ligação de Hidrogênio	Convencional	2,94	
NPE	SER353	O2	Ligação de Hidrogênio	Carbono-Hidrogênio	2,68	50,95
	PHE518	Ligante	Hidrofóbica	π - π Stacked	5,23	
	LEU352	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,79	
	ALA527	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,73	
	ARG120	O1	Ligação de Hidrogênio	Convencional	2,99	
	TYR355	O1	Ligação de Hidrogênio	Convencional	2,99	
NPe	SER353	O2	Ligação de Hidrogênio	Carbono-Hidrogênio	2,69	52,24
	MET522	Ligante	Outro	π -sulfur	5,94	
	LEU352	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,83	
	ALA527	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,76	

Fonte: Autor, 2024

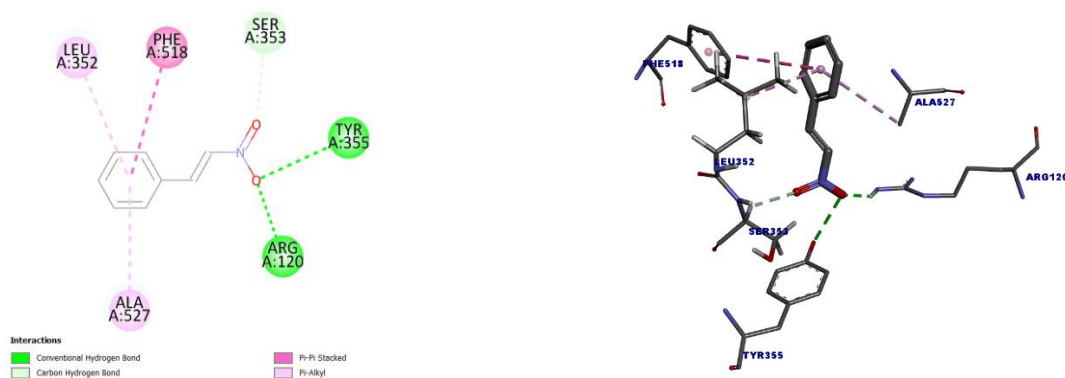
No entanto, ao avaliar os resultados da molécula de referência (ibuprofeno), pode-se estabelecer que a afinidade apresentada pelo alvo foi mais elevada (Score: 63,07), além de apresentar maior número de interações, sendo no total de oito, das quais apenas uma é uma ligação de hidrogênio (tipo convencional), envolvendo o resíduo Arg120, e o restante todas hidrofóbicas, das quais duas do tipo alquil e seis do tipo π -alquil (Fig. 21).

Figura 21 - Representação em 2D e 3D da simulação de *docking* molecular do NPE, NPe e Ibuprofeno, no alvo COX-1

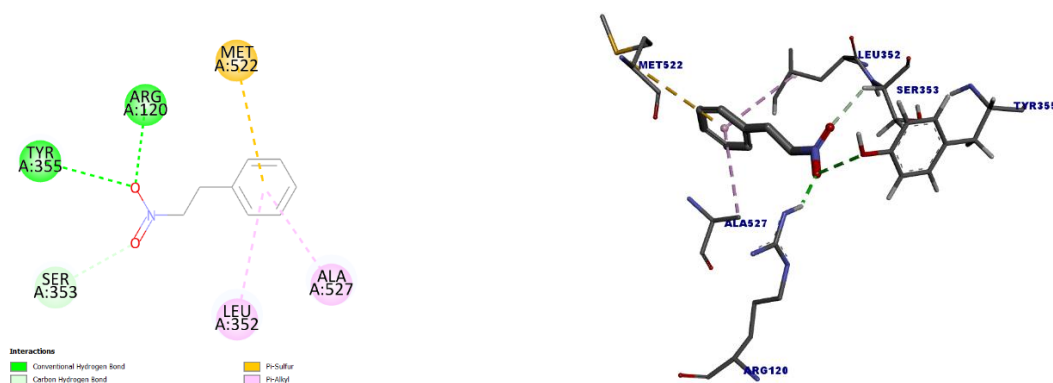
Ibuprofeno



NPE



NPe



Fonte: Autor, 2024

Quanto ao *docking* da COX-2, o valor de RMSD na etapa de validação da foi de 0,99 Å. Em relação às coordenadas de origem para esse alvo, foram definidas como: x = 22,83; y = 51,56; z = 17,81 e um raio de validação de 10 Å (BORGES et al., 2018).

Conforme observado na tabela 7, pode-se depreender que o primeiro composto teste (NPE), apresentou maior número de interações quando comparado ao NPe,

tendo um total de sete interações, sendo destas, quatro do tipo de ligações de hidrogênio, das quais três envolvem o aminoácido Ser535 e uma com a Leu352. Assim como também no *docking* com a COX-1, a molécula padrão (ibuprofeno), apresentou maior afinidade pelo alvo terapêutico (Tabela 7 / Fig. 22).

Tabela 7 - Interações e os tipos de interações realizadas entre os ligantes Ibuprofeno, NPE e NPe, com o alvo COX-2.

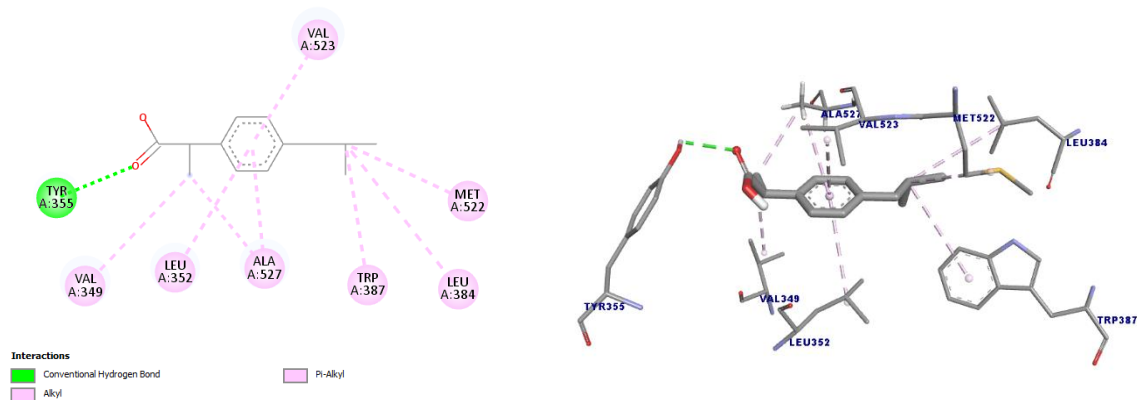
Ligante	Aminoácido	Átomo do ligante	Interação	Tipo	Distância	Score
Ibuprofeno	TYR355	O2	Ligação de Hidrogênio	Convencional	2,51	58,05
	ALA527	C14	Hidrofóbica	Alquil	3,90	
	LEU384	C3	Hidrofóbica	Alquil	5,25	
	MET522	C3	Hidrofóbica	Alquil	4,9	
	VAL349	C14	Hidrofóbica	Alquil	4,53	
	TRP387	C3	Hidrofóbica	π -alquil	5,14	
	LEU352	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,74	
	VAL523	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,10	
	ALA527	Ligante	Hidrofóbica	π -alquil	4,69	
NPE	LEU352	O1	Ligação de Hidrogênio	Convencional	3,21	46,40
	SER353	O1	Ligação de Hidrogênio	Carbono-hidrogênio	2,69	
	SER353	O2	Ligação de Hidrogênio	Carbono-hidrogênio	2,78	
	SER353	O2	Ligação de Hidrogênio	Carbono-hidrogênio	3,08	
	MET522	Ligante	Outro	π -Sulfur	5,12	
	TRP387	Ligante	Hidrofóbica	π - π T-shaped	4,94	
	GLY526	Ligante	Hidrofóbica	Amida- π Stacked	4,51	
NPe	SER353	H21	Ligação de Hidrogênio	Carbono-hidrogênio	2,35	45,80

SER353	O10	Ligação de Hidrogênio	Carbonyl-hidrogênio	2,99
MET522	Ligante	Outro	π -Sulfur	5,25
GLY526	Ligante	Hidrofóbica	Amida- π Stacked	4,28
ALA527	Ligante	Hidrofóbica	Amida- π Stacked	4,28

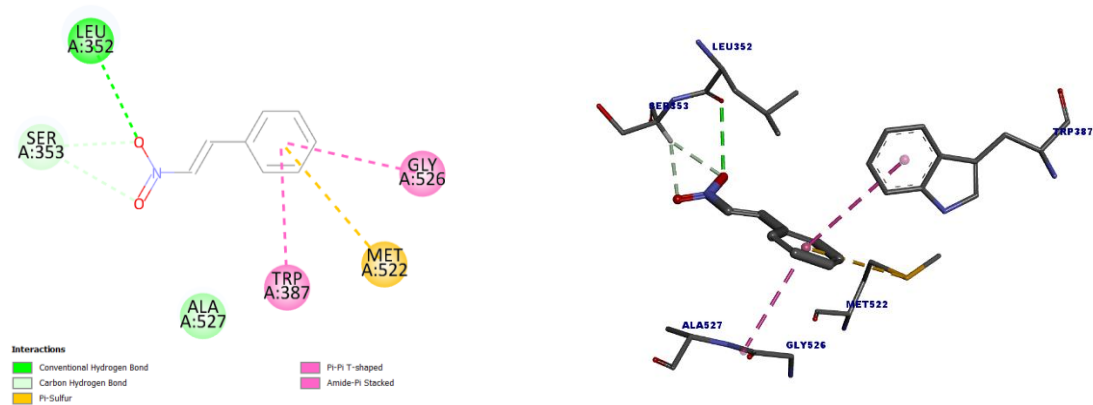
Fonte: Autor, 2024

Figura 22 - Representação em 2D e 3D da simulação de *docking* molecular do Ibuprofeno, NPE e NPe, no alvo COX-2.

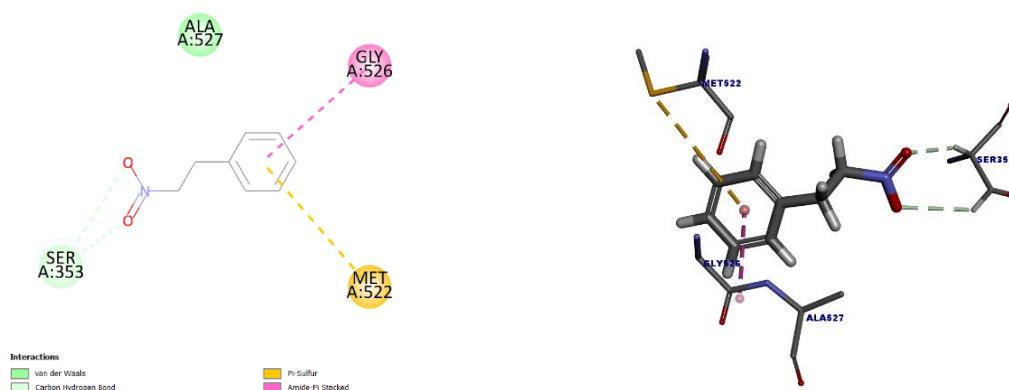
Ibuprofeno



NPE



NPe



Fonte: Autor, 2024

É presente na entrada do canal do sítio ativo de ambas as proteínas alvos (COX-1 e COX-2) os resíduos Arg120, Glu524, Tyr355 e His/Arg513, que geralmente permitem as ligações de hidrogênio com o ligante (PRICE; JORGENSEN, 2000). Nesse sentido, alguns aminoácidos possuem importância para definição da atividade dos ligantes sobre as enzimas COX-1 e COX-2. O primeiro a ser abordado é o resíduo Ser530, que interage, por exemplo com a aspirina, nas duas isoformas da COX. Outro aminoácido bastante associado de importância para ativação é a Tyr385, visto participação na retirada do 13-pro-S-hidrogênio do ácido araquidônico (GAUTAM et al., 2011).

Para a COX-1, além desses resíduos, são consideradas interações importantes as que acontecem com os aminoácidos Arg120, Tyr355 e Ile523 (BORGES et al., 2018). Em relação à Arg120, de acordo com Price e Jorgensen (2000), ao avaliar a interação de alguns AINES com as isoenzimas, constatou que a maioria das substâncias pertencentes a este grupo possuem um grupo carboxilato, que permitem a interação com alguns resíduos, incluindo a Arg120. Quando não possuem esse grupamento, como por exemplo, o celecoxibe, que possui um grupo trifluorometil, acaba não interagindo com esse aminoácido em específico e por isso, possui maior seletividade com a COX-2. Nesse sentido, pode-se depreender que possivelmente a interação entre Arg120, para a COX-1, é mais importante. No caso do *docking* molecular com a COX-1 deste estudo, todas as substâncias interagiram com a Arg120, constatando que possivelmente realizaram outra interação de importância, relacionado à COX-1.

5.4 Discussão

A resposta inflamatória inicia-se a partir de estímulos provocados por agentes infecciosos, dano ou lesão tecidual, onde estes por sua vez são reconhecidos pelo sistema imune através dos macrófagos, que iniciam uma série de respostas imunológicas. Neste momento acontece incidentes característicos como o aumento da permeabilidade vascular, aumento no número de leucócitos e a liberação de mediadores pró-inflamatórios na tentativa de conter o dano ocasionado (Gallo et al. 2017). A partir do reconhecimento de agentes infecciosos, como LPS de bactérias Gram-negativas através do reconhecimento de PAMP's por receptores toll-like, ou através do reconhecimento de DAMP's após a lesão celular, inicia-se a produção dos mediadores pró inflamatórios, como as citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ e ICAM-1 (Sugimoto et al. 2017). Apesar da resposta inflamatória ser uma resposta fisiológica e ser de fundamental importância no processo de recuperação pós lesão a sua resposta, quando desregulada, pode se tornar um problema, levando ao surgimento de processos inflamatórios crônicos e doenças autoimunes (Lopez-Castejon, Gabriel V.; Perrett 2017), estas ações desreguladas ocorrem a partir da produção exacerbada de citocinas. Devido a isto, um grande mecanismo de inibição da inflamação aguda através de fármacos seria a inibição da produção destas citocinas. É relatado na literatura que o NPe em estudo *in vitro* foi capaz de evitar a ativação de macrófagos e a ativação das vias NF- κ B e ERK através da inibição da produção destas citocinas (Sugimoto et al. 2017; Gallo et al. 2017).

Dando seguimento a esta linha, neste estudo foi explorado o potencial toxicológico e antiinflamatório do NPe *in vivo* e *in silico*. Assim, este foi testado em modelo zebrafish para avaliar a sua capacidade em induzir a toxicidade e alterações histopatológicas e em inibir a formação de edema induzido por carragenina. Os modelos de ensaios de toxicidade e de inflamação em Zebrafish propostos neste estudo já foram abordados anteriormente, onde a autora avaliou a toxicidade e potencial anti-inflamatório de nanoemulsão contendo o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., tendo sido estas metodologias consideradas confiáveis e seguras (Borges et al. 2018).

No ensaio de toxicidade aguda o NPe se mostrou seguro nas doses testadas de 5, 8, 10, 12 e 15 mg/kg por via oral em Zebrafish. Nenhum animal foi à óbito após o tratamento e no estudo histopatológico, observou-se que o NPe não desencadeou

alterações histopatológicas significantes nos principais órgãos de metabolização dos animais, intestino, fígado e rins.

No intestino todas as alterações registradas foram de nível I, entre elas a infiltração leucocitária, dilatação dos vasos presente nas vilosidades, hipertrofia das células epiteliais e o desprendimento do revestimento no ápice das vilosidades. De acordo com Borges et. al (2019), essas alterações são típicas do mecanismo de defesa celular. No qual, para evitar lesões causadas pela infiltração leucocitária nas vilosidades, ocorre a separação da lâmina própria, que reduz o contato entre as células inflamatórias e os enterócitos. Logo, estas alterações ocorrem para proteger a célula de possíveis danos e não prejudicam o funcionamento do órgão.

De acordo com a predileção do estudo *in silico* realizado (Quadro1), o NPe possui uma alta absorção no trato intestinal, fato que auxilia no processo de metabolização e acelera sua biodisponibilidade. No entanto, a ausência de alterações ou danos a nível tecidual relevantes no intestino dos animais utilizados neste estudo, demonstra que o NPe apresentou uma baixa toxicidade neste órgão, sendo considerada mínima quando comparada com os grupos padrões.

Além disto, o NPe se mostrou não ser um substrato P-gp, o que lhe confere uma menor probabilidade em desencadear uma resistência medicamentosa quando comparados com outros medicamentos que são substratos, como o diclofenaco e a indometacina. Outro ponto positivo encontrado neste estudo é o fato do NPe também demonstrar predileção negativa a inibir as enzimas CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4, pertencentes a família do citocromo P450. Isto significa que o NPe possui um baixo potencial em provocar interação com outros medicamentos que sejam metabolizados por estas enzimas quando consumidos simultaneamente, tais como sertralina (metabolizada pela CYP2C19), Losartana (metabolizada pela CYP2C9), Tramadol (metabolizado pela CYP2D6) e Alprazolam (metabolizado pela CYP3A4). No entanto, neste estudo, o NPe mostrou ser inibidor da enzima CYP1A2, assim como diclofenaco e indometacina. Esta inibição ocasiona uma perda na metabolização de outros medicamentos que sejam metabolizados por esta enzima, como a Clozapina e a Codeína, fazendo com que estes medicamentos necessitem de uma dose maior para manter sua efetividade quando ingeridos em conjunto com o NPe.

Toda essa predileção farmacocinética foi realizada em comparação entre o NPE e o NPe, onde foi obtido um resultado homólogo, demonstrando que o perfil toxicológico de ambas as substâncias, para as descrições levantadas, é o mesmo.

Quanto aos demais órgãos envolvidos no processo de metabolização, estes sejam fígado e rim, quando comparado com o NPe, o NPe (Tabela 5) demonstrou exercer uma hepatotoxicidade (Positivo/66,77%) e nefrotoxicidade (Positivo/ 51,03%) inferior. Apesar do estudo *in silico* demonstrar predileção pela toxicidade hepática e renal no estudo *in vivo* em modelo zebrafish o resultado demonstrou-se divergente. No estudo histopatológico do fígado e do rim as únicas alterações teciduais graves ocorreram no grupo tratado com o solvente DMSO, que tem sua alta ação tóxica já conhecida, enquanto os demais grupos tratados com o NPe e os demais fármacos padrões apresentaram baixas alterações no IAH, com alterações leves que não alteraram o funcionamento dos órgãos. De acordo com Borges et. al (2019), o aumento da frequência dos vasos sanguíneos e a hiperemia são mecanismos acionados para aumentar o fluxo sanguíneo para o fígado, consequentemente aumentando o suprimento de oxigênio e nutrientes na área afetada, o que protege o tecido de danos graves, como a hipóxia. Em seu estudo Silva (2016) avaliou a toxicidade do NPe em modelo zebrafish, no entanto somente na dose de 10 mg/kg, que foi considerada tóxica.

As divergências observadas entre os resultados do estudo *in vivo* e as predileções do estudo *in silico* ocorre devido ao fato de o estudo *in silico* basear-se em modelos preditivos que tentam prever como um medicamento se comportará com base em dados históricos e propriedades conhecidas. Esses modelos podem não representar todas as complexas variáveis fisiológicas encontradas no modelo *in vivo*. Logo, o estudo *in silico* pode sugerir um comportamento esperado do fármaco, porém sem a garantia de que o fármaco se comportará exatamente como previsto quando estiver administrado em um ambiente biológico real (Daniel 2024).

Na avaliação da atividade anti-inflamatória do NPe *in vivo*, por meio do ensaio de edema abdominal em zebrafish, foi possível comparar seu potencial em inibir a formação de edema induzido por carragenina. Entre as três doses testadas a dose de 15 mg/kg foi a que demonstrou o maior potencial anti-inflamatório, quando comparada com as demais doses e com os grupos padrão. Divergindo do estudo *in silico*, que demonstrou que o NPe possui menor número de possíveis interações (6 interações com o alvo COX-1/score 52,24 e 4 interações com o alvo COX-2/score 45,8) quando comparado com o padrão ibuprofeno (8 interações com alvo COX-1/score 63,07 e 9 interações com o alvo COX-2/score 58,05), no ensaio *in vivo* o NPe demonstrou elevando potencial em inibir edema e sua ação foi superior à do ibuprofeno na dose

testada. Novamente, isso se justifica pelo fato de estudos *in silico* serem capazes de fazer uma predileção da ação de um fármaco, no entanto, quando exposto à complexidade bioquímica do modelo *in vivo*, esse perfil pode se manifestar de forma totalmente inesperada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como objetivo obter uma solução do NPe estável para uso em modelo animal, além de avaliar sua atividade toxicológica e sua atividade anti-inflamatória, através de ensaios *in vivo* com Zebrafish; e determinar suas possíveis interações farmacocinéticas por meio de ensaio *in silico* através de docking molecular. Entre os resultados, destaca-se a obtenção de *in vivo* uma solução estável para uso do NPe nas doses de 5, 10 e 15 mg/kg em ensaio. Esse resultado é de grande relevância, uma vez que até o presente momento só encontrava-se disponível na literatura estudos com ensaios *in vitro* de avaliação da viabilidade celular, e um único estudo com ensaio *in vivo* em modelo zebrafish para avaliação do potencial anti-inflamatório, cuja dose testada fora 10 mg/kg. No entanto, este estudo não abordou a histopatologia do efeito toxicológico do fármaco para esta dosagem, apenas relatou a presença de degeneração glomerular no tecido.

No ensaio de toxicidade aguda realizado no presente estudo, nenhuma dose do NPe foi considerada tóxica, já que nenhum animal morreu durante o experimento. E, no estudo histopatológico, não houve nenhuma alteração tecidual grave que prejudicasse o funcionamento de intestino, fígado e rins dos animais.

Na avaliação da atividade anti-inflamatória através da inibição de edema abdominal em modelo Zebrafish, o NPe demonstrou eficácia na inibição de edema inflamatório na dose de 15 mg/kg, obtendo um desempenho de inibição superior aos dos fármacos comerciais Ibuprofeno e Dexametasona.

Os resultados deste estudo são considerados significantivos e inovadores, pois apresentam uma solução estável e de segurança toxicológica para a utilização do NPe, o que elucidou o uso de doses seguras para futuros experimentos *in vivo*. Bem como, possibilitará novos estudos a partir da solução obtida com o NPe.

Por fim, este é o primeiro estudo a propor uma solução segura para o NPe, avaliando sua toxicidade e potencial anti-inflamatório em estudos *in vivo* e *in silico*, entretanto, embora os resultados sejam promissores, é importante reconhecer que se fazem necessários estudos complementares relacionados à atividade anti-inflamatória, afim de elucidar os possíveis mecanismos de ação da solução obtida com o NPe em diferentes modelos animais.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul. **Imunologia celular e molecular 7a edição**. Elsevier Brasil, 2012.

AHMED, Syed Minhaj Uddin et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 585-597, 2017.

ALMEIDA, Leonardo Viana de. **Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2, 3-diidro-1, 3, 4-oxadiazol frente à cepa ATCC 25923 de Staphylococcus aureus**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ATTIQ, A., et al.. **The triumvirate of NF- κ B, inflammation and cytokine storm in COVID-19**. Rev. *International Immunopharmacology*, v. 101. Jenjarom, 2021.

BAKER, R. G., HAYDEN, M. S., e GHOSH, S. **NF- κ B, inflammation, and metabolic disease**. Rev. *Cell Metabolism*, v. 13, p. 11–22. New York, 2011.

BARNES, Emma C.; KUMAR, Rohitesh; DAVIS, Rohan A. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. **Natural product reports**, v. 33, n. 3, p. 372-381, 2016.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. **Química Medicinal:- As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2014.

BECKMAN, Joseph S.; KOPPENOL, Willem H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology-cell physiology**, v. 271, n. 5, p. C1424-C1437, 1996.

BEGUM, Asia et al. An in-depth review on the medicinal flora Rosmarinus officinalis (Lamiaceae). **Acta scientiarum polonorum Technologia alimentaria**, v. 12, n. 1, p. 61-74, 2013.

BHAT, Khurshid A. et al. Semi-synthetic analogs of pinitol as potential inhibitors of TNF- α cytokine expression in human neutrophils. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 7, p. 1939-1943, 2009.

BILBERG, Katrine et al. *In vivo* toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (Danio rerio). **Journal of toxicology**, v. 2012, 2012.

BITTENCOURT, T. Q. M., et al.. **Toxic effects of vanadium compounds on biological parameters of embryos and adults of zebrafish (Danio rerio)**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.70, n.6, p.1877-1886. Recife, 2018.

BOGLIOLO, L., BRASILEITO FILHO, G. **Bogliolo Patologia: [40 anos]**. 8. nd. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2011.

- BORGES, R. S., *et al.*. **Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved**. *Rev. Journal of Ethnopharmacology*, v. 229, p. 29–45. Macapá, 2018.
- BRAGA, M. M., *et al.*. **Evaluation of spontaneous recovery of behavioral and brain injury profiles in zebrafish after hypoxia**. *Behavioural Brain Research*, v. 253, p. 145–151. Porto Alegre, 2013.
- Borges, Raphaele Sousa, *et al.* (2019). **Histopathology of Zebrafish (Danio rerio) in Nonclinical Toxicological Studies of New Drugs**. Em: *Zebrafish in Biomedical Research*
- BRUGMAN, Sylvia. The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 64, p. 82-92, 2016.
- BRUNTON, Laurence L.; LAZO, John S.; PARKER, Keith L. **Las bases farmacológicas de la terapéutica**. Mc Graw Hill Interamericana, 2007.
- BUSCONI, L. & Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1993. 268(12): 8410-3.
- CALDER, Philip C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2015.
- CALHEIROS, R. *et al.* β -Nitrostyrene derivatives—a conformational study by combined Raman spectroscopy and ab initio MO calculations. **Journal of molecular structure**, v. 692, n. 1-3, p. 91-106, 2004.
- CALHEIROS, R.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUEZA, M. P. M. B-Contassot E, Beer H. D.; French L. E. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly.* 2012. 142:w13590
- CARVALHO, J. C. T. *et al.*, **Effects of Bothrops alternatus venom in zebrafish: a histopathological study**. *Inflammopharmacology*. Macapá, 2017.
- CARVALHO, José Carlos Tavares. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**, 2da edição. São Paulo, Pharmabooks, 2017, 463 p.
- CHEN, Jinyuan *et al.* Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 3-4, p. 493-499, 2011.
- CHITSAZ, R., *et al.* **Rubiadin exerts an acute and chronic anti-inflammatory effect in rodents**. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83. Tehran, 2021.
- CHOI, Ji Eun *et al.* Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 151-159, 2010.
- CLEMENTE, Z. *et al.* Exposição de embriões de *Danio rerio* a nano-tio₂ sob diferentes condições de iluminação. In: **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. 2013. p. 537-538.

COLLYMORE, Chereen; RASMUSSEN, Skye; TOLWANI, Ravi J. Gavaging adult zebrafish. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 78, p. e50691, 2013.

CORDERO-MALDONADO, María Lorena et al. Optimization and pharmacological validation of a leukocyte migration assay in zebrafish larvae for the rapid *in vivo* bioactivity analysis of anti-inflammatory secondary metabolites. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75404, 2013..

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, p. 1117–1121, 2016.

DAMMSKI, A. P., et al. **Zebrafish: Manual de Criação em Biotério**. 1º Edição. Curitiba, 2011. 107p.

DODD, Matthew Charles et al. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 11-18, 1944.

DOOLEY, Kimberly; ZON, Leonard I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 3, p. 252-256, 2000.

DOS SANTOS, Igor Victor Ferreira et al. Histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) to evaluate the toxicity of medicine: An anti-inflammatory phytomedicine with Janaguba milk (*Himatanthus drasticus* Plumel). **Histopathol. Update**, p. 39-64, 2018.

ĐURAČKOVÁ, Zdeňka. Some current insights into oxidative stress. **Physiological research**, v. 59, n. 4, 2010.

EKAMBARAM, SP, PERUMAL SS, PAVADAI S (2017) **Anti-inflammatory effect of Naravelia zeylanica DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model**.

Inflammopharmacology, 25(1), 147–158. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0303-2>

ELMELIEGY, M. et al. **Effect of P-glycoprotein (P-gp) Inducers on Exposure of P-gp Substrates: Review of Clinical Drug–Drug Interaction Studies**. **Clinical Pharmacokinetics** Adis, , 1 jun. 2020.

FENT, Karl et al. Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **Aquatic toxicology**, v. 100, n. 2, p. 218-228, 2010.

FERREIRA, DQ, Ferraz TO, Araújo RS, Cruz RAS, Fernandes CP, Souza GC, Ortiz BLS, Sarquis RSFR, Miranda JCMM, Garrett R, Carvalho JCT, Oliveira AEM de FM (2019) Libidibia ferrea (Jucá), a traditional anti-inflammatory: A study of acute toxicity in adult and embryos zebrafish (*danio rerio*). **Pharmaceuticals**, 12(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ph12040175>

GAUTAM, R. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of stellatin derivatives as cyclooxygenase (COX-1, COX-2) inhibitors and anti-inflammatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 6, GERONIKAKI, Athina A.; GAVALAS, Antonios M. Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 9, n. 6, p. 425-442, 2006.

GONÇALVES, R. M., *et al.* **COX-2 promotes mammary adipose tissue inflammation, local estrogen biosynthesis, and carcinogenesis in high-sugar/fat diet treated mice.** Rev. Cancer Letters, v. 502, p. 44–57. Florianópolis, 2021.

GOODMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** Ed 11, McGraw-Hill, 2000.

GRIFFITT, R. J., FESWICK, A., WEIL, R., HYNDMAN, K., CARPINONE, P., POWERS, K., DENSLOW, N. D., BARBER, D. S. Investigation of Acute Nanoparticulate Aluminum Toxicity in Zebrafish. **Environmental Toxicology** 2010.

GRIFFITT, R. J., HYNDMAN, K., DENSLOW, N. D., BARBER, D. S. Comparação das alterações moleculares e histológicas no peixe-zebra Gills Expostos ao Metallic Nanopartículas. 2008.

GUTOWSKA, I.; MACHOY, Z.; MACHALIŃSKI, B. The role of bivalent metals in hydroxyapatite structures as revealed by molecular modeling with the HyperChem software. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 75, n. 4, p. 788–793, 2005.

HALL, John E. **Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica.** Elsevier Health Sciences, 2011.

HAMID, Qutayba *et al.* Induction of nitric oxide synthase in asthma. **The Lancet**, v. 342, n. 8886-8887, p. 1510-1513, 1993.

HERAS, B. DE *et al.* Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 8, n. 1, p. 28-39, 2009.

HEVENER, K. E. *et al.* Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **J Chem Inf Model**, v. 49, n. 2, p. 444–460, 2009.

HOESEL, B. e SCHMID, J. A.. **The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer.** Rev. Molecular Cancer, v. 12, ed. 1. Viena, 2013.

HOESEL, Bastian; SCHMID, Johannes A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. **Molecular cancer**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2013.

HOLDEN, J.A.; LAYFIELD, L.L.; MATTHEWS, J.L. **The Zebrafish: Atlas of Macroscopic and Microscopic Anatomy;** Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2012; pp. 58–100.

HOP, Huynh T. *et al.* Activation of NF-κB-mediated TNF-induced antimicrobial immunity is required for the efficient *Brucella abortus* clearance in RAW 264.7 cells. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 437, 2017.

HOWE, Kerstin *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

HSU, Sheng-Da et al. miRNAMap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. **Nucleic acids research**, v. 36, n. suppl_1, p. D165-D169, 2007.

HUANG, S. Y. *et al.* **A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema.** PLOS ONE, v. 9. Taiwan, 2014.

HYACIENTH, B.M.S.; PICANÇO, K.R.T.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B.L.; SILVA, L.B.; PEREIRA, A.S.M.; GÓES, L.D.M.; BORGES, R.S.; ATAÍDE, R.C.; SANTOS, C.B.R.; CARVALHO, H.O.; ET AL. **Hydroethanolic extract from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas and its marker bergenin: Toxicological and pharmacokinetic studies *in silico* and *in vivo* on zebrafish.** Toxicol. Rep. 2020, 7, 217–232.

ISPAS, C., ANDREESCU, D., PATEL, A., GOIA, D. V., ANDREESCU, S., WALLACE, K. N. Toxicidade e Desenvolvimento Defeitos de diferentes tamanhos e forma Nickel Nanopartículas no peixe-zebra. **Environmental Science & Technology** p.6349-6356, 2009.

JUNIOR, F. J. C. S. *et al.* **Aniba canelilla (Kunth) Mez (Lauraceae): A Review of Ethnobotany, Phytochemical, Antioxidant, Anti-Inflammatory, Cardiovascular, and Neurological Properties.** Rev. Frontiers in Pharmacology, v. 11. Belém, 2020.

KAIN, Vasundhara; PRABHU, Sumanth D.; HALADE, Ganesh V. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. **Basic research in cardiology**, v. 109, p. 1-17, 2014.

KAO, Tseng-Ting et al. Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by interfering with dihydrofolate reductase activity and folate-mediated one-carbon metabolism. **International journal of food microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 17-27, 2010.

KATZUNG, Bertram G.; VANDERAH, Todd W. **Farmacologia básica e clínica.** Artmed Editora, 2022.

KUBITZKI, K e RENNER, S. **Lauraceae I (Aniba and Aiouea).** Projeto Flora Neotropica New York Botanical Garden, v. 31. New York, 1982.

KUMAR, Vivek et al. 1, 8-Naphthyridine-3-carboxamide derivatives with anticancer and anti-inflammatory activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 8, p. 3356-3362, 2009.

LAKSHMI, P. K.; MOHANA, K.; SRIVALLI, R. **Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook**Article **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** [s.l: s.n.].

LEE, K. Y., *et al.* **Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: Promoting preclinical applications.** Bioscience Reports, v. 37. Seoul. 2017.

LEY, Klaus et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LIBBY, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. **Nutrition Reviews**, v.65, n.3, 2007.

LIMA, A. B. **Avaliação toxicológica, antinociceptiva e antiinflamatória do 1-nitro-2-feniletano, principal constituinte do óleo essencial de *Aniba canelilla*.**

Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Para, Belém. 2008.

LIMA, M., *et al.* **Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil.** Rev. Acta Amazônia, v. 34, p. 329-330. Manaus, 2004.

LIMA, R. F. *et al.* **Inflammation in neurodegenerative disease.** Rev. Paraense de Medicina, V. 21, ed. 2, p. 24-29. Belém, 2007.

LIN, Edward; CALVANO, Steve E.; LOWRY, Stephen F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

LUO, J., *et al.* **Extracts with anti-inflammatory activities from *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. by inhibiting LPS-induced expression of iNOS and COX-2.** Rev. Food Sci. Technol. Campinas, 2021.

MANNICK, Elizabeth E. *et al.* Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. **Cancer research**, v. 56, n. 14, p. 3238-3243, 1996.

MARLETTA, Michael A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. 1994.

MAYA, Juan Diego *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MONCADA, S. R. M. J.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, EA_. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORENO, S. N. The reductive metabolism of nifurtimox and benznidazole in *Crithidia fasciculata* is similar to that in *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 321-325, 1988.

NAVA, Eduardo; LÜSCHER, Thomas F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 13, n. 2, p. S39-48, 1995.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NISHIMOTO, Norihiro; KISHIMOTO, Tadamitsu; YOSHIZAKI, Kazuyuki. Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 59, n. suppl 1, p. i21-i27, 2000.

OLIVARES, M. A. S., *et al.* **Toxicity and teratogenicity in zebrafish *danio rerio* embryos exposed to chromium.** Latin American Journal of Aquatic Research, v. 49, p. 289-298. Hidalgo, 2021.

- ORTEGA-CARRASCO, E.; LLEDÓS, A.; MARÉCHAL, J. D. Assessing protein-ligand docking for the binding of organometallic compounds to proteins. **Journal of Computational Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 192–198, 2014.
- PARK, Ju-Hyung; JUN, Jong-Gab; KIM, Jin-Kyung. (E)-3-(3, 4-dihydroxy-2-methoxyphenyl)-1-(2, 4-dihydroxyphenyl) prop-2-en-1-one, a novel licochalcone B derivative compound, suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory reactions in RAW264. 7 cells and endotoxin shock in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 142-148, 2014.
- PAULAI, Fávero Reisdorfer; SERRANO, Silvia Helena Pires; TAVARES, Leoberto Costa. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, p. 1013-1020, 2009.
- PINTO, A. C.. **O Brasil dos viajantes e exploradores e a química de produtos naturais brasileira**. Rev. Química Nova, v. 18, ed. 6, p. 608-615. Rio de Janeiro, 1995.
- POECKEL, Daniel et al. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 91-97, 2008.
- POLLITT, S. *et al.* The Biology of Oxygen Radicals. **Science**, v.201, p. 875 – 880, 1978.
- POLUHA, R. L. e GROSSMANN, E. (2018). **Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions**. Rev Brazilian Journal Of Pain, v. 1, p. 60-65. São Paulo, 2018.
- POYTON, Robert O.; BALL, Kerri A.; CASTELLO, Pablo R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 7, p. 332-340, 2009.
- PRICE, M. L. P.; JORGENSEN, W. L. Analysis of binding affinities for celecoxib analogues with COX-1 and COX-2 from combined docking and Monte Carlo simulations and insight into the COX-2/COX-1 selectivity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 39, p. 9455–9466, 4 out. 2000.
- Quitian-Useche, Y.F., Sánchez-Ortiz, B.L., Borges, S.F. et al. Fatty ethanolamide of Bertholletia excelsa triglycerides (Brazil nuts): anti-inflammatory action and acute toxicity evaluation in Zebrafish (Danio rerio). *Inflammopharmacol* 29, 1519–1537 (2021).
- REUTER, Simone et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free radical biology and medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.
- RHEN, Turk; CIDLOWSKI, John A. **Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs**. New England Journal of Medicine, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.
- RIBEIRO, Layza Costa et al. Investigação do efeito icotóxico do extrato etanólico da raiz de Spilanthes acmella (jambú) em zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental. 2013.
- ROBBINS, Stanley; COTRAN, Ramzi S. Patologia bases patológicas das doenças. In: **Patologia Bases patológicas das Doenças**. 2005. p. 1592-1592.

- ROZENSKI, Jef; DE RANTER, Camiel J.; VERPLANKEN, Hilda. Quantitative Structure-Activity Relationships for Antimicrobial Nitroheterocyclic Drugs. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, v. 14, n. 2, p. 134-141, 1995
- SANTOS, C. D. **Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de derivados nitrocompostos *in vitro***. Dissertação (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, 2012.
- SCHMIDT, Rebecca; STRÄHLE, Uwe; SCHOLPP, Steffen. Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural development*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.
- SEGNER, Helmut. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 187-195, 2009.
- SHAULIAN, Eitan; KARIN, Michael. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology*, v. 4, n. 5, p. E131-E136, 2002.
- SILVA, J. K. R., SOUSA, P. J. C., ANDRADE, E. H. A., e MAIA, J. G. S. **Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9422–9426. Belém, 2007.
- SINZINGER, H. *et al.* Recent advances in Prostaglandin, Thromboxane and leukotriene research. Boston, MA, MA: **Springer US, v Steagall**, p.433, 1997.
- SIQUEIRA JUNIOR, José Freitas; DANTAS, Carlos José Saboia. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. In: **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 2000. p. 238-238.
- SIQUEIRA, R. J. B., *et al.* **1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats.** *Rev. European Journal of Pharmacology*, v. 638, p. 90–98. Fortaleza, 2010.
- SORENSEN, Adam *et al.* Expression of Interleukin-1 and temporomandibular disorder: Contemporary review of the literature. *Cranio®*, v. 36, n. 4, p. 268-272, 2018.
- SOUZA, G. C., *et al.* **Obtainment and Study of the Toxicity of Perillyl Alcohol Nanoemulsion on Zebrafish (*Danio rerio*)**. *Journal of Nanomedicine Research*, v. 4. Macapá, 2016.
- SOUZA, G.C.; PEREIRA, A.C.M.; VIANA, M.D.; FERREIRA, A.M.; SILVA, I.D.R.; OLIVEIRA, M.M.R.; BARBOSA, W.L.R.; SILVA, L.B.; FERREIRA, I.M.; SANTOS, C.B.R.; ET AL. ***Acmella oleracea* (L) R. K. Jansen Reproductive Toxicity in Zebrafish: An *in vivo* and *in silico* Assessment.** *Evid. -Based Complementary Altern. Med.* 2019, 1237301, doi:10.1155/2019/1237301.
- SOUZA, Macus Vinicius Nora de. **Estudo da síntese orgânica baseado em substâncias bioativas**. Editora Átomo. Campinas, 2010. 316p.
- SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., & SMITH, C.. **The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio***. *Biological Reviews*, v. 83, p. 13–34. Leicéster, 2008.

SPENCE, Rowena et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

STEWART, A. M., BRAUBACH, O. e SPITSBERGEN, J.,. **Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside**. Trends in Neurosciences, v. 37, p. 264–278. Seoul, 2014.

SUGIMOTO, M. A., *et al.*. **Anti-inflammatory potential of 1-nitro-2-phenylethylene**. Molecules, v. 22. Belo Horizonte, 2017.

TAKASHIMA F, HIBIYA T (1984) **An Atlas of Fish Histology-Normal and Pathological Features**. Kodansha Ltd Tóquio 69(3): 406.

TAKASHIMA F, HIBIYA T. **An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features**. In: Fischer G, editor. Tokyo, Japan: Kodanska; 1995

THOCHER, J. H.; Reductive activation of Nitroheterocyclic Compound, **General Pharmacology**; V 28,nº 04, pp 485-487, 1997.

TOMINAGA, Kazuhiro et al. IL-1 β , IL-1 receptor antagonist and soluble type II IL-1 receptor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. **Archives of oral biology**, v. 49, n. 6, p. 493-499, 2004.

VALE, J. K. L., *et al.*. **Evaluation and theoretical study on the anti-inflammatory mechanism of 1-nitro-2-phenylethane**. Planta Medica, v. 79, p. 628–633. Belém, 2013.

VIODÈ, C.; BETHACHE, N. CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R. L., CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N. P. **Journal of Biochemistry and Pharmacology**, 1998, pg: 57, 549

WANG, Dingzhi; DUBOIS, Raymond N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 6, p. 781-788, 2010.

Xua, Shisan, et al. Efecto Antiinflamatorio Y Antioxidante Del Extracto Hidroalcohólico De Petiveria Alliacea. **Revista Peruana De Biología**, v.19, p.329 - 34, 2012. <https://doi.org/10.15381/rpb.v19i3.1049>

YAMAMOTO, Mitsunari et al. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 9, p. 4878-4882, 2000.

YANG, H. et al. AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067–1069, 15 mar. 2019.

ZAGO, D. C.. **Adição do óleo essencial de Aloysia triphylla em dieta para zebrafish**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Centro de Ciências Exatas e Naturais. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p. 42, 2014.

ZHANG, Wei-xian. Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview. **Journal of nanoparticle Research**, v. 5, p. 323-332, 2003.

APÊNDICE 1 – Ficha de Avaliação dos Parâmetros Comportamentais



UNIFAP
Universidade Federal do Amapá

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM FÁRMACOS
PLATAFORMA BIOTÉRIO ZEBRAFISH
FICHA DE AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS - ZEBRAFISH



GRUPO:		0h	1h	2h	3h	4h	5h	24h
ESTÁGIO I	PARÂMETROS	Aumento da Atividade Natatória						
		Tremores na Cauda						
ESTÁGIO II		Natação Circular						
		Perda de Equilíbrio						
ESTÁGIO III		Perda de Motilidade						
		Repouso						
		Morte						
OUTRAS ALTERAÇÕES		Agressão ou Canibalismo						
		Perda de Coloração						
		Hiperventilação do Opérculo						

Fonte: Souza et al., 2016 (Adaptado).

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 02 de junho de 2021, o parecer referente ao protocolo no. **005/2021** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM AMAZÔNICA EM ZEBRAFISH**" coordenado por **RAPHAELLE SOUSA BORGES**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 02 June 2021, the final decision about the Protocol **005/2021** and certify that the research project entitled "**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM AMAZÔNICA EM ZEBRAFISH**" coordinated by **RAPHAELLE SOUSA BORGES**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 02 de junho de 2021

JOSE CARLOS TAVARES
CARVALHO:20876025220

Assinado de forma digital por JOSE CARLOS
TAVARES CARVALHO:20876025220
Dados: 2021.06.02 17:00:16 -03'00'

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
Rod. Juscelino Juscelino Kubitscheck, km 02 – Campus Marco Zero,
Macapá - AP, 68903-419 email: farmacos@unifap.br
Fone (96)4009-2907

ANEXO 2 – Comprovantes de submissão dos artigos

Inflammopharmacology
Evaluation of the anti-inflammatory and toxicological activity of 1-Nitro-2-Phenylethylene in Danio rerio (Zebrafish)
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Evaluation of the anti-inflammatory and toxicological activity of 1-Nitro-2-Phenylethylene in Danio rerio (Zebrafish)	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	Molecular docking; Inflammation; Nitrocompound; Nitroethylene	
Corresponding Author:	Vinicius Yuri Borges dos Santos, Esp. Universidade Federal do Amapá: Universidade Federal do Amapá Macapá, AP BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Amapá: Universidade Federal do Amapá	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Vinicius Yuri Borges dos Santos, Esp.	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Vinicius Yuri Borges dos Santos, Esp. André Rainan da Costa Baia Ana Carolina de Jesus Silva Swanny Ferreira Borges Alessandro Soares Rodrigues Fabrício Holanda e Holanda Ana Luíza de Deus Oliveira Irlon Maciel Ferreira Lorane Izabel da Silva Hage Melim José Carlos Tavares Carvalho Gisele Custódio de Souza Raphaele Sousa Borges	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Chamada CNPq Nº 12/2020 - Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação - MAI/DAI Processo 168076/2022-5)	Not applicable
Abstract:	The search for effective and low-toxicity anti-inflammatory agents is currently a highly relevant topic. This prominent scenario has driven research on various chemical compounds with therapeutic potential. The objectives of this study include obtaining a stable solution for the use of NPe, assessing acute toxicity, evaluating anti-inflammatory potential, conducting histopathological studies, and predicting potential interactions. A vehicle solution containing DMSO, butyl ester, and saline solution was used for dissolution. Acute toxicity was assessed using the LD50 determination technique. The anti-inflammatory activity was evaluated through the abdominal edema inhibition assay using the zebrafish model. Histopathological studies were conducted	