



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

SWANNY FERREIRA BORGES

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICIDADE AGUDA DO
EXTRATO DO FUNGO ENDOFÍTICO *NEOCOSMOSPORA FERRUGINEUM*
ISOLADO DA *EUTERPE OLERACEA* MART. EM ZEBRAFISH (*DANIO
RERIO*)**

Macapá
2022

SWANNY FERREIRA BORGES

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICIDADE AGUDA DO
EXTRATO DO FUNGO ENDOFÍTICO *NEOCOSMOSPORA FERRUGINEUM*.
ISOLADO DA *EUTERPE OLERACEA* MART. EM ZEBRAFISH (*DANIO
RERIO*)**

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. Titular José Carlos
Tavares Carvalho

Macapá
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

Borges, Swanny Ferreira..

B732e Estudo da atividade anti-inflamatória e toxicidade aguda do extrato fungo endofítico neocosmospora ferrugineum isolado da Euterpe olerace Mart. em zebrafish (Danio rerio) / Swanny Ferreira Borges. - 2021.

1 recurso eletrônico. 153 folhas : ilustradas.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professor Doutor José Carlos Tavares Carvalho

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

Inclui referências, anexos e apêndices.

1. Plantas medicinais. 2. Plantas medicinais – Atividade anti-inflamatória. 3. Açaí – fungo endofítico - Toxicidade. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orientador. III. Título.

Classificação Decimal de Dewey. 22 ed. 615.321

FERREIRA, Swanny Borges. **Estudo da atividade anti-inflamatória e toxicidade aguda do extrato fungo endofítico neocosmospora ferrugineum isolado da Euterpe olerace Mart. em zebrafish (Danio rerio).** Orientador: José Carlos TavaresCarvalho. 2022. 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas.

SWANNY FERREIRA BORGES

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICIDADE AGUDA DO
EXTRATO DO FUNGO ENDOFÍTICO *NEOCOSMOSPORA FERRUGINEUM*
ISOLADO DOS FRUTOS DE *EUTERPE OLERACEA* MART. EM *ZEBRAFISH*
(*DANIO RERIO*)**

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.

Data de Aprovação: 27/04/2022

Prof. Titular. José Carlos Tavares Carvalho Orientador(a)
Prof. Dr. do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal do Amapá

Profa. Dra. Raphaelle Souza Borges
Prof. Dra. do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal do Amapá

Profa. Dra. Gisele Custódio de Souza
(Membro externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me auxiliar e me amparar em todos os momentos, e ao longo desta jornada.

Aos meus pais, Raimundo Gomes Borges e Maria de Lourdes Borges, por serem os meus maiores incentivadores e apoiadores, em cada passo da minha vida e, que sempre fizeram todo o possível para que eu pudesse avançar na minha vida acadêmica e profissional, a minha eterna gratidão.

Ao meus tios, Alan Cleto Nunes e Cili Ferreira Nunes, por me receberem como uma filha aqui em Macapá e me apoiarem ao longo destes anos.

Ao meus amigos, Celso Leite e Graça Leite, minha total gratidão pelo apoio, carinho, cuidado e ajuda durante todos esses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Tavares, pela oportunidade, pelo respeito e pela compreensão nos momentos difíceis. Mas agradeço, principalmente, por todo aprendizado compartilhado, pelas explicações e pelo exemplo de competência e comprometimento com a pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira, pela oportunidade de fazer parte do seu laboratório, por compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio e incentivo. Aos amigos que fiz, no Biorg, que me acolheram e me ajudaram a me preparar e estudar para ingressar no mestrado, principalmente Mara, Victor, Fabricio, pelo auxílio, incentivo e disponibilidade.

Ao Grupo de Pesquisa em Fármacos pela experiência, pelo acolhimento e pelo trabalho em equipe, especialmente Brenda, Yessica, Adriana, Gisele, Rosemary, Kabrum, pelas conversas e disponibilidade sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, especialmente aos coordenadores, pela disponibilidade, apoio e incentivo aos discentes.

Aos meus familiares e amigos, que mesmo de longe, me apoiam e me incentivam e, compreendem a minha ausência.

Introdução: Fungos endofíticos isolados de espécies vegetais da Amazônia brasileira são organismos promissores na obtenção de moléculas bioativas. Devido as particulares condições ambientais e a simbiose com a planta medicinal hospedeira, produzem uma série de metabólitos com potencial farmacológico, incluindo aqueles que apresentam ação anti-inflamatória. **Objetivo:** Este estudo avaliou o potencial efeito anti-inflamatório e a toxicidade aguda por via oral do extrato diclorometânico/metanólico do micélio do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum* (EDMNF), isolado dos frutos da *Euterpe oleracea* Mart., da Amazônia brasileira em modelo experimental zebrafish (*Danio rerio*). **Material e Métodos:** A caracterização química de EDMNF foi realizada por GC/MS. A atividade anti-inflamatória in vivo foi avaliada através do ensaio de edema abdominal induzido por diferentes agentes inflamatórios (carragenina, dextrana, histamina e prostaglandina E2), 60 minutos após a administração via oral do EDMNF (doses de 10-2000 mg / kg), em zebrafish adultos. Foram realizadas análises histopatológicas do fígado, intestino e rins tanto para o ensaio de toxicidade aguda quanto para a avaliação da atividade anti-inflamatória. **Resultados e discussão:** A DL50 por via oral do EDMNF foi determinada acima da dose de 2000 mg/kg. No estudo histopatológico EDMNF não desencadeou alterações que comprometessem o funcionamento dos órgãos analisados (fígado, rins e intestino). Todas as doses testadas do EDMNF (10-2000 mg/kg) foram capazes de inibir o edema abdominal induzido por carragenina (>50%), de forma dose-dependente e, a DE50 do EDMNF foi de 80 mg/kg. O grupo tratado com EDMNF na dose de 500 mg/kg, apresentou maior efetividade na prevenção das alterações histopatológicas provocadas por carragenina (i.p) em todos os órgãos analisados. No teste de edema abdominal induzido por dextrana, histamina e prostaglandina E2 (i.p), o tratamento com a DE50 de EDMNF, foi tão eficaz quanto os fármacos padrões, na prevenção de alterações histopatológicas em todos os órgãos analisados. No estudo in silico, o composto Lactona desidromevalônica (identificado no EDMNF por GC-MS), exibiu interações com os alvos terapêuticos (COX-1 e COX-2) do processo inflamatório, diante disto, sugere-se que este composto seja um dos responsáveis pela atividade anti-inflamatória do EDMNF. **Conclusões:** Este estudo mostrou que o EDMNF é seguro e atóxico em doses altas para zebrafish adulto. EDMNF demonstrou efeito antiedematogênico frente aos diferentes agentes inflamatórios in vivo. Os resultados obtidos, além de refletirem a potencialidade de fungos endofíticos isolados da *E. oleracea*, na produção de compostos com ação anti-inflamatória, contribuem para futuros estudos de inflamação, quanto ao papel terapêutico dos metabólitos produzidos por fungos endofíticos isolados de espécies vegetais da Amazônia.

Palavras-Chave: Endofíticos fúngicos, Açaí, Inflamação aguda, Microbiota amazônica.

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP); Pró-Reitoria de Extensão e Ações Comunitárias (PROEAC) – Projeto Unimulher.

ABSTRACT

Introduction: Endophytic fungi isolated from plant species from the Brazilian Amazon are promising organisms for obtaining bioactive molecules. Due to the particular environmental conditions and the symbiosis with the host medicinal plant, they produce a series of metabolites with pharmacological potential, including those with anti-inflammatory action. **Objective:** This study evaluated the potential anti-inflammatory effect and the acute oral toxicity of the dichloromethane/methanolic extract of the mycelium of the endophytic fungus *Neocosmospora ferrugineum* (EDMNF), isolated from the fruits of *Euterpe oleracea* Mart., from the Brazilian Amazon in an experimental zebrafish model. (Danio Rerio). **Material and Methods:** Chemical characterization of EDMNF was performed by GC/MS. The in vivo anti-inflammatory activity was evaluated through the abdominal edema assay induced by different inflammatory agents (carrageenan, dextran, histamine and prostaglandin E₂), 60 minutes after oral administration of EDMNF (doses of 10 - 2000 mg/kg), in adult zebrafish. Histopathological analyzes of the liver, intestine and kidneys were performed both for the acute toxicity assay and for the evaluation of anti-inflammatory activity. **Results and Discussion:** The oral LD₅₀ of EDMNF was determined above the 2000 mg/kg dose. In the histopathological study, EDMNF did not trigger changes that compromised the functioning of Organs analyzed organs (liver, kidneys and intestine). All tested doses of EDMNF (10-2000 mg/kg) were able to inhibit carrageenan-induced abdominal edema (>50%), in a dose-dependent manner, and the ED₅₀ of EDMNF was 80 mg/kg. The group treated with EDMNF at a dose of 500 mg/kg was more effective in preventing the histopathological changes caused by carrageenan (i.p) in all organs analyzed. In the test of abdominal edema induced by dextran, histamine and prostaglandin E₂ (i.p), treatment with ED₅₀ of EDMNF was as effective as standard drugs in preventing histopathological changes in all organs analyzed. In the in silico study, the compound Lactone dehydromevalonic (identified in EDMNF by GC-MS), exhibited interactions with the therapeutic targets (COX-1 and COX-2) of the inflammatory process, in view of this, it is suggested that this compound is one of the responsible for the anti-inflammatory activity of EDMNF. **Conclusions:** This study showed that EDMNF is safe and non-toxic at high doses for adult zebrafish. EDMNF demonstrated an anti-edematogenic effect against different inflammatory agents in vivo. The results obtained, in addition to reflecting the potential of endophytic fungi isolated from *E. oleracea*, in the production of compounds with anti-inflammatory action, contribute to future studies of inflammation, regarding the therapeutic role of metabolites produced by endophytic fungi isolated from plant species of the Amazon.

Keywords: Fungal endophytes; açai; acute inflammation; Amazonian microbiota.

Acknowledgements: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP); Dean of Extension and Community Actions (PROEAC) – Unimulher Project.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Espécie <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	23
Figura 2 – Potencialidades do uso do açaizeiro na Amazônia	24
Figura 3 – Metabólito (paclitaxel) isolado do fungo endofítico <i>Taxomyces andreanae</i>	27
Figura 4 – Moléculas bioativas anti-inflamatórias isoladas de endofíticos. (A) ácido ambuico, (B) ergosterol e (C) herbarina	33
Figura 5 - Sequência de eventos vasculares no desenvolvimento da inflamação aguda.....	35
Figura 6 - Sequência de eventos celulares no desenvolvimento da inflamação aguda.....	36
Figura 7 - Mediadores químicos ou reguladores da inflamação	39
Figura 8 - Mediadores derivados do ácido araquidônico	41
Figura 9 - <i>Zebrafish</i> adulto (<i>Danio rerio</i>).....	43
Figura 10 – Edema abdominal em <i>zebrafish</i> induzido por carragenina.....	45
Figura 11 - Área de coleta na estação Experimental do Cerrado da Embrapa/Amapá, latitude norte 00 22 55” e 51 01 40” de latitude oeste.....	49
Figura 12 - Organização, identificação e armazenamento das amostras frescas de <i>E. oleracea</i> (folhas, frutos e raízes).....	50
Figura 13 - Etapas de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos.	51
Figura 14 - Fluxograma da obtenção do extrato do micélio do fungo endofítico <i>Neocosmospora ferrugineum</i>	55
Figura 15 - Ensaio de toxicidade aguda oral do EDMNF em <i>zebrafish</i> adulto. (A) grupo controle (tratado com solução salina, v.o), (B) grupo tratado com EDMNF 175mg/kg (v.o), (C) grupo tratado com EDMNF 550mg/kg (v.o) e (D) grupo tratado com EDMNF 2000mg/kg (v.o).	57
Figura 16 - Etapas para preparação das lâminas histológicas dos órgãos de <i>zebrafish</i> adulto.	58
Figura 17 - Esquema da metodologia do teste de edema abdominal induzido por carragenina.....	64

Figura 18 - Esquema da metodologia do teste de edema abdominal induzido por dextrana.....	66
Figura 19 - Esquema da metodologia do teste de edema abdominal induzido por histamina	67
Figura 20 - Esquema da metodologia do teste de edema abdominal induzido por PGE2	68
Figura 21 - Macromorfologia do fungo endofítico <i>Neocosmospora ferrugineum</i> isolado da <i>Euterpe Oleracea Mart.</i> (A) e aspecto microscópico do <i>Neocosmospora ferrugineum</i> . (B), indicando as seguintes características: conídios (CD) agrupados unicelulares, conidióforo (CDF) alongado perpendicular as hifas.....	72
Figura 22 - Dendograma baseado em distância genética utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> , demonstrando a relação entre a sequência parcial da região TEF da amostra CPQBA 2615-22-DRM 01 e sequências de linhagens de microorganismos relacionados presentes nas bases de dados Mycobank (CBS-Knaw, atual Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) e Genbank	73
Figura 23 - Cromatograma obtido por GC-MS do EDMNF, mostrando o constituinte identificado como Lactona desidromevalônica, com 93,3% similaridade, quando comparado aos dados da Nist Research Library. (x= tempo e eixo Y = abundância)	78
Figura 24 - Seção longitudinal do fígado de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) adulto, mostrando as principais alterações observadas no teste de toxicidade aguda por via oral do EDMNF. A refere-se ao tecido hepático normal, H hepatócitos. B refere-se ao tecido hepático do grupo controle (solução salina), VaC intensa vacuolização citoplasmática. C , D e E refere-se ao tecido hepático dos grupos tratados com as doses de 175, 550 e 2000 mg/kg respectivamente, com AN atrofia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática. Todas as figuras foram aumentadas em 400 x, H e E. ...	85
Figura 25 - Efeito do tratamento com EDMNF nas doses de 175, 550 e 2000mg/kg sobre o Índice de alterações histopatológicas em fígado, intestino e rins de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) adultos, no teste de toxicidade aguda oral. Os dados são apresentados como média ± DP (n=3/ grupo); * p < 0,05 para	

grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste postthoc de Tukey.....85

Figura 26 - Seção longitudinal do intestino de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, mostrando as principais alterações observadas no teste de toxicidade aguda por via oral do EDMNF. A refere-se ao tecido intestinal normal. B refere-se ao tecido intestinal do grupo controle (solução salina), mostrando HTCE hipertrofia das células epiteliais. C, D e E mostrando tecido hepático dos grupos tratados com as doses de 175, 550 e 2000 mg/kg, respectivamente, com HTCE hipertrofia das células epiteliais, IL infiltração linfocitária, ILE infiltração de leucócitos, DVV dilatação dos vasos presentes nas vilosidades. Todas as figuras foram aumentadas em 400 x, H e E.....87

Figura 27 - Seção longitudinal do rim de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, mostrando as principais alterações observadas no teste de toxicidade aguda por via oral do EDMNF. A refere-se ao tecido renal normal. B refere-se ao tecido renal do grupo controle (solução salina). C, D e E refere-se ao tecido renal dos grupos tratados com as doses de 175, 550 e 2000 mg/kg, DGH degeneração hialina tubular leve, HtCT hiperplasia das células tubulares, ALT aumento do lúmen tubular, HTCE hipertrofia das células tubulares. Todas as figuras foram aumentadas em 9400, H e E.....87

Figura 28 - Efeito da administração por via oral do EDMNF nas doses de 10, 100, 500, 1000 e 2000mg/kg sobre o edema abdominal induzido por carragenina em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos. As colunas representam a média $\pm$ erros padrão da média (n=12/grupo) no pico máximo do edema (0-5h). Os números acima da barra indicam a porcentagem de inibição do edema. ANOVA de uma via com teste post-hoc Tukey (*p $\leq$ 0,01 para controle PBS; **p > 0,01 para controle Cg vs. Controle PBS e controle Vh vs. controle Ind; ***p < 0,05 para EDMNF e controle Ind vs. Controle Cg).89

Figura 29 - Efeito da administração por via oral do EDMNF na dose de 80mg/kg (DE50) sobre o edema abdominal induzido por dextrana em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos. As colunas representam a média $\pm$ erros padrão da média (n=9/grupo), no pico máximo do edema induzido por dextrana (0-1h30). Os números acima da barra indicam a porcentagem de inibição do

edema. ANOVA de uma via com teste post-hoc Tukey (*p < 0,01 para controle SS, **p > 0,01 para controle Dex vs. Controle SS; ***p < 0,05 EDMNF e controle Cp vs. Controle Dex).91

Figura 30 - Efeito da administração por via oral do EDMNF na dose de 80 mg/kg (DE50) sobre o edema abdominal induzido por histamina em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos. As colunas representam a média ± erros padrão da média (n=9/grupo), no pico máximo do edema induzido por histamina (0-1h). Os números acima da barra indicam a porcentagem de inibição do edema. ANOVA de uma via com teste post-hoc Tukey (*p < 0,01 para controle SS, **p > 0,01 para controle Hist vs. Controle SS; ***p < 0,05 para EDMNF e controle Cp vs. Controle Hist).93

Figura 31 - Efeito da administração por via oral do EDMNF na dose de 80 mg/kg (DE50) sobre o edema abdominal induzido por PGE2 em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos. As colunas representam a média ± erros padrão da média (n=9/grupo), no pico máximo do edema induzido por prostaglandina (0-1h). Os números acima da barra indicam a porcentagem de inibição do edema. ANOVA de uma via com teste post-hoc Tukey (*p < 0,01 para controle SS, **p > 0,01 para controle PGE2 vs. Controle SS; ****p ≥ 0,05 para EDMNF e controle Cp vs. Controle PGE2).93

Figura 32 - Seção longitudinal do fígado, rins e intestino de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por carragenina. A e B mostrando tecido hepático; C e D mostrando tecido renal; E e F mostrando tecido intestinal, com as principais alterações, H hiperemia, AN atrofia nuclear, DGN degeneração nuclear, AtN atipia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática, DGHL degeneração hialina tubular leve, DGHS degeneração hialina tubular severa, ALT aumento do lúmen tubular, DgT degeneração tubular, ILe infiltração leucocitária estromal, DLP destacamento da lâmina própria, DVV dilatação dos vasos nas vilosidades, HtCC hipertrofia das células caliciformes, HpCE hiperplasia das células epiteliais. Todas as figuras foram aumentadas em 9400, H e E.108

Figura 33 - Efeito da administração oral de solução salina (2µl, controle PBS e Cg), Tween+DMSO+água destilada (2µl, controle Vh), Indometacina (10 mg/kg, controle Ind), EDMNF (10, 100, 500,1000 e 2000mg/kg) sobre o índice de alterações histopatológicas (IAH) em fígado, intestino e rins de *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos, com aplicação de carragenina intraperitoneal (400µg, 20µL). Os dados são apresentados como média ± DP (n=12/ grupo); * p <0,05 para grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste postthoc de Tukey.....109

Figura 34 - Seção longitudinal do fígado, rins e intestino de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por dextrana. Todas as figuras foram aumentadas em 400 x, H e E. A e B mostrando tecido hepático; C e D mostrando tecido renal; E e F mostrando tecido intestinal, mostrando principais alterações, AN atrofia nuclear, AtN atipia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática, DGHL degeneração hialina tubular leve, DGHS degeneração hialina tubular severa, ALT aumento do lúmen tubular, DgT degeneração tubular, HtCT hipertrofia das células tubulares, ILe infiltração leucocitária estromal, ILi infiltração linfocitária, DVV dilatação dos vasos nas vilosidades.114

Figura 35 - Efeito da administração oral de solução salina (2µl, controle SS e Dex), ciproeptadina (10mg/kg, controle Cp), EDMNF 80mg/kg sobre o índice de alterações histopatológicas (IAH) em fígado, intestino e rins de *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos, com aplicação de dextrana via intraperitoneal (100 µg, 20 µL). Os dados são apresentados como média ± DP (n=9/ grupo); * p <0,05 para grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste postthoc de Tukey.115

Figura 36 - Seção longitudinal do fígado, rins e intestino de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por histamina. A e B mostrando tecido hepático; C e D mostrando tecido renal; E e F mostrando tecido intestinal, mostrando principais alterações, AN atrofia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática, DGHL degeneração hialina tubular leve, ALT aumento do lúmen tubular, HtCE hipertrofia das

células epiteliais, ILi infiltração linfocitária, DVV dilatação dos vasos nas vilosidades, DLP destacamento da lâmina própria. Todas as figuras foram aumentadas em 9400, H e E.	118
Figura 37 - Efeito da administração oral de solução salina (2µl, controle SS e Hist), ciproeptadina (10mg/kg, controle Cp), EDMNF 80mg/kg sobre o índice de alterações histopatológicas (IAH) em fígado, intestino e rins de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) adultos, com aplicação de histamina via intraperitoneal (50µg, 20µL). Os dados são apresentados como média ± DP (n=9/grupo); * p <0,05 para grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA <i>one-way</i> seguida do teste postthoc de Tukey.	119
Figura 38 - Seção longitudinal do fígado, rins e intestino de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) adulto, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina (PGE2). A e B mostrando tecido hepático; C e D mostrando tecido renal; G e H mostrando tecido intestinal, mostrando principais alterações, AN atrofia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática, DGHl degeneração hialina tubular leve, DEB diminuição do espaço da cápsula de Bowman, DCG dilatação dos capilares glomerulares ALT aumento do lúmen tubular, DgT degeneração tubular, ILe infiltração leucocitária estromal, DLP destacamento da lâmina própria, DVV dilatação dos vasos nas vilosidades, HpCE hiperplasia das células epiteliais. Todas as figuras foram aumentadas em 400 x, H e E.	121
Figura 39 - Índice de alterações histopatológicas (IAH) em fígado, intestino e rins de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) adultos, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina (PGE2). Os dados são apresentados como média ± DP (n=9/ grupo); * p <0,05 para grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA <i>one-way</i> seguida do teste postthoc de Tukey.	122
Figura 40 - <i>Docking</i> molecular entre a lactona desidromevalônica e a COX-1 (A) e COX-2 (B) em formato 2D	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de fungos edofíticos isolados de plantas medicinais e suas atividades biológicas.....	29
Tabela 2 – Valores de referência do índice de alteração histopatológica	59
Tabela 3 - Alterações histopatológicas consideradas para análise do intestino de <i>zebrafish</i> adulto no ensaio de toxicidade aguda e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF	60
Tabela 4 - Alterações histopatológicas consideradas para análise do fígado de <i>zebrafish</i> adulto no ensaio de toxicidade aguda e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF	61
Tabela 5 - Alterações histopatológicas consideradas para análise dos rins de <i>zebrafish</i> adulto no ensaio de toxicidade aguda oral e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF	62
Tabela 5 – Metodologia do tempo de análise comportamental, após a indução do edema abdominal por diferentes agentes inflamatórios	69
Tabela 6 – Resultado da análise qualitativa. Compostos identificados por GC-MS no EDMNF.....	76
Tabela 7 – Resultado da análise qualitativa do EDMNF, mostrando o constituinte identificado como Lactona desidromevalônica, conforme detectado por GC-MS e comparado com a biblioteca NIST	78
Tabela 8 - Alterações comportamentais após tratamento com EDMNF nas doses de 175, 550 e 2000mg/kg por via oral, em diferentes tempos de observação, no ensaio de toxicidade aguda	82
Tabela 9 - Distribuição dos valores de IAH para cada órgão de <i>zebrafish</i> adulto, no teste de toxicidade oral aguda do EDMNF, de acordo com as doses utilizadas.....	86
Tabela 10 - Alterações comportamentais em <i>zebrafish</i> adultos no teste de edema abdominal induzido por carragenina, avaliados durante o período de 1 a 5 horas.....	96

Tabela 11 - Alterações comportamentais em <i>zebrafish</i> adultos no teste de edema abdominal induzido por dextrana, avaliados durante o período de 90 minutos	101
Tabela 12 - Alterações comportamentais em <i>zebrafish</i> adultos no teste de edema abdominal induzido por histamina, avaliados durante o período de 60 minutos	102
Tabela 13 - Alterações comportamentais em <i>zebrafish</i> adultos no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina E2, avaliados durante o período de 60 minutos.	104
Tabela 14 - Índice de alterações histopatológicas (IAH) para cada órgão (fígado, intestino e rins) de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) adultos, no teste de edema abdominal induzido por carragenina.....	109
Tabela 15 - Distribuição dos valores de IAH para cada órgão de <i>zebrafish</i> adulto, no teste de edema abdominal induzido por dextrana.	115
Tabela 16 - Distribuição dos valores de IAH para cada órgão de <i>zebrafish</i> adulto, no teste de edema abdominal induzido por histamina.....	119
Tabela 17 – Distribuição dos valores de IAH para cada órgão de <i>zebrafish</i> adulto, no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina E2	122
Tabela 18 - Interações moleculares entre a COX-1, ligante complexado e lactona desidromevalônica.....	129
Tabela 19 - Interações moleculares entre a COX-2, ligante complexado e a lactona desidromevalônica.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NIST	<i>Nist Research Library</i>
NO	óxido nítrico
FPLJ	Fitopreparação a base de leite de janaguba (<i>Himatanthus drasticus</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
IAH	Índice de Alteração Histopatológica
ERNLPS	Espécies reativas de nitrogênio
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
RMSD	Valores de desvio quadrático médio
AVMA	<i>American Veterinary Medical Association</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
BDA	Cultura sólido batata-dextrose-ágar
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
ELZ	Etanólico de <i>Naravelia zeylanica</i> (L)
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
EDMNF	Extrato diclorometânico/metanólico do micélio do fungo endofítico <i>Neocosmospora ferrugineum</i>
AINES	Anti-inflamatórios Não esteroidais
COX-1 COX-2	<i>Cicloxygenases</i> 1 e 2
LOX	<i>Lipoxigenases</i>
AA	Ácido araquidônico
PAF	Fator de ativação plaquetária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
3.1. EUTERPE OLERACEA MART.....	23
3.2 FUNGOS ENDOFITICOS: INTERAÇÃO PLANTA-ENDOFITO, METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS E POTENCIALIDADE	26
3.2.1 Fungos endofíticos isoladas de E. Oleraceae	30
3.2.2 Fungos endofíticos: fonte de moléculas anti-inflamatórias	31
3.3 INFLAMAÇÃO	33
3.3.1 Definição e importância	33
3.3.2 Inflamação aguda	34
3.3.3 Desenvolvimento do processo inflamatório	36
3.3.4 Mediadores químicos da inflamação	38
3.4 MODELO EXPERIMENTAL: ZEBRAFISH (<i>DANIO RERIO</i>)	43
3.4.1 Zebrafish adulto como modelo experimental para avaliação de atividade anti-inflamatória de produtos naturais	44
3.4.2 Métodos de avaliação da atividade anti-inflamatória	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 MATERIAL	49
4.1.1 Fungo endofítico	49
4.1.2 Material vegetal e localização da coleta	49
4.1.3 Isolamento das colônias de microorganismos endofíticos.....	50
4.1.3.1 Caracterização morfológica.....	51
4.1.3.2 Preservação das colônias puras dos microorganismos endofíticos	52
4.1.4 Identificação e caracterização molecular	52
4.1.4.1 Metodologia utilizada.....	52
4.1.5 Animais experimentais	53
4.2 MÉTODOS	54
4.2.1 Obtenção do extrato do micélio do fungo endofítico <i>Neocosmospora ferrugineum</i>.....	54

4.2.2 Análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)	56
4.2.3 Estudo do EDMNF em <i>zebrafish</i> adulto.....	56
4.2.3.1 Ensaio de toxicidade aguda oral e determinação da DL50	56
4.2.3.1.1 Análise comportamental	57
4.2.3.1.2 Monitoramento da mortalidade	57
4.2.3.1.3 Análise histopatológica.....	57
4.2.3.1.3.1 Preparo do material	57
4.2.3.1.3.2 Avaliação das alterações histopatológicas	58
4.2.3.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF no teste de edema abdominal induzido por diferentes agentes inflamatórios.....	63
4.2.3.2.1 Teste de edema abdominal induzido por carragenina.....	63
4.2.3.2.2 Determinação da dose efetiva 50 (DE ₅₀) do EDMNF	64
4.2.3.2.3 Teste de edema abdominal induzido por dextrana, histamina e prostaglandina E ₂	65
4.2.3.2.4 Análise de edema abdominal e avaliação do efeito inibitório	68
4.2.3.2.5 Análise comportamental	69
4.2.3.2.6 Análise histopatológica.....	70
4.2.3.2.7 Análise estatística.....	70
4.2.3.2.8 <i>Docking</i> molecular em alvos biológicos relacionados ao processo inflamatório.....	70
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	72
5.1 IDENTIFICAÇÃO FUNGO ENDOFÍTICO.....	72
5.1.1 Caracterização morfológica	72
5.1.2 Caracterização molecular	72
5.2 ANÁLISE	74
5.2.1 Análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) do EDMNF	74
5.3 ESTUDO DO EDMNF EM ZEBRAFISH ADULTO	79
5.3.1 Avaliação da toxicidade aguda oral e determinação da DL50.....	79
5.3.1.1 Análise comportamental	81
5.3.1.2 Análise histopatológica.....	84
5.3.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF no teste de edema abdominal induzido por diferentes agentes inflamatórios.....	88
5.3.2.1 Inibição de edema abdominal induzido por carragenina	88
5.3.2.2 Inibição de edema abdominal induzido por dextrana	90
5.3.2.3 Inibição de edema abdominal induzido por histamina e prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	92
5.3.2.4 Análise comportamental	95

5.3.2.4.1 Teste de edema abdominal induzido por carragenina.....	95
5.3.2.4.2 Teste de edema abdominal induzido por dextrana.....	100
5.3.2.4.3 Teste de edema abdominal induzido por histamina	102
5.3.2.4.4 Teste de edema abdominal induzido por prostaglandina E2 (PGE2)	103
5.3.2.5 Análise histopatológica.....	105
5.3.2.5.1 Teste de edema abdominal induzido por carragenina.....	105
5.3.2.5.2 Teste de edema abdominal induzido por dextrana.....	113
5.3.2.5.3 Teste de edema abdominal induzido por histamina	117
5.3.2.5.4 Teste de edema abdominal induzido por prostaglandina E2.....	120
5.3.2.6 <i>Docking</i> molecular do composto lactona desidromevalônica em alvos biológicos relacionados ao processo inflamatório	127
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	131
REFERÊNCIAS.....	132
LISTA DE ANEXOS.....	152
ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética	152
ANEXO 2 – Comprovante de submissão do artigo	153

Fungos endofíticos são microrganismos que colonizam espécies vegetais, através de diversos mecanismos, sem causar doenças ou danos aparentes, coabitando em latência com suas espécies hospedeiras. Endófitos isolados de plantas medicinais, destacaram-se na última década, como eficientes produtores de metabólitos secundários bioativos, com atividades biológicas e farmacológicas comprovadas, tornando-se importante fonte de produtos utilizados na área biotecnológica, sendo agentes propulsores de inúmeros medicamentos e produtos.

Cerca de 80% dos medicamentos naturais disponíveis no mercado são provenientes das plantas medicinais e consequentemente de seus endófitos. Estudos recentes indicam que fungos endofíticos são produtores de substâncias com potencial ação anti-inflamatória. A bioprospecção e estudo de fungos endofíticos de plantas medicinais de uso popular, para o tratamento de processos inflamatórios, podem nos levar à descoberta de novos fármacos anti-inflamatórios com maior eficácia e segurança que os de uso corrente.

A região amazônica apresenta inúmeras plantas medicinais com potencial farmacológico, dentre elas, a *E. Oleracea*, conhecida popularmente como açaizeiro, é utilizada na medicina tradicional como agente antidiarreico e anti-inflamatório, além disso, os frutos desta espécie, são importante fonte alimentícia para população da região norte do Brasil.

E. oleracea, é considerada a palmeira mais produtiva da região amazônica, destacando-se na indústria de alimentos, cosméticos e atualmente farmacêutica, por ser o membro mais importante da família *Arecaceae* com propriedades medicinais. O alto teor de polifenóis presente nos frutos, confere a esta espécie, diversas propriedades farmacológicas, como anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante, entre outras. Plantas do gênero *Euterpe* são amplamente estudadas, no entanto, pesquisas sobre fungos endofíticos associados ao gênero *Euterpe* são escassas, principalmente relacionados a espécie *E. oleracea*.

O desenvolvimento de novos fármacos com menor toxicidade, ação seletiva e mais seguros para o tratamento de doenças inflamatórias continuam a ser objeto de grande interesse. As terapias atuais se limitam ao uso de anti-inflamatórios esteroidais

(AIEs) e não esteroidais (AINES). No entanto, o uso contínuo, também pode causar certas reações adversas graves, como anormalidades gastrointestinais, renais e cardiovasculares. A resposta inflamatória tem particular importância fisiológica, pois é um dos parâmetros fundamentais, que afetam o equilíbrio dinâmico entre a saúde e a doença. A inflamação aguda pode se tornar crônica, resultando em inúmeras doenças inflamatórias graves, sendo considerada, causa importante de morbimortalidade em diversas especialidades clínicas.

Embora a maioria das doenças inflamatórias severas e debilitantes seja de natureza crônica, modelos inflamatórios agudos são importantes para a descoberta e triagem de novas drogas. Nesse sentido, modelos agudos de inflamação em *zebrafish* (*Danio rerio*) estão bem estabelecidos. Nos últimos anos, além de ser considerado como um modelo ideal para estudar a fisiopatologia de doenças relacionadas à inflamação humana e para avaliar a ação anti-inflamatória de compostos naturais, diversos protocolos de inflamação foram desenvolvidos em *zebrafish*, como a indução de edema abdominal por carragenina, com resultados que evidenciam a liberação de vários mediadores inflamatórios (TNF- α e iNOS) e desenvolvimento de sintomas característicos da inflamação aguda.

A espécie *Danio rerio* (HAMILTON, 1822), conhecida popularmente como *zebrafish*, é um pequeno peixe tropical de água doce, que vive na Índia e no sul da Ásia. Tornou-se importante para avaliações biomédicas, devido às suas vantagens que incluem: alta similaridade genética e fisiológica com humanos, pequeno tamanho, transparência óptica e rápido desenvolvimento; sendo utilizado em estudos relacionados à genética, embriologia, desenvolvimento celular, toxicidade, angiogênese, apoptose, imunologia, entre outros. A utilização do *zebrafish* como modelo experimental torna-se a mais adequada, visto que, o pequeno porte e baixo peso corporal favorecem a utilização de reduzida quantidade de amostra a ser testada. Além disso, apresenta um sistema imunológico complexo com características de mamíferos e, uma série de mediadores e receptores inflamatórios que são subjacentes às respostas inflamatórias.

Ante o exposto, o presente estudo avaliou o potencial efeito anti-inflamatório e a toxicidade aguda por via oral do extrato diclorometânico/metanólico do micélio do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum* (EDMNF), isolado dos frutos da *E. oleracea* da Amazônia brasileira em modelo experimental *zebrafish* (*Danio rerio*).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito anti-inflamatório do extrato diclorometânico/metanólico do micélio do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum* (EDMNF), isolado dos frutos da *E. oleracea* Mart. em *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter e caracterizar por GC/MS o extrato diclorometânico/metanólico do micélio do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum* (EDMNF);
- b) Avaliar a toxicidade aguda por via oral do EDMNF em *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto e determinar a DL50;
- c) Avaliar o efeito do EDMNF sobre a resposta inflamatória no modelo de edema abdominal induzido por carragenina, dextrana, histamina e prostaglandina E2 em *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto;
- d) Descrever os efeitos comportamentais apresentados pelo *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, quando submetidos ao ensaio de toxicidade aguda e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF;
- e) Realizar a análise histopatológica do fígado, intestino e rins de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, tanto para o ensaio de toxicidade aguda quanto para avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF;
- f) Realizar *docking* molecular dos compostos identificados no EDMNF, em alvos biológicos relacionados ao processo inflamatório.

3.1. EUTERPE OLERACEA MART.

A região amazônica apresenta inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal e farmacológico, dentre elas, a *Euterpe Oleracea*, conhecida popularmente como açazeiro, é uma palmeira típica da floresta de várzea da região Amazônica, pertencente à classe *Liliopsida*, ordem *Arecales*, família *Arecaceae*, gênero *Euterpe* e espécie *Euterpe oleracea* (Figura 1). Possui prevalência em vários estados do país, como Pará, Amapá, Maranhão, Amazonas, Tocantins e Mato grosso, estendendo-se ainda por alguns países como Colômbia, Equador, Guianas e Venezuela (CONFORTO; CONTIN, 2009).



Figura 1 - Espécie *Euterpe oleracea* Mart.
Fonte: Acervo particular.

Na região do estuário amazônico, o açazeiro é aproveitado pela população de forma prática e integral. O estirpe adulto e suas folhas são usados em construções rústicas e coberturas de casas, e também, como lenha para olarias. O caroço e os cachos, quando decompostos, são empregados como adubo e matéria orgânica. A

maceração dos frutos, produz a bebida conhecida como “açai”, considerado o principal constituinte da base alimentar de diferentes classes sociais da região norte do Brasil. Na medicina tradicional popular, é utilizado como agente antidiarreico (raízes) e anti-inflamatório (folhas) (DOS SANTOS et al., 2018).

E. oleracea além de ser considerada a palmeira mais produtiva da região amazônica (Figura 2), destacando-se na indústria de alimentos e cosméticos, possui expressiva importância socioeconômica. Seu fruto, o açai, assim como, o palmito, dela extraído, são os principais recursos comercializados (CASTRO; GUTIERREZ, SOTÃO, 2013).

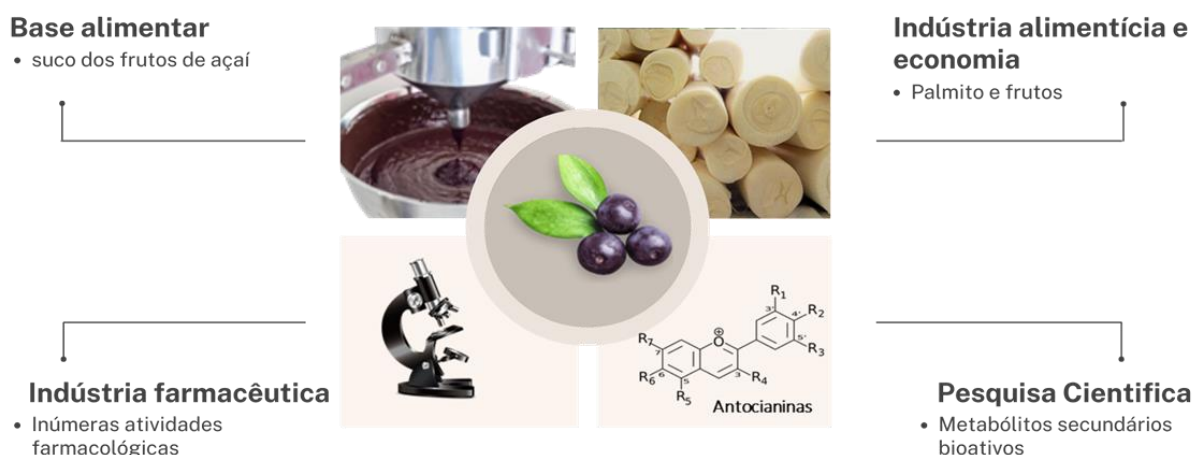


Figura 2 – Potencialidades do uso do açaizeiro na Amazônia
Fonte: A autora (2022).

O Brasil é considerado o país que mais produz, consome e exporta, o açai. Visando a manutenção e ampliação do mercado do fruto, a indústria alimentícia está investindo não apenas no cultivo, mas também, na qualificação da mão de obra. Com o crescimento do mercado, esse produto passou a ser consumido também nas grandes capitais brasileiras, atingindo até alguns países, como Japão, China, Estados Unidos e Europa, ganhando notoriedade, e sendo considerado um alimento funcional (CEDRIM; BARROS, NASCIMENTO, 2018).

Devido à ampla divulgação dos seus benefícios à saúde atribuídos à ingestão dos seus derivados, tornou-se objeto de estudo de vários pesquisadores. Os resultados relatam a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, propriedades anti-inflamatórias e atividades pró-apoptóticas e antiproliferativas contra células cancerosas de leucemia (CONFORTO; CONTIN, 2009).

Além de ser o membro mais importante da família *Arecaceae* com propriedades medicinais, *E. oleracea* é rica em metabólitos secundários bioativos, como flavonoides, em destaque as antocianinas, que são pigmentos naturais, considerado bioativos com importantes funções e ações biológicas, dentre elas a atividade antioxidante, podendo colaborar na prevenção de doenças crônico-degenerativas (BERNAUD; FUNCHAL, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Experimentos realizados por Favacho *et al.* (2011), utilizaram óleo dos frutos de *E. oleracea*, para estudar os seus efeitos na inflamação e hiperalgesia em camundongos. Os resultados evidenciaram que o óleo dos frutos de *E. oleracea* possui atividades anti-inflamatórias e antinociceptiva.

Moura *et al.* (2012) demonstraram pela primeira vez que o tratamento com extrato de *E. oleracea* reduziu significativamente a inflamação pulmonar e os marcadores de estresse oxidativo induzidos por fumaça de cigarro em pulmões de camundongos. Os resultados podem estimular futuros estudos sobre o extrato *E. oleracea* como um agente potencial para proteger contra a inflamação induzida por fumaça de cigarro em humanos.

O estudo realizado por Duarte *et al.* (2015), avaliou a atividade anti-inflamatória de polifenóis do extrato de *E. oleracea*, em biomarcadores e vias de sinalização pró-inflamatórias, de células normais do colón de miofibroblastos intestinais, estimuladas por LPS (lipopolissacarídeo). Os resultados indicaram o potencial dos polifenóis do extrato de *E. oleracea* na prevenção da inflamação intestinal.

Nos estudos realizados por Souza *et al.* (2017), o óleo de *E. Oleracea* foi capaz de reduzir os níveis de colesterol, triglicerídeos e LDL-c, além de contribuir para a aumento do HDL, em ratos com hiperlipidemia induzida por gordura saturada de *Cocos nucifera* L., contribuindo consideravelmente para a melhora do perfil lipídico.

A importância da *E. oleracea* amplia-se na indústria farmacêutica. De Almeida Magalhães *et al.* (2020) destacam que as folhas, frutos e o óleo de *E. oleracea* exibem inúmeras atividades farmacológicas como anti-inflamatório, antioxidante,

antimicrobiano, antinociceptivo, antinácemo, anteragênico, anterógeno, tratamento e prevenção do câncer de mama e síndromes metabólicas como diabetes, hipertensão e hiperlipidemia, além de, proteção de órgãos como pulmão, rim, fígado, coração e sistema nervoso. Ainda acrescenta, que às atividades biológicas identificadas estão intrinsecamente ligadas a composição fitoquímica desta espécie. Neste sentido, considera-se que esta espécie esteja apenas no início dos avanços no desenvolvimento de produtos promissores para a indústria farmacêutica (MAGALHÃES *et al.*, 2020).

3.2 FUNGOS ENDOFITICOS: INTERAÇÃO PLANTA-ENDOFITO, METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS E POTENCIALIDADE

Fungos endofíticos são microorganismos que colonizam o interior de espécies vegetais, e permanecem de forma assintomática, ou seja, sem causar doenças ou danos aparentes, coabitando em latência com suas espécies hospedeiras. Das classes de endófitos existentes, os fungos, constituem o grupo de maior destaque, devido à grande diversidade de espécies e pela produção de metabolitos secundários biologicamente ativos (JALGAONWALA; MOHITE, MAJAHAN, 2011).

A primeira descoberta sobre fungos endofíticos foi relatada em meados de 1904. No entanto, Bary em 1866, já havia feito os primeiros relatos quanto a definição de fungos endofíticos. Desde então, até a década de 70, estes microorganismos foram pouco explorados. Voltando a ser foco das pesquisas, com a descoberta da produção do metabólito paclitaxel (Figura 3), pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*. O paclitaxel, que originalmente era obtido da planta medicinal *T. brevifolia*, é o composto ativo do medicamento anticancerígeno Taxol® (NISA *et al.*, 2015).

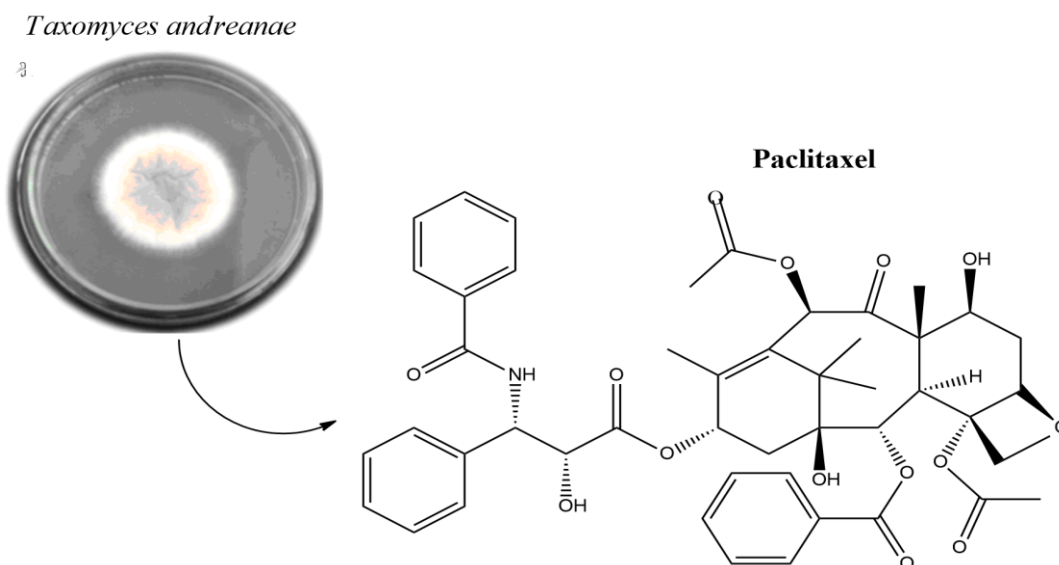


Figura 3 – Metabólito (paclitaxel) isolado do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*

Fonte: A autora (2022).

As plantas em quase sua totalidade, armazenam inúmeras espécies de endófitos. A colonização pode ocorrer de forma horizontal, através de lesões naturais ou provocadas, ou de forma vertical, onde as sementes são colonizadas. O tipo de interação entre endófito-planta, será determinado pela forma, a qual, ocorre a colonização. Geralmente, nas colonizações verticais, temos a interação mutualística. Já nas horizontais predomina o antagonismo. Endófitos fúngicos podem habitar todos os órgãos e tecidos da planta hospedeira, estando presente nas folhas, hastes, frutos e raízes (CHAPLA; BIASETTO, ARAUJO, 2013).

Em geral, as relações estabelecidas entre endófitos e plantas são simbióticas, do tipo mutualísticas. Estas associações, em muitos casos, são benéficas para ambos. A planta apresenta maior resistência, tanto a ataque de pragas, como em ambientes com intenso estresse, causado por fatores bióticos (insetos, herbívoros, nematoides parasitas e microorganismos fitopatogênicos) ou abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes, salinidade), enquanto os fungos obtêm proteção e nutrientes necessários para seu desenvolvimento (AZEVEDO, 1998; CHAPLA; BIASETTO, ARAUJO, 2013).

Contudo, as interações entre plantas e endófitos, não se delimitam apenas ao fornecimento de nutrientes aos fungos ou proteção as plantas. Diversos estudos sobre os resultados dessas interações, estão sendo realizados ao longo dos anos, com foco principalmente, na produção de metabólitos secundários bioativos (referência). Os endófitos são potenciais produtores metabólitos secundários originalmente

produzidas pela planta hospedeira e/ou metabólitos inéditos com maior bioatividade (FERRARA, 2006).

A produção de metabólitos secundários ocorre quando o crescimento dos organismos endofíticos chegam a fase estacionária, devido ao esgotamento dos nutrientes, utilizados para o metabolismo primário. Isto gera um estresse ao microorganismo, havendo um declínio em seu crescimento (ANDRADE, 2015). Embora não estejam relacionados com o crescimento, os metabólitos secundários são frequentemente substâncias bioativas, de baixo peso molecular, e desempenham funções importantes na defesa, competição, sinalização e interações com a planta hospedeira (BÉRDY, 2005; CLARDY; WALSH, 2004).

Dreyfuss; Chapella (1994) considera que a grande produção de metabolitos secundários por fungos endofíticos, explica-se pela teoria ecológica, a qual, descreve que existem dois fatores imprescindíveis que impulsionam esta diversidade metabólica, são eles, o alto nível de estresse ambiental e intensa interação com outros organismos. A exposição a um ou ambos os fatores, proporciona a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos. Além disso, diversas pesquisas consideram que a interação genética entre fungos e plantas, conhecida como, transferência genética horizontal, seja um dos mecanismos envolvidos na produção de metabólitos secundários e na capacidade que alguns endófitos possuem, em produzir as mesmas substâncias, produzidas pela planta hospedeira (ALY *et al.*, 2010; 2011; TAN; ZOU, 2001).

De acordo com Nisa *et al.* (2015), um grande número de metabólitos secundários bioativos de fungos endofíticos foram extraídos e caracterizados ao longo de 12 anos, e os isolados pertencem a diversos grupos estruturais, como alcaloides, esteróides, terpenóides entre outros. Conferindo a estes, inúmeras atividades farmacológicas, como por exemplo, anticancerígenos, antioxidantes, antivirais, imunossupressores, anti-inflamatórias. Sendo considerados uma importante fonte de produtos naturais com valor terapêutico. A tabela 1 apresenta alguns exemplos de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais e suas atividades biológicas.

Tabela 1- Exemplos de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais e suas atividades biológicas

<u>Planta medicinal</u>	<u>Fungo endofítico</u>	<u>Atividade biológica</u>	<u>Referências</u>
<i>Erythrina crista-galli</i>	<i>Phomopsis spp.</i>	Antifúngico, antibacteriano, antiinflamatório e citotóxico	WEBER <i>et al.</i> (2004)
<i>Podophyllum Hexandrum</i>	<i>Trametes hirsuta</i>	Antioxidante, antitumoral e radioprotetor	PURI <i>et al.</i> (2006)
<i>Murraya Paniculata</i>	<i>Eupenicillium spp</i>	Inseticida	(PROENÇA BARROS; RODRIGUES-FILHO, 2005)
<i>Niphates olemda</i>	<i>Curvularia lunata</i>	Ativo contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Cladosporium herbarum</i>	JADULCO <i>et al.</i> (2002)
<i>Terminalia Morobensis</i>	<i>Pestalotiopsis Microspora</i>	Efeito antimicrobiano e antioxidante	HARPER <i>et al.</i> (2003)
<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Rhizoctonia sp</i>	Ativo contra <i>Helicobacter pylori</i>	MA <i>et al.</i> (2004)
<i>Grevillea Pteridifolia</i>	<i>Streptomyces NRRI 30566</i>	Amplo espectro e atividade antibiótica, especialmente contra o bactérias Gram +, atividade contra o parasita da malária.	(CASTILLO <i>et al.</i> (2003)

Fonte: A autora (2022).

A aplicabilidade destes metabólitos na indústria farmacêutica, alimentícia e na agricultura, aliado ao baixo custo de produção e a facilidade de manipulação das variáveis de cultivo, visando a otimização e produção destes metabólitos em escala industrial, tem motivado pesquisadores, a aprofundarem seus estudos sobre estes microrganismos (DEZAM *et al.*, 2017). O estudo sobre as relações entre fungos e

plantas e as substâncias produzidas por estas associações, se tornam importantes, pois através da compreensão desses processos bioquímicos, poderemos compreender e otimizar a utilização destes metabólitos secundários, para obtenção de produtos naturais através de seu potencial biológico.

3.2.1 Fungos endofíticos isoladas de *E. Oleracea*

Observando o grande potencial farmacológico da *E. oleracea*, a crescente utilização desta espécie em pesquisas no país e no mundo e, levando em consideração, os diversos estudos demonstrando que as plantas medicinais representam um promissor reservatório de fungos endofíticos, justifica o interesse em realizar estudos direcionados aos fungos endofíticos da espécie *E. oleracea*.

As plantas do gênero *Euterpe* são amplamente estudadas (GALOTTA; BOAVENTURA, 2005; LIMA *et al.*, 2012; SANTAMARINA *et al.*, 2018). No entanto, pesquisas sobre fungos endofíticos associados ao gênero *Euterpe* são escassas (BATISTA; RAPOSO, SILVA, 2018; GARBIN *et al.*, 2019; RAIANA *et al.*, 2020), principalmente relacionados a espécie *E. oleracea*. Estudos utilizando o extrato e o óleo, estão sendo divulgados, porém, poucos trabalhos exploram os microrganismos endofíticos desta planta e o seu potencial biotecnológico.

Os estudos relacionados explicam que o primeiro registro de endófitos no açaizeiro, foi descrito por Rodrigues (1991) e, houve uma maior ocorrência de fungos endofíticos dentro da folha, com predominância de fungos da família *Xylariaceae* e do gênero *Letendraea*. Em outro estudo realizado por Rodrigues (1994), um levantamento dos endófitos fúngicos em folhas de árvores e mudas de *E. oleracea* foram monitoradas durante dois anos, sendo isoladas 57 espécies e 6 táxons familiares atribuídos principalmente à *Ascomycotina* e *Deuteromycotina*. Nestes estudos não foram realizados testes quanto a atividade biológica, apenas o isolamento e identificação dos endófitos.

Dentre os fungos endofíticos isolados desta espécie vegetal, foi selecionado para o estudo, o fungo endofítico identificado com o gênero *Neocosmospora ferrugineum* isolado dos frutos da *E. oleracea*, devido as suas características organolépticas. O odor adocicado e agradável exalado por este gênero, chamou a atenção. A literatura relata que fungos endofíticos são conhecidos como produtores de metabólitos voláteis. A maioria destes compostos possuem odores característicos,

que despertam o interesse, visto que, compostos fúngicos voláteis, exibem potenciais aplicações biotecnológicas importantes para vários setores, como o agrícola, da indústria e farmacêutico (BUCHBAUER, 2011; ROY; BANERJEE, 2019).

Portanto, pesquisas com fungos endofíticos isolados da planta medicinal *E. oleracea* devem ser estimuladas devido seu grande potencial já relatado. Nesse contexto, a união do conhecimento tradicional popular, muito presente na Amazônia brasileira, com o conhecimento científico sobre as propriedades terapêuticas da planta, bem como, o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos, podem ser utilizados para a descoberta de moléculas bioativas, conhecidas ou inéditas, que possivelmente possam vir a ser utilizadas para o benefício da população.

3.2.2 Fungos endofíticos: fonte de moléculas anti-inflamatórias

Pesquisas recentes na literatura mostram inúmeros compostos farmacologicamente ativos de endófitos fúngicos de plantas medicinais, inclusive compostos com atividade anti-inflamatória (ZHANG *et al.*, 2018; KHAYAT *et al.*, 2019; PAL; SHAIK, BEGUM, 2020;).

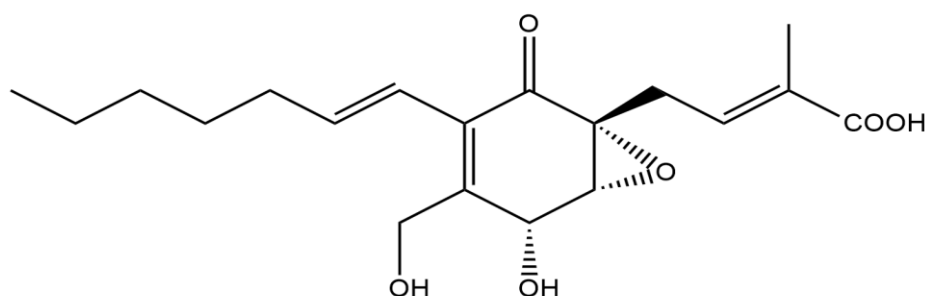
Estudos realizados por Zhang *et al.* (2017), relataram a ação anti-inflamatória neural de três novos metabólitos, da classe do Terpenos, os sesquiterpenóides, que foram isolados do fungo endofítico *Trichoderma sp.* Xy24, de plantas de mangue. Os compostos foram testados quanto à atividade anti-inflamatória neural monitorando a produção de óxido nítrico (NO) induzida por Lipopolissacarídeo LPS, em células BV2 de micróglia de camundongo, utilizando a curcumina como controle positivo. Dois compostos apresentaram atividade anti-inflamatória neural, com elevadas taxas de inibição de marcadores inflamatórios, mostrando-se mais eficazes que a curcumina.

Um estudo conduzido por Zhang *et al.* (2018), estudou sobre os efeitos anti-inflamatórios do ácido ambuico (Figura 4A). Este ácido orgânico, isolado do fungo endofítico *Pestalotiopsis sp.*, apresentou significativo efeito anti-inflamatório, contra a superprodução de NO induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Sabe-se que a superprodução de NO induzida por LPS, promove uma reação inflamatória, e os inibidores de NO podem ser usados como eficientes agentes anti-inflamatórios.

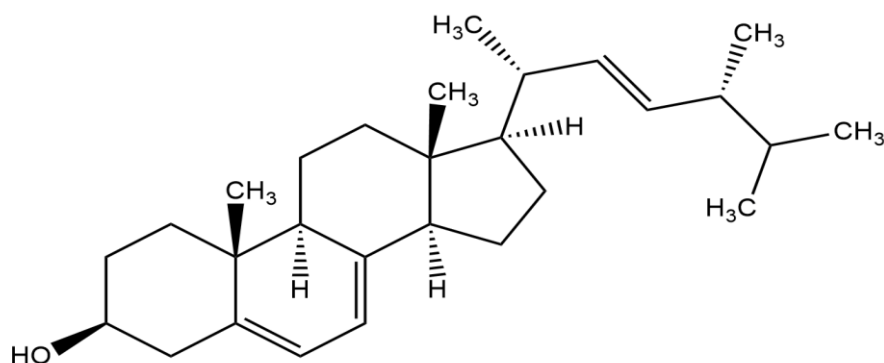
Khayat *et al.* (2019) extraíram e caracterizaram três novos derivados do ergosterol (Figura 4B) e dois metabólitos conhecidos, do fungo endofítico *Fusarium sp.*, isolado das raízes da *Mentha longifolia L. (Labiatae)*. Alguns estudos (IVANOVA

et al., 2013; KOBORI *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2013; YASUKAWA *et al.*, 1994), já demonstraram o potencial anti-inflamatório do ergosterol e seus derivados. Todos os metabólitos foram testados quanto a atividade inibitória da enzima inflamatória 5-LOX. A inibição desta enzima, bloqueia a superprodução dos leucotrienos; estes mediadores participam dos processos de inflamação aguda, aumentando a permeabilidade vascular, e conseqüentemente favorecendo a ocorrência do edema no local afetado. Neste estudo, todos os compostos apresentaram atividade inibitória em relação a enzima 5-LOX.

(A)



(B)



(C)

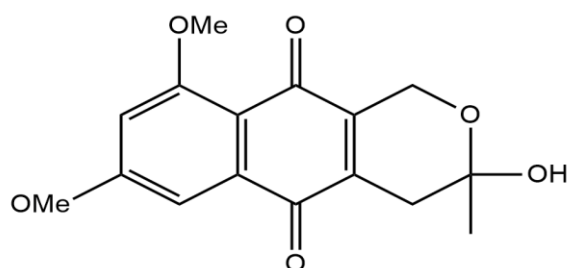


Figura 4 – Moléculas bioativas anti-inflamatórias isoladas de endofíticos. (A) ácido ambuico, (B) ergosterol e (C) herbarina
Fonte: A autora (2022).

Pal, Shaik e Begum (2020) reuniram e estruturam diversos estudos com moléculas bioativas anti-inflamatórias oriundas de endofíticos, sendo classificadas de acordo com o grupo químico do metabólito secundário, compilando um total de 118 compostos e 6 extratos com atividades contra um total de 16 alvos, principalmente NO, TNF- α e ROS (espécies reativas de oxigênio). O estudo destaca a ação de moléculas como a herbarina (Figura 4C), a periconianona A e a periconianona B sendo apontadas como os compostos mais potentes.

É preciso ressaltar a importância do estudo e pesquisas sobre a atividade anti-inflamatória de fungos endofíticos. Compreende-se que a região amazônica, abriga uma das mais ricas biodiversidades do mundo, podendo contribuir para o conhecimento e descoberta de novos produtos com esta atividade biológica.

3.3 INFLAMAÇÃO

3.3.1 Definição e importância

A inflamação é um processo biológico e dinâmico, considerada a primeira linha de defesa do organismo contra agentes nocivos exógenos (agentes infecciosos, físicos ou químicos) e endógenos (imunológicos, neurológicos) (RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010). Além de ser conhecida como uma função do sistema imunológico inato, é caracterizada por uma complexa cascata de eventos fisiológicos, que envolve inúmeras células, vasos sanguíneos, proteínas e mediadores, cujo objetivo é conter e isolar o agente agressor, a fim de minimizar e neutralizar o avanço do processo inflamatório, como também, estimular processos de reparo (KUMAR; ABBAS, ASTER, 2013).

Todo o processo inflamatório, de um modo geral, é desencadeado através de mediadores químicos. Este processo é iniciado por uma fase aguda, na qual agentes inflamatórios induzem uma resposta orgânica; e células imunológicas (células de defesa e moléculas circulantes do plasma ou residentes das paredes vasculares) promovem a liberação, ativação ou síntese dos mediadores químicos, que desencadeiam os eventos vasculares e celulares característicos da inflamação aguda (FELIN; FELIN, 2009).

A resposta inflamatória tem particular importância fisiológica, pois é um dos parâmetros fundamentais, que afetam o equilíbrio dinâmico entre a saúde e a doença (LORDAN; TSOUPRAS, ZABETAKIS, 2019). Geralmente é considerada benéfica ao organismo. A ausência ou insuficiência desta resposta, resultaria em infecções descontroladas, órgãos danificados permanentemente e feridas sem cicatrização. Uma resposta inflamatória exacerbada e prolongada, pode ser potencialmente lesiva, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento de várias doenças crônicas, como câncer, artrite reumatoide, doença de Crohn, colite, aterosclerose, doenças inflamatórias pulmonares. Portanto, a fim de proteger as funções do organismo, é fundamental a atenuação adequada da resposta inflamatória (BECHARA; SZABÓ, 2006; FLEIT, 2014).

A importância do processo inflamatório pôde ser evidenciada, nos últimos dois anos, a partir do advento da pandemia da Covid-19. A resposta inflamatória desencadeada pela infecção pelo SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, estimula a produção excessiva de citocinas inflamatórias, ocasionando intenso dano tecidual e celular, inflamação pulmonar e sistêmica; levando a quadros de pneumonia viral letal, sepse viral e síndrome respiratória aguda severa. Além de contribuir para incidência de prováveis complicações hepáticas, cardiovasculares e neurais (DE ALMEIDA *et al.*, 2020).

3.3.2 Inflamação aguda

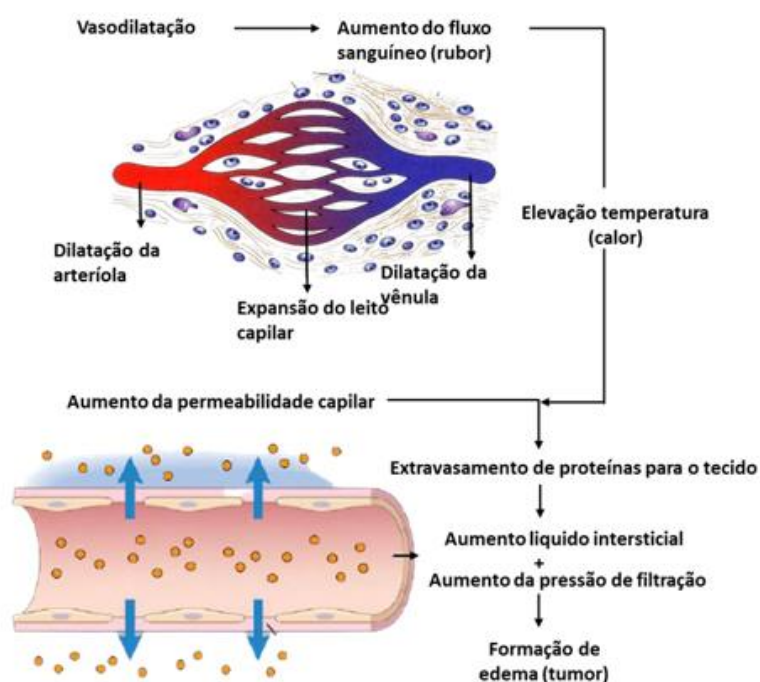
A resposta inflamatória pode ser classificada em duas fases. A primeira fase, denomina-se fase aguda, geralmente é de curta duração e benéfica ao organismo, e a segunda, a fase crônica, apresenta longa duração e ocorre frequentemente no caso de doenças crônicas e complexas (ASHLEY; WEIL, NELSON, 2012).

As reações inflamatórias agudas podem ser iniciadas por diversos agentes inflamatórios, que são divididos em grupos conforme a natureza do agente. Assim, têm-se os agentes biológicos, englobando bactérias, vírus, protozoários; agentes químicos e irritantes, como ácidos; agentes físicos que causam traumas, cortes, queimaduras; e agentes imunes, que provocam reações de hipersensibilidade a substâncias ambientais ou contra o próprio organismo (ALLER *et al.*, 2007).

O desenvolvimento da fase aguda caracteriza-se pela ocorrência de eventos vasculares e celulares, que induzem a uma resposta local, com o aparecimento dos

cinco sinais clínicos da inflamação (rubor, calor, edema e dor), e a uma resposta inflamatória sistêmica, onde ocorre um aumento na produção de leucócitos e alterações nos níveis de diversas proteínas plasmáticas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os principais eventos vasculares da inflamação iniciam imediatamente após a lesão e envolvem basicamente a microcirculação, são eles a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular (figura 5). A vasodilatação das pequenas arteríolas, seguido do aumento do fluxo sanguíneo (rubor), resulta na elevação da temperatura corporal (calor), promovendo assim, o aumento da permeabilidade capilar, que consequentemente, ocasiona o extravasamento de proteínas para o tecido, aumentando o líquido intersticial local, o qual, somado ao aumento da pressão de filtração, leva a formação de edema (tumor) (RANG; DALE, RITTER, 2001). Os mediadores responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular durante o processo inflamatório são a histamina, serotonina, bradicinina, as prostaglandinas (série E) e as prostaciclina (MONCADA; PALMER, HIGGS, 1991).



O aumento da permeabilidade vascular é observado clinicamente sob a forma de edema.

Figura 5 - Sequência de eventos vasculares no desenvolvimento da inflamação aguda
Fonte: A autora (2022).

Os eventos celulares da inflamação manifestam-se através de uma sequência de eventos, que tem por objetivo o recrutamento dos leucócitos, do compartimento vascular para o sítio inflamatório (figura 6). São seguidas pela marginação e rolagem

ao longo dos vasos, adesão ao endotélio, transmigração entre as células endoteliais e migração de células fagocitárias para os tecidos, tais como, células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos residentes, leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, e principalmente neutrófilos, que locomovem-se direcionados através dos gradientes de substâncias quimiotáticas (BEVILACQUA *et al.*, 1989; RANG; DALE, RITTER, 2001; SMITH *et al.*, 1988, 1991).

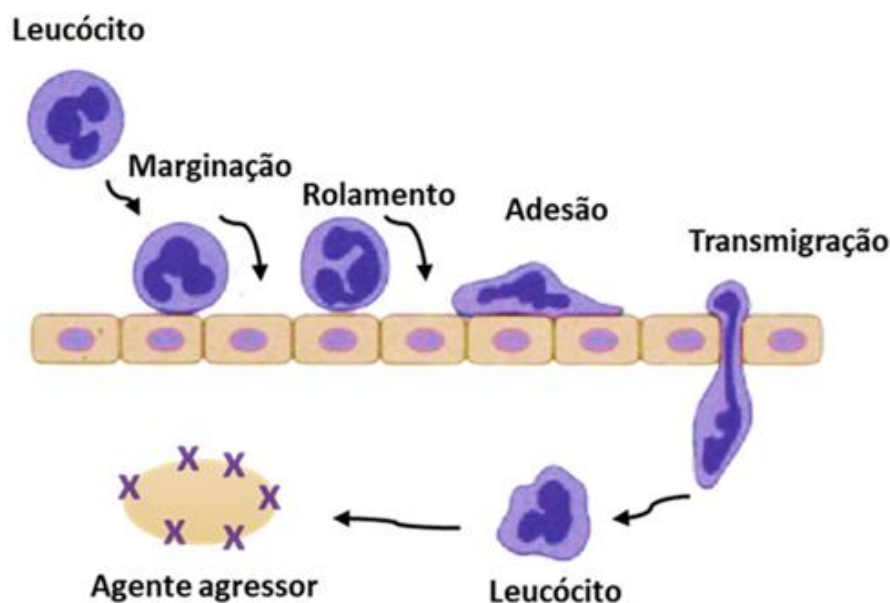


Figura 6 - Sequência de eventos celulares no desenvolvimento da inflamação aguda.
Fonte: A autora (2022).

3.3.3 Desenvolvimento do processo inflamatório

O processo inflamatório inicia quando os agentes inflamatórios interagem com os receptores de superfície celular (TLRs). Esta é uma questão fundamental pois está relacionada à ativação da resposta do hospedeiro. Os TLRs reconhecem os sinais moleculares de diversos tipos de patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (TAKEDA; KAISHO, AKIRA, 2003).

Esses receptores desempenham um papel fundamental na defesa contra agentes invasores (REN *et al.*, 2017). Os TLRs são divididos em dois subgrupos, onde aqueles que são expressos na superfície celular (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR-11) reconhecem lipídeos, lipoproteínas e proteínas, que compõem a membrana microbiana. O outro grupo (TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9) que são expressos exclusivamente em vesículas intracelulares, reconhecem ácidos nucleicos microbianos (MONTERO, 2011). A ativação dos TLRs pelos PAMPs, resulta na

liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandina E2 (PGE2), e interleucina-1 (IL- β), óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF- α) que exerceram o controle sobre a cascata inflamatória (KIM *et al.*, 2013).

Em uma lesão tecidual, os mastócitos espalhados pelo tecido conjuntivo, estrategicamente localizados adjacentes aos vasos sanguíneos, secretam substâncias químicas (selectinas, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos), que promovem a ativação e migração de leucócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) aumentando o volume de células na área lesionada, principalmente os neutrófilos e macrófagos (SEO *et al.*, 2016). Os mastócitos são essenciais na iniciação da resposta inflamatória, devido a liberação de ampla variedade de mediadores pró-inflamatórios, principalmente a histamina que produz a vasodilatação venular e o fator de agregação plaquetária (PAF) que promove a adesão leucocitária dependente de CD18 (BOCHSLER; SLAUSON, 2002).

Os neutrófilos no foco da inflamação permanecem ativados, devido a ação de citocinas secretadas por células do tecido residente para eliminação do agente invasor, como também, pelo contato direto com o microrganismo, esta ativação, promove a liberação do conteúdo dos seus grânulos tóxicos, composto por espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (ERN), proteinase, catepsina G e elastase, que promovem a degradação dos patógenos. Os neutrófilos também podem removê-los por fagocitose (SAGNIA *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2016).

Os macrófagos igualmente estimulam a resposta aguda através da liberação de mediadores como Fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), que em conjunto atuam na ativação do endotélio, para expressão das moléculas de adesão (E-selectinas e P-selectinas), a fim de atrair células envolvidas no reparo tecidual (ABBAS; LICHTMAN, 2005; RANG; DALE, RITTER, 2001).

Tendo em vista o desenvolvimento do processo inflamatório e manifestação das alterações celulares e vasculares, as consequências da inflamação aguda podem resultar na resolução da inflamação (regeneração e reparo), na inflamação crônica e/ou cicatrização (KUMAR; ABBAS, ASTER, 2013). O processo de resolução, é um processo bioquímico e metabólico ativo, a qual, diversos mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos, sintetizados durante o processo, neutralizam e eliminam o agente agressor, normalizam a permeabilidade vascular, interrompem a infiltração leucocitária, realizam a apoptose dos neutrófilos presentes no sítio

inflamatório e removem fragmentos celulares através da fagocitose, objetivando a homeostase do tecido. Alguns mediadores envolvidos na resolução do processo inflamatório são as prostaglandinas ciclopentenonas, as lipoxinas, resolvinas, protectinas, NF-kB e mediadores da apoptose (BANNENBERG *et al*, 2005; SERHAN, 2007; SERHAN; CHIANG, 2008).

A transição da inflamação aguda para crônica é variável, por se tratar de um processo único, com fatores que estão interligados. Além disso, a natureza do estímulo inflamatório, a extensão da lesão tecidual e/ou a falha no processo de reparo, podem determinar o curso de sua evolução, para restauração da estrutura e função normal ou extensa destruição do tecido, resultando em cicatrização (BECHARA; SZABO, 2009; KUMAR; ABBAS, ASTER, 2013).

3.3.4 Mediadores químicos da inflamação

Os mediadores químicos ou reguladores da inflamação podem ser derivados de células ou de proteínas plasmáticas (figura 7). Os mediadores derivados de células, permanecem armazenados em grânulos intracelulares e são imediatamente liberados conforme ativação celular (mastócitos liberam histamina e serotonina), ou sintetizados localmente em resposta a um estímulo (leucócitos produzem prostaglandinas e citocinas) no sítio inflamatório (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Os mediadores derivados de proteínas plasmáticas (proteínas do complemento, cininas e da coagulação), são sintetizados pelo fígado, como precursores inativos, sendo ativados (clivagem proteolítica) no local da inflamação, para exercer suas atividades biológicas (BRASILEIRO FILHO, 2006; KUMAR; ABBAS, ASTER, 2013).

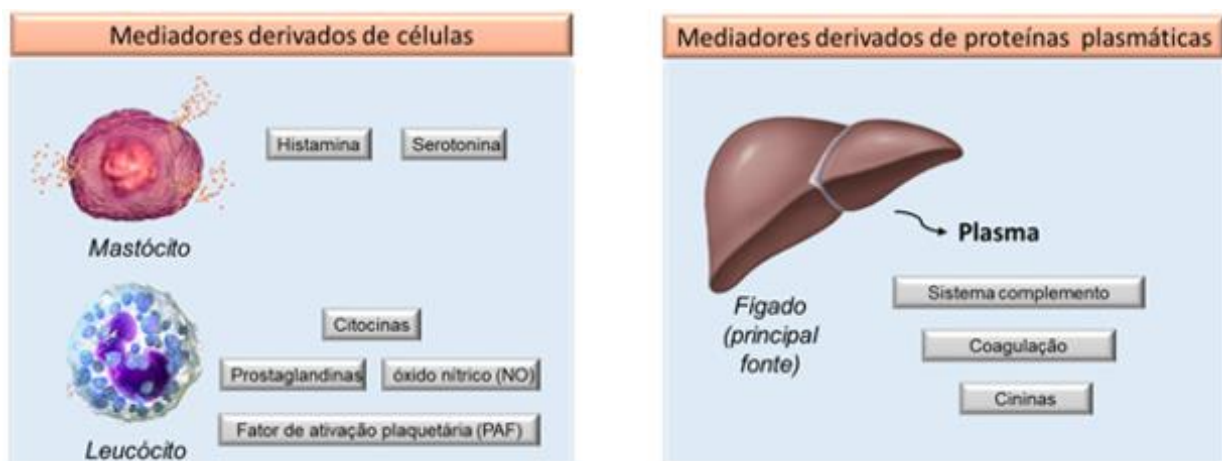


Figura 7 - Mediadores químicos ou reguladores da inflamação
 Fonte: A autora (2022).

Normalmente os mediadores apresentam as seguintes características: grande parte dos mediadores promovem suas ações por meio de ligações aos respectivos receptores específicos nas células-alvo, podendo atuar apenas em um ou em vários alvos; estes também podem desempenhar diversas funções, com diferentes efeitos; determinados mediadores, como proteases lisossômicas e ERO, além de não requerem ligação a receptores específicos, apresentam atividades tóxicas e/ou enzimáticas diretas; os efeitos sistêmicos são altamente regulados e de curta duração; após a ativação e liberação das células, os mediadores podem se degradar rapidamente (p. ex., os metabólitos do ácido araquidônico) ou serem inativados por enzimas (p. ex., a cininase inativa a bradicinina) ou completamente inibidos (proteínas inibidoras do complemento) (KUMAR; ABBAS, ASTER, 2013).

O grupo dos mediadores derivados de células, é representado principalmente, pelas aminas vasoativas, metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, fator de ativação plaquetária (PAF) e óxido nítrico (NO).

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, estão entre os primeiros mediadores a serem liberados nas reações inflamatórias agudas, ocasionam dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade das vênulas (OH *et al.*, 2015). Ambas encontram-se armazenadas em grânulos citoplasmáticos de diversas células. A histamina é pré formada e armazenada por diversos tipos celulares (basófilos e plaquetas sanguíneas) que circulam pelo plasma, e principalmente pelos mastócitos adjacentes aos vasos. Além de causar vasodilatação, é o principal mediador da fase imediata de aumento da permeabilidade vascular. A serotonina é encontrada principalmente nos grânulos das plaquetas, sua liberação ocorre durante a agregação

plaquetária, e é responsável por induzir vasoconstrição durante a coagulação. Vários fatores induzem a liberação desses mediadores, seja por lesão física, reações imunes (ligação de anticorpo IgE aos receptores Fc dos mastócitos), proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos; neuropeptídios (substância P) e as citocinas IL-1 e IL-8 (BRASILEIRO FILHO, 2006; GIORDANO; GERSTMANN, 2004; KASSUYA, 2013; OKUSE, 2007).

Os mediadores derivados do ácido araquidônico, também conhecidos como eicosanoides, são produtos do processamento do ácido araquidônico (AA), que normalmente compõem os fosfolipídios das membranas plasmáticas (figura 8). Diante de algum estímulo inflamatório, o AA liberado da membrana, por ação da enzima fosfolipase A2, sofre metabolização pelas vias das enzimas, cicloxigenases (COX-1 e COX-2) e lipoxigenases (LOX) (KHLOYA *et al.*, 2015). A COX-1 é constitutivamente expressa em vários tipos de células. A COX-2 é induzida por uma variedade de estímulos. Ambas convertem o ácido araquidônico, dois precursores: PGG2 e PGH2. As prostaglandinas isomerases convertem o PGH2 em diferentes prostaglandinas biologicamente ativas (PGD2, PGE2, PGF2 α , PGI2) e tromboxano (HATA; BREYER, 2004). A inibição da síntese de prostaglandinas mediante o bloqueio das duas isoformas de cicloxigenase, a COX-1 (constitutiva) e a COX-2 (induzida), é o principal mecanismo de ação de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES). As LOXs são responsáveis pela produção de leucotrienos os quais são quimioatraentes por efeitos vasculares (HUSAIN *et al.*, 2016). Os mediadores derivados do AA podem mediar praticamente cada etapa da inflamação. Sua síntese é aumentada nos locais da resposta inflamatória, e depois são destruídos por enzimas ou decompõem-se espontaneamente (HATA; BREYER, 2004; KUMAR; ABBAS, ASTER, 2013).

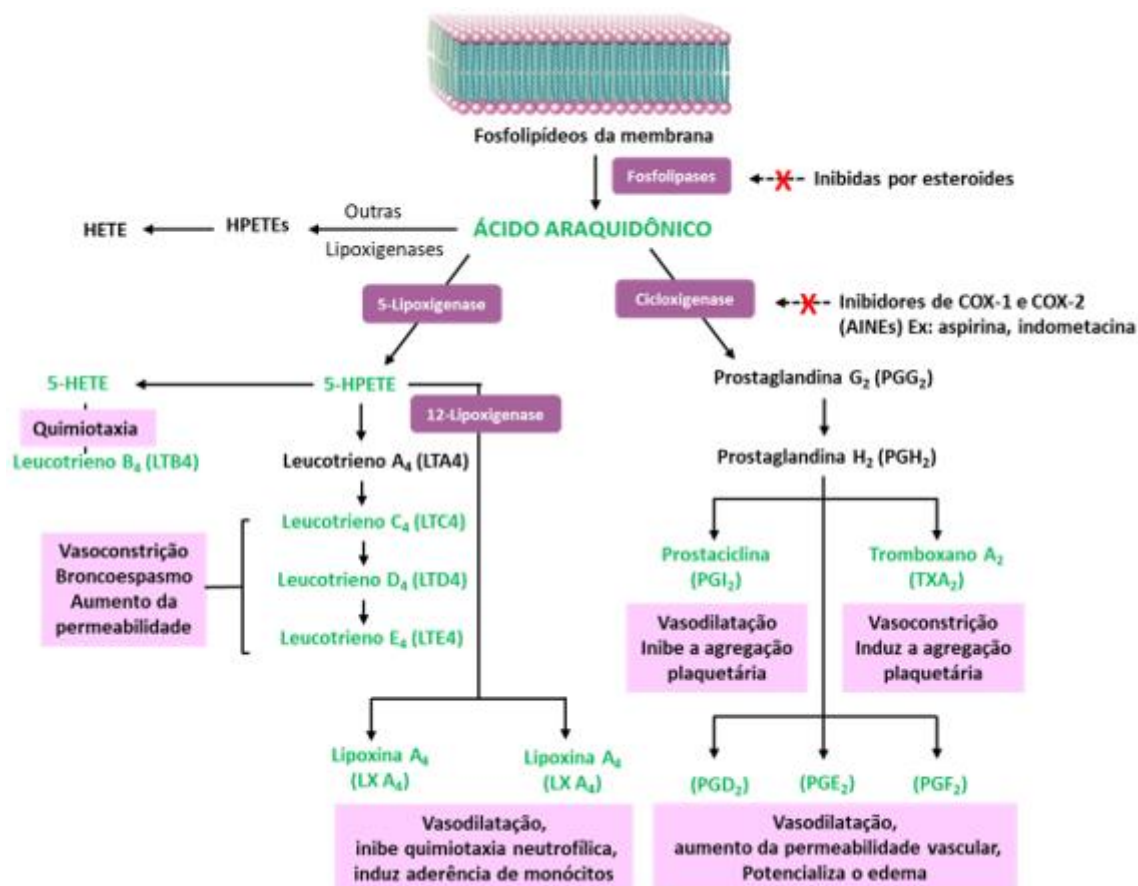


Figura 8 - Mediadores derivados do ácido araquidônico
 Fonte: A autora (2022).

Outro mediador derivado dos fosfolípidos, é o fator de ativação plaquetária (PAF), produzido a partir dos fosfolípidos das membranas de neutrófilos, monócitos, basófilos, células endoteliais e plaquetas, dentre outras, pela ação da enzima fosfolipase A2. Este mediador além de ser responsável pela agregação de plaquetas, é considerado um dos mais potentes fatores quimiotáticos *in vitro* e *in vivo* (para eosinófilos e neutrófilos), apresenta várias efeitos fisiológicos, dentre eles, vasoconstrição e broncoconstrição, aumento da permeabilidade (ISHII; SHIMIZU, 2000).

As principais citocinas na inflamação aguda são o fator de necrose tumoral (TNF- α), as interleucinas IL-1 e IL-6, e as quimiocinas (citocinas quimioatraentes). O TNF- α e a IL-1 são produzidos por macrófagos ativados, células endoteliais, mastócitos e outros tipos celulares. Correspondem as citocinas que medeiam a inflamação através da ativação endotelial. Além disso, estimulam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, ocasionando aumento no recrutamento de leucócitos e aumento da produção de citocinas adicionais, principalmente

quimiocinas. Apesar de serem sintetizados no local da inflamação, principalmente por macrófagos, o TNF e a IL-1, podem entrar na circulação e atuar em locais diferentes, promovendo a reação de fase aguda sistêmica, frequentemente relacionada a infecções e doenças inflamatórias (KUMAR; ABBAS, ASTER, 2013; KUNDU; SURH, 2008).

O NO é um mediador gasoso, produzido por diversas células sendo capaz de mediar uma variedade de funções no organismo. Nas reações inflamatórias, os macrófagos utilizam o NO como agente citotóxico, para destruir microorganismos invasores e células tumorais; quando produzido pelas células endoteliais, causa relaxamento do músculo liso e vasodilatação. Por outro lado, o NO desempenha outros papéis na inflamação, como relaxamento do músculo liso vascular, antagonismo a todos os estágios da ativação plaquetária (adesão, agregação e desgranulação) e redução do recrutamento de leucócitos para os locais inflamatórios. Existem três isoformas de NO[·] caracterizadas: NOS neuronal (tipo I), constitutivamente expressa em neurônios, cérebro e SNC, e não possui papel expressivo na inflamação. NOS induzível (tipo II) (iNOS) é induzida por várias citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, TNF, IFN- γ , endotoxinas bacterianas e LPS. Presente nos macrófagos e células endoteliais, é responsável pela produção de NO nas reações inflamatórias. NOS endotelial (tipo III), é uma NOS sintetizada constitutivamente e expressada nas células endoteliais vasculares em condições basais (FORSTERMANN *et al.*, 1994; KUBES *et al.*, 1993; LOWENSTEIN; SNYDER, 1992).

Nos mediadores derivados de proteínas plasmáticas, as proteínas plasmáticas circulante dos sistemas de complemento, das cininas e da coagulação além de estarem inter-relacionados, estão envolvidos em vários aspectos da resposta inflamatória aguda. Os fatores derivados do complemento, C3a, C4a, e C5a, atuam nos eventos vasculares: (1) aumentando a permeabilidade vascular e causando vasodilatação, induzindo os mastócitos a liberarem histamina; (2) ativam a via da lipoxigenase do metabolismo do AA, em neutrófilos e macrófagos, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios; (3) ativação, adesão e quimiotaxia dos leucócitos; (4) favorecem a fagocitose por neutrófilos e macrófagos (KUMAR; ABBAS, ASTER, 2013).

3.4 MODELO EXPERIMENTAL: ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

A espécie *Danio rerio* (HAMILTON, 1822), conhecida popularmente como peixe-zebra ou *zebrafish*, é um pequeno peixe tropical de água doce que vive na Índia e no sul da Ásia, mede aproximadamente de 2-4 cm, podendo chegar até 5cm (Figura 9) (D'ALENÇON *et al.*, 2010). Há registros do primeiro artigo publicado sobre este vertebrado em 1955. No entanto, um artigo publicado em 1981, pelo biólogo George Streisinger, da Universidade de Oregon, nos Estados Unidos, alavancou a utilização do *zebrafish* nas pesquisas científicas. Desde então, ocorreu um aumento nas produções científicas com este modelo a nível mundial e a nível nacional a partir de 1966 (GHENO, 2015)



Figura 9 - *Zebrafish* adulto (*Danio rerio*)
Fonte: A Autora. 2021.

Ao longo dos anos, tornou-se importante modelo experimental para avaliações biomédicas, devido às suas vantagens que incluem, alta similaridade genética e fisiológica com humanos (70%), o pequeno tamanho, transparência óptica e rápido desenvolvimento, sendo utilizados em estudos relacionados à genética, embriologia,

desenvolvimento celular, toxicidade, angiogênese, apoptose, imunologia, entre outros (CORDERO-MALDONADO *et al.*, 2013; CRAWFORD *et al.*, 2011).

Embriões de *zebrafish* exibem características singulares, como por exemplo, um corpo transparente, que permite visualizar toda a sua anatomia e evolução durante seus estágios de desenvolvimento, favorecendo estudos de toxicidade aguda e reprodutiva (GHENO 2015; PARNG *et al.*, 2002). Possuem um tamanho pequeno, ciclo de vida curto, e devido a sua alta taxa de fecundidade, podendo produzir até 100 ovos/dia, favorece sua produção e análise em um período de tempo menor quando comparado aos ratos. É importante ressaltar também o baixo custo de manutenção em laboratório. Por todas essas razões, este pequeno animal, vem sendo considerado um modelo ideal na triagem e avaliação em novos medicamentos (CARVALHO *et al.* 2018). Segundo Cordero-Maldonado *et al.* (2013), na última década, o *zebrafish*, tornou-se um importante modelo para avaliação e testes de drogas. Incluído também em estudos relacionados a genética, embriologia, desenvolvimento celular, toxicidade, angiogênese, apoptose, imunologia, entre outros.

A utilização do *zebrafish*, como um modelo *in vivo* para estudar inflamação, tornou-se uma excelente estratégia para a identificação de novos compostos. O estudo de drogas anti-inflamatórias utilizando modelos como roedores, enfrenta algumas desvantagens. A dosagem necessária para os testes, são baseadas em cálculos; onde a quantidade de composto utilizada é calculada por grama de peso corporal do animal; e a quantidade dos compostos derivados de produtos naturais, dependendo do método de extração e da quantidade de matéria prima utilizada, pode fornecer uma fração ínfima de composto (CORDERO-MALDONADO *et al.*, 2013).

Diante do exposto a utilização do *zebrafish* como modelo experimental seria o mais adequado. Visto que, o seu pequeno tamanho e o seu baixo peso corporal favorecem a utilização de uma quantidade menor de composto para os testes, exigindo apenas microgramas de cada extrato, fração ou composto a ser testado. Sendo um dos principais fatores que influenciaram na escolha do *zebrafish* para desenvolvimento de novas moléculas com ação anti-inflamatória.

3.4.1 *Zebrafish* adulto como modelo experimental para avaliação de atividade anti-inflamatória de produtos naturais

O desenvolvimento de novos fármacos seguros e eficazes para o tratamento de doenças inflamatórias depende da existência de modelos experimentais

adequados, a fim de estabelecer a eficácia e mecanismo de ação. E embora a maioria das doenças inflamatórias severas e debilitantes sejam de natureza crônica, modelos inflamatórios agudos são importantes para a descoberta e triagem de novas drogas (PATIL *et al.*, 2019; SEDGWICK; LEES, 1986).

Nesse sentido, modelos agudos de inflamação em *zebrafish* (*Danio rerio*) estão bem estabelecidos (ZANANDREA; BONAN, CAMPOS, 2020). Nos últimos anos, além de ser considerado como um modelo ideal para estudar a fisiopatologia de doenças relacionadas à inflamação humana, por apresentar um sistema imunológico complexo com características de mamíferos e, uma série de mediadores e receptores inflamatórios que são subjacentes às respostas inflamatórias (ZANANDREA; BONAN, CAMPOS, 2020), diversos protocolos de inflamação foram desenvolvidos em *zebrafish* (CAMPOS-SÁNCHEZ; ESTEBAN, 2021; D'ALENÇON *et al.*, 2010; SIVAMANI *et al.*, 2014; XIE; MEIJER, SCHAAF, 2021), como a indução de edema abdominal por carragenina (HUANG *et al.*, 2014).

Huang *et al.* (2014) validaram um novo protocolo de inflamação, utilizando o *zebrafish* na sua fase adulta. Neste modelo, a resposta inflamatória é induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina, e formação de edema na região abdominal (Figura 10) como resultado da regulação das proteínas pró-inflamatórias e do acúmulo de células no sítio inflamatório. Além disso, foi relatado que após a injeção da carragenina no peritônio dos animais, ocorreu a liberação de vários mediadores inflamatórios (TNF- α e iNOS), e que medicamentos anti-inflamatórios clinicamente eficazes, foram capazes de inibir a resposta inflamatória causada pela carragenina em *zebrafish* adulto (HUANG *et al.*, 2014).

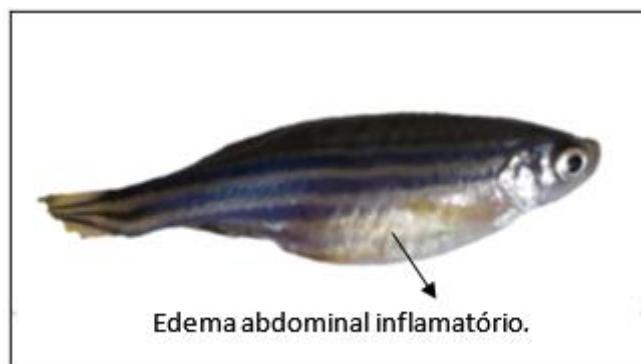


Figura 10 – Edema abdominal em *zebrafish* induzido por carragenina
Fonte: A autora (2022).

Nos últimos anos, diversos autores demonstraram que o *zebrafish* adulto é um modelo ideal para avaliar a ação anti-inflamatória de compostos naturais. Ao avaliar o efeito do veneno de *Bothrops alternatus*, que induz reações inflamatórias, como acúmulo de leucócitos, liberação de mediadores endógenos, aumento dos níveis séricos de várias citocinas e NO em *zebrafish* adulto, Carvalho *et al.* (2018) além de demonstrarem a utilidade deste modelo animal para estudar o efeitos da exposição ao veneno de cobra, também relataram que a dexametasona, um glicocorticoide, reduziu significativamente os danos causados pelo veneno, sugerindo que o *zebrafish* pode ser útil para a triagem de novas drogas que possam atenuar os danos inflamatórios causados por picadas de cobras.

Ekambaram, Perumal e Pavadai (2017) utilizaram *zebrafish* adulto como modelo experimental, para avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de *Naravelia zeylanica* (L) (ENZ), através do teste de edema abdominal induzido por carragenina. Os animais tratados com ENZ não mostraram nenhuma evidência de inflamação, indicando o efeito anti-inflamatório de ENZ.

Borges *et al.* (2018) ao avaliarem o efeito anti-inflamatório de nanoemulsões contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L, também utilizaram o *zebrafish* adulto como modelo experimental. Neste estudo, o tratamento com a nanoemulsão demonstrou efeito anti-inflamatório sobre o edema abdominal induzido por carragenina.

Quitian-Useche *et al.* (2021), na avaliação da atividade anti-inflamatória de amidas graxas obtidas do óleo de *Bertholletia excelsa*, através do edema abdominal induzido pelo agente inflamatório carragenina, do mesmo modo, empregaram o *zebrafish* adulto como modelo experimental. As amidas graxas foram tão eficientes quanto o fármaco padrão Indometacina, na inibição do edema causadas pela injeção de carragenina intraperitoneal.

3.4.2 Métodos de avaliação da atividade anti-inflamatória

A utilização de agentes inflamatórios, como carragenina, dextrana, histamina, prostaglandinas, entre outros, em ensaios de inflamação aguda permitem avaliar a ação anti-inflamatória de diferentes substâncias e/ou extratos (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2021).

A carragenina, é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas, que induz uma resposta inflamatória caracterizada por diferentes fases, com a presença de infiltrado celular com diferentes tipos celulares. A primeira fase, que ocorre nos primeiros 60 minutos (min) após a injeção de carragenina, ocorre a liberação de histamina e serotonina. Na segunda fase (61-120min), ocorre a liberação de quininas predominantemente, como a bradisinina, e na terceira fase (121-180min) ocorre a liberação principalmente de prostaglandina. Conforme descrito anteriormente, seu uso como agente inflamatório, para induzir edema abdominal em *zebrafish* adulto está estabelecido e validado (Figura 6).

A dextrana é um agente inflamatório amplamente utilizado nos ensaios de inflamação aguda em roedores e, sendo um polissacarídeo de alto peso molecular, promove um edema osmótico e acelular, a partir da desgranulação dos mastócitos, liberando os mediadores inflamatórios histamina e serotonina, que agem sobre seus respectivos receptores (H1, H2 e 5-HT2), promovendo o aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de líquidos (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2021).

O dextran sulfato de sódio, ou DSS, é um polissacarídeo ramificado sulfatado sintético derivado de dextrana, que vem sendo utilizado para a indução de inflamação intestinal em larvas de *zebrafish*. Este modelo de inflamação por DSS tem sido empregado para avaliar o potencial terapêutico de diversas substâncias para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, como a colite e doença de Crohn (OEHLERS *et al.* 2012, 2013).

A histamina é um importante mediador químico inflamatório, responsável por diversos efeitos na inflamação aguda, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, formação de edema, contração do músculo liso (THURMOND; GELFAND, DUNFORD, 2008).

A prostaglandina E2 apresenta potente atividade vasodilatadora, liberada tanto por células residentes quanto por estímulos inflamatórios, logo nas primeiras horas após o estímulo introduzido no organismo, tem papel fundamental na vasodilatação durante a formação do edema de pata induzido por carragenina (SOLOMON; JUHLIN, KIRSCHENBAUM, 1968; CLAUDINO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A inflamação induzida pelo agente inflamatório dextrana e pelos mediadores histamina e prostaglandina, no ensaio de edema de pata utilizando roedores, é um modelo estabelecido e validado para estudar processos inflamatórios (GUEDES *et al.*,

2020; PERIANAYAGAM; SHARMA, 2006; TAMADDONFARD; FARSHID, HOSSEINI, 2012), contudo, a utilização destes, em ensaio de indução de edema abdominal em modelo *zebrafish* adulto, ainda não havia sido relatado. Este é o primeiro estudo à utiliza-los em ensaio de indução de edema abdominal em modelo *zebrafish* adulto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Fungo endofítico

A cepa do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum*, utilizado nesta pesquisa foi cedida pelo Biorg - Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada da UNIFAP, Macapá, Amapá, local onde foi realizado o isolamento deste microrganismo a partir dos frutos de *E. oleracea*, coletada na cidade de Macapá.

4.1.2 Material vegetal e localização da coleta

As folhas, frutos e raízes de *E. oleracea* foram coletados na área do Campo Experimental do Cerrado da Embrapa Amapá, município de Macapá, Amapá, nas seguintes coordenadas geográficas: 00°22'55" de latitude norte e 51°01'40" latitude oeste, em outubro de 2018 (Figura 11).

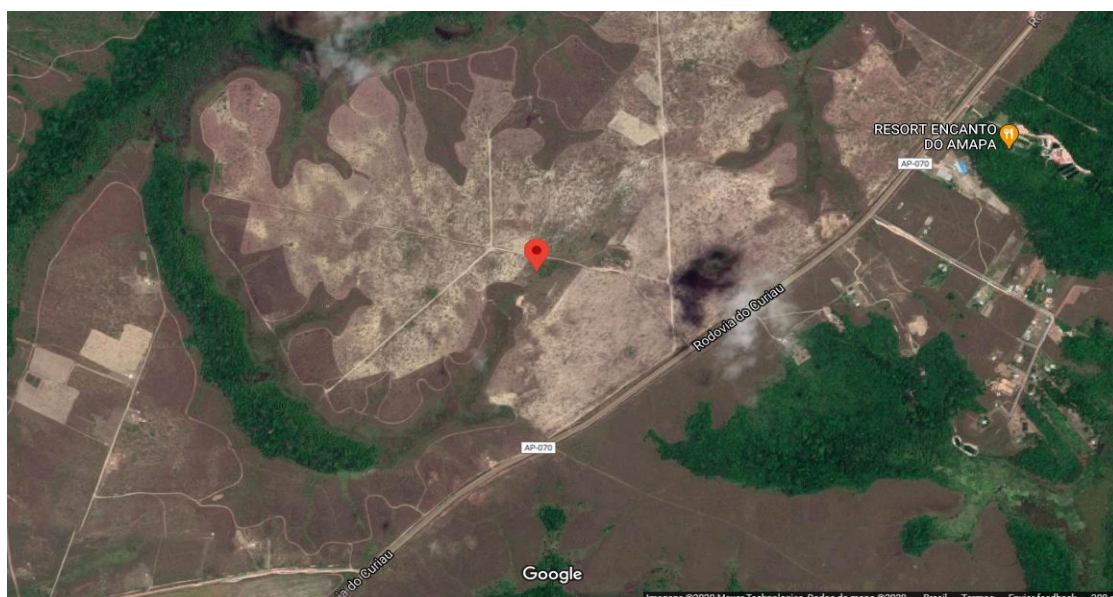


Figura 11 - Área de coleta na estação Experimental do Cerrado da Embrapa/Amapá, latitude norte 00 22 55" e 51 01 40" de latitude oeste
Fonte: Google Maps (2018).

As amostras frescas (folhas, frutos e raízes) foram organizadas, identificadas e armazenadas adequadamente no Laboratório Biorg (Figura 12), onde foi realizado o isolamento dos microrganismos endofíticos.



Figura 12 - Organização, identificação e armazenamento das amostras frescas de *E. oleracea* (folhas, frutos e raízes).

Fonte: Acervo particular, Sena (2018).

4.1.3 Isolamento das colônias de microrganismos endofíticos

Para o isolamento dos microrganismos endofíticos, primeiramente foi realizado a desinfecção superficial e retirada de possíveis microrganismos epifíticos das amostras coletadas, conforme descrito por Pereira *et al.* (1993). Folhas, frutos e raízes de *E. oleraceae* foram lavadas com água corrente e detergente neutro. Logo depois, em câmara asséptica, foram submetidos a uma sequência de desinfecção com álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 2 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos para retirada do excesso de hipoclorito. Após este processo, o material vegetal foi lavado com água destilada e transferido para placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada e incubados em B.O.D (Lucadema, São José do Rio Preto-SP, Brasil) a uma temperatura de 28°C e observados diariamente até o desenvolvimento de colônias, este procedimento de inoculação inicial foi realizado segundo Araújo *et al.* (2010) com adaptações.

Uma vez detectado o crescimento de hifas, estas foram transferidas para o meio sólido de Malte 2% e Ágar 2% com pH 6, incubadas nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo. Este processo foi repetido sucessivamente, até a obtenção das colônias isoladas e purificadas (Figura 13). Toda manipulação microbiológica do fungo utilizado foi realizada no interior da capela de Fluxo laminar (Veco, Campinas-SP, Brasil) com desinfecção prévia de toda a parte interna do fluxo com álcool 70%, seguido de luz ultravioleta (UV 364 nm) por 15min.

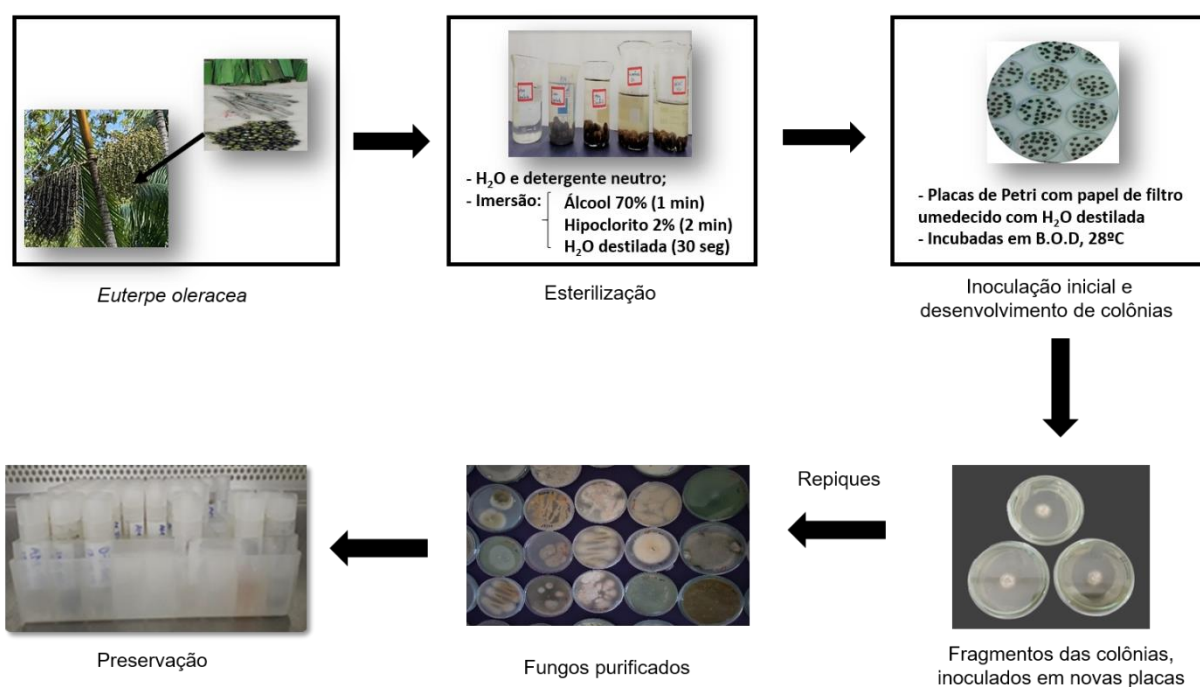


Figura 13 - Etapas de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos.

Fonte: Adaptado de Chapla. Biasetto e Araujo (2013).

4.1.3.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos fungos isolados e purificados consistiu na observação das estruturas macroscópicas do micélio do fungo, como sua coloração e também a observação de estruturas microscópicas, como estruturas de reprodução e esporos, e por meio do uso de chaves e manuais de identificação, de acordo com o grupo taxonômico e exame microscópico, usando microscopia de luz (Olympus BX41-Micronal). Os fungos foram identificados a nível de gênero (STOYKE et al., 1992).

4.1.3.2 Preservação das colônias puras dos microorganismos endofíticos

Este procedimento teve como objetivo a preservação das cultura puras dos fungos, para repiques posteriores, testes preliminares e cultivos em meio de cultura sólido para obtenção do extrato bruto (Figura 9).

Os fungos endofíticos foram cultivados em meio de cultura sólido batata-dextrose-ágar (BDA) em placas de Petri de 90 x15mm, em triplicata. Para isto, o meio de cultura BDA foi preparado e esterilizado em autoclave por 20min (121°C, 1,5 kPa). Após o resfriamento à temperatura ambiente, aproximadamente 25mL do meio de cultura líquido foram vertidos nas placas, em seguida mantidos em estufa a 32°C durante 24 horas para a posterior detecção de eventuais contaminações. Após este período, fragmentos das colônias isoladas, através do método de estria, foram inoculados no meio de cultura sólido BDA. Toda manipulação envolvendo o microrganismo foi realizada dentro de cabine de fluxo laminar previamente esterilizada por luz ultravioleta (UV 364nm) e álcool 70%. As culturas foram acondicionadas para crescimento em incubadora B.O.D com temperatura de 28°C com fotoperíodo. O tempo de cultivo variou entre 8 a 12 dias. Logo após esse período, foram utilizadas para a produção do extrato bruto.

4.1.4 Identificação e caracterização molecular

A identificação molecular do fungo endofítico selecionado para este estudo, foi realizada utilizando sequenciamento e análise de distância genética baseada em fragmentos dos genes da beta-tubulina e do fator de alongação (TEF).

4.1.4.1 Metodologia utilizada

- Repique da amostra: A amostra foi repicada em meio de cultura adequado e incubada a 28°C.
- Extração de DNA genômico: O DNA genômico da cultura foi purificado utilizando o protocolo de extração de DNA com fenol (AAMIR *et al.*, 2015).
- Amplificação do genes TEF e Beta-tubulina: A amplificação dos marcadores para os genes foi realizada pela metodologia PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído. Os *primers*

(oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram: EF1/EF2, complementar a região TEF.

- Sequenciamento: O produto da amplificação foi purificado em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetido diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático ABI 3500XL Series (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram: EF1/EF2, 728f/TEF1r e Bt2a/Bt2b.
- Análise de distância genética: As sequências parciais do genes obtidas com os primers utilizados foram montadas em um *consensus* (sequência consenso única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do CBS (<http://www.westerdijkinstitute.nl/>). Foram então selecionadas sequências de microrganismos relacionados à amostra desconhecida para construção do dendograma. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) dentro do BioEdit 7.2.6 (HALL, 1999) e as análises de distância genética foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013). A matriz de distância foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção do dendograma a partir das distâncias genéticas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 6.0.

4.1.5 Animais experimentais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), com o número de protocolo nº 022/2019. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas para o atendimento de animais. Os animais utilizados no experimento são da espécie *Danio rerio*, também conhecido como *zebrafish*, da linhagem *wild*, num total de 180 animais. Em todos os experimentos, foram utilizados animais adultos. Os animais foram

adquiridos da empresa L.C.S. – Produtor Rural, localizado em Itaguaí - RJ, Brasil, sob o protocolo de autorização de uso nº 11533 de 08/03/2021.

Os animais primeiramente foram mantidos em quarentena, na Plataforma *Zebrafish* do Laboratório de Pesquisas Farmacêuticas da UNIFAP, Macapá, Amapá, Brasil. O manejo e cuidado com os animais seguiu de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de experimentação. As condições ambientais da água foram avaliadas por 2 meses antes de iniciar o experimento, como descrito por Carvalho *et al.* (2018).

A água do tanque mãe era constituída por água desmineralizada misturada com água não clorada (16:1), com adição de NaCl a uma condutividade de cerca de 275 μ S (132 mg L⁻¹). As concentrações (em mg L⁻¹) dos íons predominantes na água do tanque mãe foram de: SO₄²⁻ 4.25, Na⁺ 43.19, NO₃⁻ 0.09, Mg²⁺ 0.75, K⁺ 0.21, Cl⁻ 63.93, Ca²⁺ 5.31, e HCO₃⁻ 19.31, total de ~ 137 mg L⁻¹. Estes parâmetros da água, segundo Nusselin-Volhard e Dahm (2000) são ideias para a sobrevivência do *zebrafish*, pois também evitam o crescimento de bactérias e fungos. Para manutenção dos animais foi utilizada água padronizada (ISSO 1996), preparada a partir de água desionizada, com a adição dos seguintes sais: CaCl₂ x 2H₂O (117,6 mg/L), MgSO₄ x 7H₂O (49.3 mg/L), NaHCO₃ (25.9 mg/L) e cloreto de potássio (2,3 mg/L) (Sigma Aldrich). A temperatura da água era controlada, entre 26 ± 10°C.

Os animais eram mantidos sob fotoperíodo de 10h:14h (luz: escuro), e para o período de luz foi utilizado uma fonte de luz artificial (95 - 105 Lux). Quanto a alimentação, recebiam ração comercial específica (Nutricon, Araçoiaba da Serra-SP, Brasil) duas vezes ao dia.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do extrato do micélio do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum*

A produção e preparo do extrato fúngico seguiu a metodologia adaptada de Khayat *et al.* (2019). O material fúngico a partir do meio sólido (5 fragmentos circulares de 0,5cm de diâmetro) foi transferido para as culturas semissólidas de arroz preparadas em 5 frascos Erlenmeyer (1 L) contendo H₂O destilada (100mL) + arroz (100g), previamente esterilizados em autoclave do tipo vertical (Araraquara-SP, Brasil) à temperatura de 121°C por 20min e, mantidos por 30 dias em método de cultivo

estacionário, em estufa do tipo B.O.D (LUCADEMA, São José do Rio Preto-SP, Brasil) à 27°C.

O extrato foi obtido por maceração estática. Após o tempo de cultivo foram adicionados 200mL de diclorometano e metanol em cada frasco, e mantidos em temperatura ambiente, durante 14 dias, com duas trocas dos solventes. Decorrido o tempo de maceração, foi realizado uma filtração simples, em funil de vidro com papel filtro. Os solventes foram removidos por rotaevaporação. O extrato bruto foi submetido ao processo de liofilização, onde obteve-se o extrato bruto total (49,25g) (Figura 14). Para o estudo, EDMNF foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) nas dosagens necessárias. O extrato diclorometânico/metanólico do micélio do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum* foi identificado com a seguinte sigla: EDMNF.

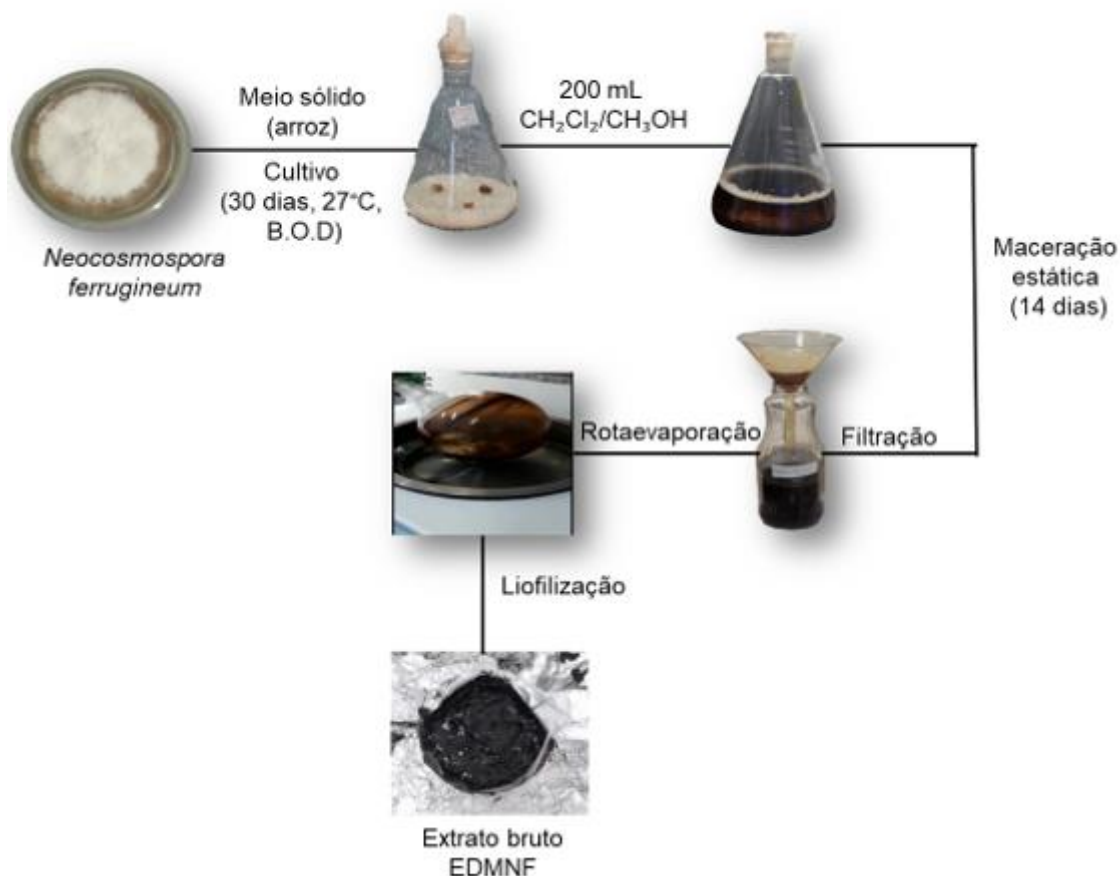


Figura 14 - Fluxograma da obtenção do extrato do micélio do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum*
Fonte: A autora (2020).

4.2.2 Análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

A análise química do EDMNF foi realizada em cromatógrafo gasoso (CG, modelo 7890B, Agilent Technologies, Inc.), acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo (EM, modelo 5977A, Agilent Technologies, Inc. MSD), com coluna capilar DB5-MS 30 m x 250 µm x 1µm MDS. Após a injeção das amostras no CG, o injetor operou em modo Split (razão 10:1), a uma temperatura de 280°C, com uma taxa de fluxo da coluna de 12mL.min⁻¹, e utilizou-se hélio como gás de arraste. A programação da temperatura do CG inicialmente foi de 25°C, seguido de uma isotérmica por 3 minutos, na sequência a temperatura aumentou em 5°C.min⁻¹ (53min) até chegar em 290°C, e manteve-se uma isotérmica por 4min. O tempo total de análise durante todo o processo foi de 60min para cada amostra. O espectrômetro de massa foi operado monitorando todos os íons de taxa de massa/carga (m/z) entre 40 e 500. A temperatura da fonte de elétrons para o espectrômetro de massa foi de 290°C, e a temperatura do quadrupolo de 150°C. A identificação dos compostos foi realizada a partir da comparação com os espectros de massa padrão de componentes da Nist Research Library, considerando valores de similaridade superiores a 80% dos espectros.

4.2.3 Estudo do EDMNF em *zebrafish* adulto

4.2.3.1 Ensaio de toxicidade aguda oral e determinação da DL50

A avaliação da toxicidade aguda do EDMNF em *zebrafish* adulto foi estabelecida a partir do Teste principal descrito pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE 425) com adaptações e, seguindo a técnica descrita por Souza *et al.* (2016), no que se refere ao tempo de observação, análise comportamental e histopatológica. O EDMNF (dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%)) foi administrado via oral pelo método de gavagem em diferentes dosagens (175, 550 e 2000mg/kg) para cinco animais em cada grupo. Após administração, os animais foram observados por 48h (Figura 15).

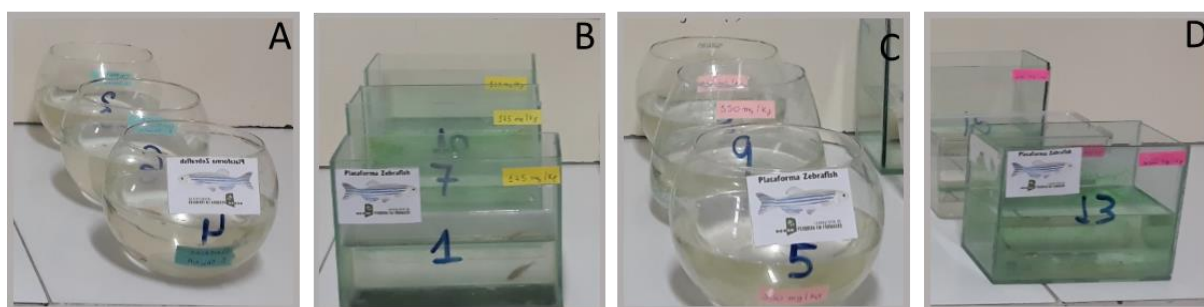


Figura 15 - Ensaio de toxicidade aguda oral do EDMNF em zebrafish adulto. (A) grupo controle (tratado com solução salina, v.o), (B) grupo tratado com EDMNF 175mg/kg (v.o), (C) grupo tratado com EDMNF 550mg/kg (v.o) e (D) grupo tratado com EDMNF 2000mg/kg (v.o).

Fonte: A autora (2019).

4.2.3.1.1 Análise comportamental

As reações comportamentais foram avaliadas de acordo com a metodologia descrita por Souza *et al.* (2016), sendo classificada em estágios: I: 1) aumento da atividade de natação; 2) presença de tremores na cauda; II: 1) natação circular; 2) perda de equilíbrio; III: 1) perda da motilidade; 2) deposição do animal no fundo do aquário; 3) morte. Os animais foram observados no período de 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a administração via oral do EDMNF.

4.2.3.1.2 Monitoramento da mortalidade

A mortalidade foi monitorada ao longo de 48 horas. Os animais foram considerados mortos, quando o movimento do opérculo e resposta a estímulos mecânicos já não puderam ser detectados. Após o término do experimento, os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia em água gelada a 5°C, seguindo a recomendação da American Veterinary Medical Association (AVMA, *Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition Members*).

4.2.3.1.3 Análise histopatológica

4.2.3.1.3.1 Preparo do material

Para a análise histopatológica, o procedimento de preparo de lâminas, seguiu conforme descrito por Souza *et al.* (2016), para o ensaio de toxicidade aguda e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF, os seguintes órgãos foram analisados: intestino, fígado e rins.

Ao final dos respectivos experimentos, os animais eram colocados em solução de Bowin por 24h. Após esse período, os animais foram cortados ao meio, suas

metades colocadas em cassetes devidamente identificados e descalcificados em solução de EDTA por 48h. Logo, foram submetidos a desidratação alcoólica, nas seguintes proporções: 70, 80, 90 e 100% por 1h cada. Em seguida, passaram pelo processo de diafanização com xilol e, as amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo rotativo (marca Rotary Microtome Cut 6062, Slee Medical, Germany), na espessura de 4 a 6µm, dispostos em lâminas de vidro, e coradas em Hematoxilina (hematoxilina de Harris-LABORCLIN) e Eosina (eosina amarelada-INLAB) (Figura 16).



Figura 16 - Etapas para preparação das lâminas histológicas dos órgãos de zebrafish adulto.
Fonte: A autora (2019).

4.2.3.1.3.2 Avaliação das alterações histopatológicas

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (marca Olympus-micronal BX41) e as alterações encontradas foram avaliadas, registradas e fotografadas com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital). Para a análise das alterações encontradas foram considerados os parâmetros apresentados por Souza *et al.* (2016), Borges *et al.*, (2018) e Carvalho *et al.* (2018), na qual foram consideradas uma série de alterações histopatológicas para intestino, fígado e rins, conforme descrito nas tabelas 2, 3 e 4. Para a avaliação das alterações foi aplicado o Índice de Alteração Histopatológica (IAH), utilizado por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). Este índice baseia-se em uma lista de lesões, sendo cada tipo de lesão classificado, conforme a severidade, em estágios I, II e III. Os estágios são assim descritos:

- Estágio I: alterações que não comprometem o funcionamento do tecido;
- Estágio II: alterações mais severas que comprometem o funcionamento normal do órgão;
- Estágio III: alterações muito severas ou irreversíveis.

A partir dessa classificação das lesões em estágios, os autores assumiram empiricamente que a cinética das alterações tem um crescimento exponencial. Então:

- a) para o primeiro estágio: 10⁰
- b) para o segundo estágio: 10¹
- c) para o terceiro estágio: 10²

Assim, os índices foram calculados de acordo com a seguinte equação:

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

Onde:

a: primeiro estágio de alterações

b: segunda estágio de alterações

c: terceiro estágio de alterações

na: número total de alterações consideradas como sendo do primeiro estágio

nb: número total de alterações consideradas como sendo do segundo estágio

nc: número total de alterações consideradas como sendo do terceiro estágio

N: número de peixes analisados por tratamento

Esta equação foi utilizada para calcular o índice de alterações teciduais observadas no fígado, intestino e rins, para o ensaio de toxicidade aguda oral e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF.

Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) estabeleceram, ainda, as seguintes relações entre os valores e os efeitos nas brânquias, conforme tabela abaixo. Neste trabalho essas relações foram extrapoladas para o fígado, intestino e rins, conforme descrito por Souza *et al.* (2016).

Tabela 2 – Valores de referência do índice de alteração histopatológica

Valores	Efeitos
0-10	Órgão funcionalmente normal
11-20	Órgão com alterações de leves a moderadas
21-50	Órgão com alterações de moderadas a graves
>100	Órgão com danos irreversíveis

Fonte: Souza *et al.* (2016).

Alterações histopatológicas consideradas para análise do intestino de *zebrafish* adulto no ensaio de toxicidade aguda e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF. O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna.

Tabela 3 - Alterações histopatológicas consideradas para análise do intestino de *zebrafish* adulto no ensaio de toxicidade aguda e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS - INTESTINO	ESTÁGIO
Dilatação dos vasos presentes nas vilosidades	I
Desprendimento do revestimento epitelial do ápice das vilosidades intestinais	I
Atrofia dos vilos	I
Hipertrofia das células epiteliais	I
Hiperplasia de células caliciformes	I
Degeneração da camada muscular	I
Infiltração linfocítica estromal	I
Redução na espessura da lâmina própria	I
Vacuolização de enterócitos	I
Infiltração de leucócitos	I
Edema	II
Encurtamento da lâmina própria	I
Degeneração celular	I
Presença de parasitas	I
Destacamento da lâmina própria	I
Deslocamento da lâmina própria	II
Descamação da mucosa intestinal	II
Fusão parcial ou completa de vilosidades	II
Hemorragia na lâmina própria	II
Degeneração vilosa	II
Necrose	II

Fonte: Baseado em Carvalho *et al.* (2018)

Alterações histopatológicas consideradas para análise do fígado de *zebrafish* adulto no ensaio de toxicidade aguda e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF. O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna.

Tabela 4 - Alterações histopatológicas consideradas para análise do fígado de *zebrafish* adulto no ensaio de toxicidade aguda e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS - FÍGADO	ESTÁGIO
a) Alterações nos hepatócitos	
Desarranjo dos cordões hepáticos	I
Perda ou atipia do contorno nuclear	I
Aumento no volume celular	I
Aumento no volume nuclear	I
Atrofia nuclear	II
Intensa vacuolização citoplasmática	I
Vacuolização nuclear	I
Diminuição na frequência relativa de ocorrência de núcleos	II
Degeneração citoplasmática	
Degeneração nuclear	II
Rompimento celular	II
Diminuição do glicogênio	II
Estagnação biliar	I
b) Alterações nos vasos sanguíneos	I
Aumento na frequência relativa de vasos sanguíneos	
Aumento no volume relativo de vasos sanguíneos	I
Hiperemia	I
Ruptura dos vasos	II
c) Alterações nos canalículos biliares	II
Degeneração dos canalículos biliares	
d) Estágio terminal	II
Necrose (focal ou total)	III

Fonte: Baseado em Rigolin-Sá (1998).

Alterações histopatológicas consideradas para análise dos rins de *zebrafish* adulto no ensaio de toxicidade aguda oral e avaliação da atividade anti-inflamatória

do EDMNF. O estágio considerado para cada alteração está indicado na segunda coluna.

Tabela 5 - Alterações histopatológicas consideradas para análise dos rins de *zebrafish* adulto no ensaio de toxicidade aguda oral e avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS – RINS	ESTÁGIO
a) Alterações no tecido linfoide	
Perda de contorno celular ou contorno celular atípico	I
b) Alterações nos glomérulos e túbulos renais	
Degeneração hialina tubular leve	I
Degeneração hialina tubular severa	II
Hipertrofia das células tubulares	I
Desorganização tubular	I
Desorganização glomerular	I
Degeneração tubular	II
Degeneração glomerular	II
Aumento no espaço da cápsula de Bowman	I
Diminuição do espaço da cápsula de Bowman	I
Dilatação de capilares glomerulares	I
Degeneração citoplasmática de células tubulares	II
Degeneração nuclear de células tubulares	II
Presença de túbulos regenerados ou “novos” néfrons	I
Obstrução tubular	I
Aumento no lúmen tubular	I
Presença de tecido linfoide na cápsula de Bowman	II
Diminuição da frequência relativa de glomérulos I	I
c) Alterações no vasos sanguíneos	
Dilatação de vasos sanguíneos II	II
Hiperemia II	II
Ruptura de vasos sanguíneos II	II
d) Estágio terminal	
Necrose	III

Fonte: Baseado em Rigolin-Sá (1998) e em alterações descritas por Takashima e Hibiya (1995)

4.2.3.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF no teste de edema abdominal induzido por diferentes agentes inflamatórios

Para avaliar o potencial anti-inflamatório do EDMNF, foi utilizado o teste de edema abdominal induzido por diferentes agentes inflamatórios: carragenina, dextrana, histamina e prostaglandina E2 (PGE2) em *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, baseado nas metodologias descritas por Carvalho *et al.* (1998,1999, 2018) e Borges *et al.* (2018).

4.2.3.2.1 Teste de edema abdominal induzido por carragenina

A avaliação do efeito anti-inflamatório do EDMNF, em edema abdominal induzido por carragenina (iota tipo II, Lote 65H1096, Sigma Co, São Paulo, Brasil), seguiu a metodologia descrita por Borges *et al.* (2018). Os animais foram selecionados de forma aleatória, divididos em nove grupos (n=12/grupo). Os ensaios foram realizados em triplicata. As doses do EDMNF foram determinadas a partir do ensaio de toxicidade aguda oral e, os grupos foram tratados da seguinte forma:

- Controle PBS - animais tratados com solução salina via oral (2µl) e PBS (substância usada para solubilizar carragenina) (20µL) via intraperitoneal;
- Grupo controle negativo (Cg) - animais tratados com solução salina via oral (2 µl), e carragenina (400µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Grupo controle Veículo (Vh) - animais tratados com veículos da Indometacina (Tween+DMSO+água destilada, 2µl) via oral e carragenina (400µg, 20 µL) via intraperitoneal; H2O;
- Grupo controle positivo (Ind) - animais tratados com Indometacina (10 mg/kg, Sigma Co. São Paulo, Brasil) via oral e carragenina (400µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Grupo tratamento EDMNF 10mg/kg - animais tratados com EDMNF 10 mg/kg via oral e carragenina (400µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Grupo tratamento EDMNF 100mg/kg - animais tratados com EDMNF 100 mg/kg via oral e carragenina (400µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Grupo tratamento EDMNF 500mg/kg - animais tratados com EDMNF 500 mg/kg via oral e carragenina (400µg, 20µL) via intraperitoneal;

- Grupo tratamento EDMNF 1000mg/kg - animais tratados com EDMNF 1000 mg/kg via oral e carragenina (400 µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Grupo tratamento EDMNF 2000 mg/kg - animais tratados com EDMNF 2000 mg/kg via oral e carragenina (400 µg, 20µL) via intraperitoneal.

Após a pesagem inicial dos animais (utilizada para calcular o volume a ser administrado de acordo com o peso e análise do edema), cada grupo recebeu o tratamento correspondente via oral. Decorrido o intervalo de 1h, foi realizada a indução de edema abdominal com carragenina, de acordo com metodologia descrita por Borges *et al.* (2018) e Carvalho *et al.* (2018). Os animais foram anestesiados individualmente em água (8-10°C), e a carragenina (400µg), solubilizada em PBS, foi injetada intraperitonealmente num volume de 20µL. A pesagem final foi realizada 5h após a injeção de carragenina (i.p.) (BORGES *et al.*, 2018) (Figura 17).

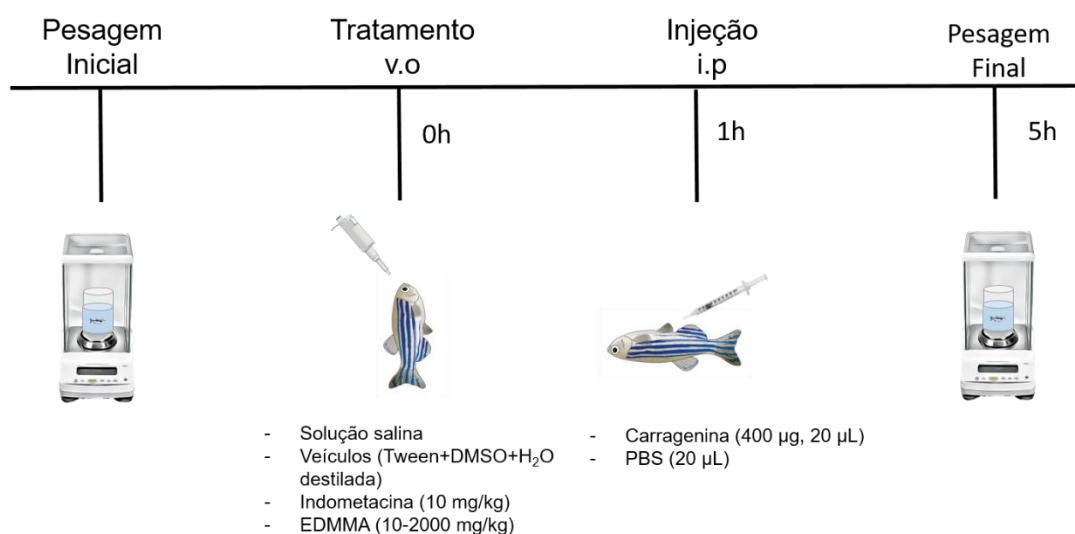


Figura 17 - Esquema da metodologia do teste de edema abdominal induzido por carragenina
Fonte: A autora (2022).

4.2.3.2.2 Determinação da dose efetiva 50 (DE₅₀) do EDMNF

A determinação da DE₅₀ foi baseada no ensaio de edema abdominal induzido por carragenina, com objetivo de determinar uma dose eficaz a ser utilizada nos ensaios de edema abdominal induzidos por dextrana, histamina e prostaglandina E2. *Zebrafish* adultos (n = 12/grupo) foram tratados por via oral com o EDMNF, nas seguintes doses: 10, 100, 500, 1000 e 2000mg/kg, 1h antes da aplicação do estímulo

inflamatório (Carragenina 400µg, 20µL, i.p). A DE₅₀ do EDMNF foi determinada em 80mg/kg, a partir da curva de porcentagem de inibição do edema, em função do *log* das doses, utilizando a análise de probitos, conforme descrito por Carvalho *et al.* (1999).

4.2.3.2.3 Teste de edema abdominal induzido por dextrana, histamina e prostaglandina E₂

A avaliação do efeito anti-inflamatório do EDMNF, em edema abdominal induzido por dextrana (Lote 116H0280, Sigma Co, São Paulo, Brasil), histamina (Lote 127H1167, Sigma Co, São Paulo, Brasil) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (Lote 10K3860, Sigma Co, São Paulo, Brasil), seguiu a metodologia adaptada de Carvalho *et al.* (1998,1999). Os animais foram selecionados de forma aleatória e divididos em quatro grupos (n = 9/grupo). Os tratamentos foram realizados em triplicata. Para esta série experimental foi utilizada a DE₅₀ e, os grupos foram tratados da seguinte forma:

Dextrana

- Controle Solução salina (SS) - animais tratados com solução salina via oral (2µl) e S. salina (20µL) via intraperitoneal;
- Controle negativo (Dex) - animais tratados com solução salina via oral (2 µl) e dextrana (100µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Controle positivo (Cp) - animais tratados com Ciproeptadina (10mg/kg, Sigma Co. São Paulo, Brasil) via oral e dextrana (100µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Grupo tratamento EDMNF - animais tratados com EDMNF 80mg/kg via oral e dextrana (100µg, 20µL) via intraperitoneal.

Após a pesagem inicial dos animais (utilizada para calcular o volume a ser administrado de acordo com o peso e análise do edema) cada grupo recebeu o tratamento correspondente via oral. Decorrido o intervalo de 1h, foi realizada a indução de edema abdominal com dextrana, de acordo com metodologia descrita por Borges *et al.* (2018) e Carvalho *et al.* (2018). Os animais foram anestesiados individualmente em água (8-10°C), e dextrana (100µg) solubilizada em solução salina, foi injetada intraperitonealmente num volume de 20µL. A pesagem final foi realizada

1h e 30min após injeção de dextrana (i.p.) (CARVALHO *et al.*, 1998, 1999) (Figura 18).

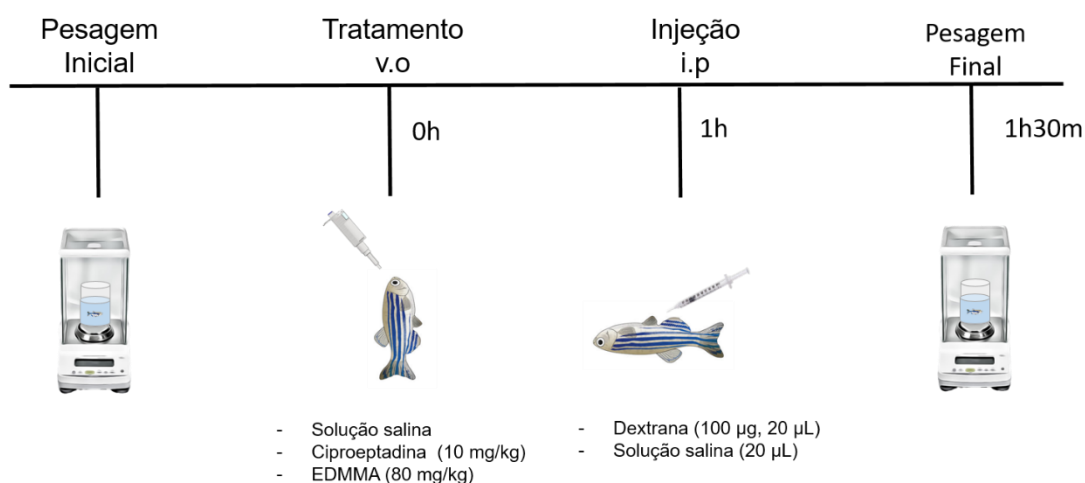


Figura 18 - Esquema da metodologia do teste de edema abdominal induzido por dextrana
Fonte: A autora (2022).

Histamina

- Controle Solução salina (SS) - animais tratados com solução salina via oral (2µl) e S. salina (20µL) via intraperitoneal;
- Controle negativo (Hist) - animais tratados com solução salina via oral (2µl), e histamina (50µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Controle positivo (Cp) - animais tratados com Ciproheptadina (10mg/kg, Sigma Co. São Paulo, Brasil) via oral e histamina (50µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Grupo tratamento EDMNF - animais tratados com EDMNF 80mg/kg e histamina (50µg, 20µL) via intraperitoneal.

Após a pesagem inicial dos animais (utilizada para calcular o volume a ser administrado de acordo com o peso e análise do edema), cada grupo recebeu o tratamento correspondente via oral. Decorrido o intervalo de 1h, foi realizada a indução de edema abdominal com histamina, de acordo com metodologia descrita por Borges *et al.* (2018) e Carvalho *et al.* (2018). Os animais foram anestesiados individualmente em água (8-10°C), e histamina (50µg), solubilizada em solução salina, foi injetada intraperitonealmente num volume de 20µL. A pesagem final foi realizada 1h após injeção de histamina (i.p.) (CARVALHO *et al.*, 1998, 1999) (Figura 19).

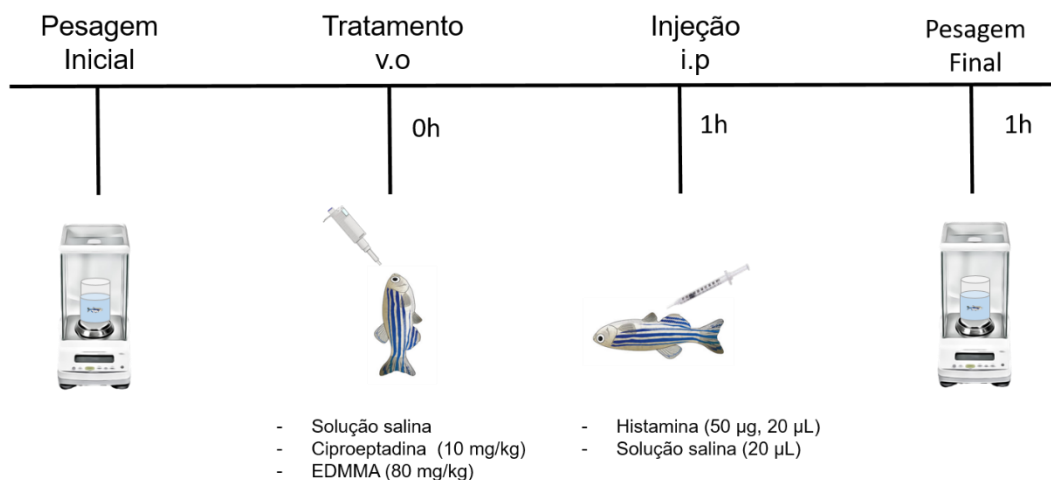


Figura 19 - Esquema da metodologia do teste de edema abdominal induzido por histamina
Fonte: A autora (2022).

Prostaglandina E2

- Controle Solução salina (SS) - animais tratados com solução salina via oral (2µl) e S. salina (20µL) via intraperitoneal;
- Controle negativo (PGE2) - animais tratados com solução salina via oral (2µl) e prostaglandina E2 (50µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Controle positivo (Ind) - animais tratados com Indometacina (10mg/kg, Sigma Co. São Paulo, Brasil) via oral e prostaglandina E2 (50µg, 20µL) via intraperitoneal;
- Grupo tratamento EDMNF - animais tratados com EDMNF 80 mg/kg e prostaglandina E2 (50µg, 20µL) via intraperitoneal.

Após a pesagem inicial dos animais (utilizada para calcular o volume a ser administrado de acordo com o peso e análise do edema), cada grupo recebeu o tratamento correspondente via oral. Decorrido o intervalo de 1h, foi realizada a indução de edema abdominal com prostaglandina E2, de acordo com metodologia descrita por Borges *et al.* (2018) e Carvalho *et al.* (2018). Os animais foram anestesiados individualmente em água (8-10°C), e prostaglandina E2 (50µg), solubilizada em solução salina, foi injetada intraperitonealmente num volume de 20µL. A pesagem final foi realizada 1h após injeção de prostaglandina E2 (i.p.) (CARVALHO *et al.*, 1998, 1999) (Figura 20).

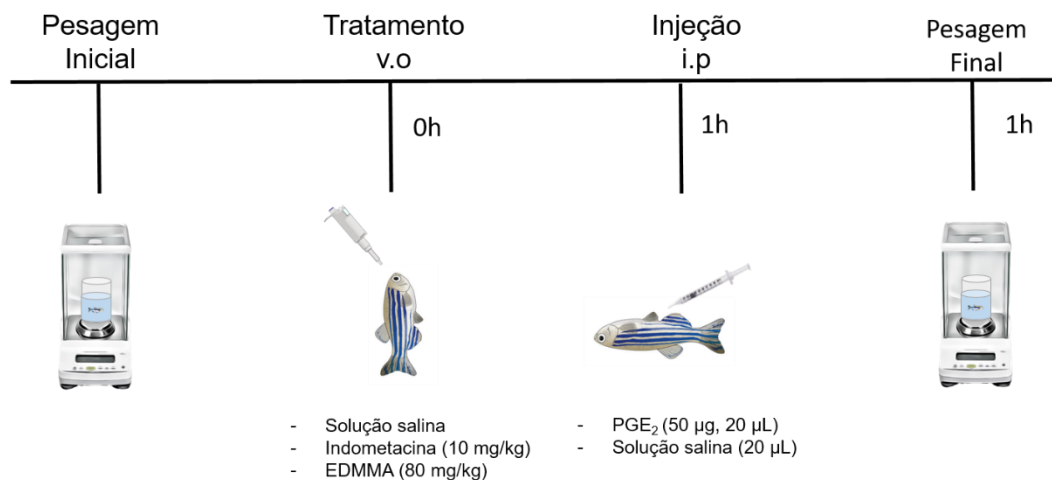


Figura 20 - Esquema da metodologia do teste de edema abdominal induzido por PGE2
Fonte: A autora (2022).

4.2.3.2.4 Análise de edema abdominal e avaliação do efeito inibitório

Para a análise do edema abdominal, todos os animais foram pesados individualmente em balança analítica (FA2104N, Bioprecisa Co., São Paulo, Brasil), antes de iniciar o experimento (PI= peso corporal inicial) e no final do experimento (PF= peso corporal final), conforme descrito por Borges *et al.* (2018) e Carvalho *et al.* (2018).

O desenho experimental e a execução da análise do edema abdominal foram otimizados para minimizar o número amostral e o sofrimento dos animais utilizados. Buscou-se a otimização da técnica, a partir de Carvalho *et al.* (1998, 1999) e Borges *et al.* (2018), quando se determinou a pesagem final, no pico máximo do edema, para cada estímulo inflamatório utilizado: 5h após a injeção de carragenina (i.p.) (BORGES *et al.*, 2018), 1h e 30min após injeção de dextrana (i.p.) e 1h após injeção de histamina e/ou prostaglandina E2 (i.p.) (Carvalho *et al.*, 1998, 1999).

A avaliação do efeito inibitório, para todos os ensaios, foi realizada a partir da diferença do peso corporal ($\neq$ PC) de cada animal, onde $\neq$ PC= PF - PI, sendo utilizada para o cálculo do percentual de inibição da inflamação (% II) que foi calculado, de acordo com:

$$\% \text{ II} = \frac{100\% - \text{Média (tratamento EDMMA)}}{\text{Média (controle negativo (Cg))}} \times 100\%$$

4.2.3.2.5 Análise comportamental

Em cada experimento, após a indução do edema abdominal por diferentes agentes inflamatórios, foi realizada a análise comportamental em estágios, de acordo com os parâmetros descritos por Souza *et al.*, (2016), sendo classificada em estágios: I: 1) aumento da atividade de natação; 2) presença de tremores na cauda; II: 1) natação circular; 2) perda de equilíbrio; III: 1) perda da motilidade; 2) deposição do animal no fundo do aquário; 3) morte.

Quanto ao tempo de análise, no teste de edema abdominal induzido por carragenina, o comportamento dos animais foi avaliado a cada uma hora, ao longo de 1-5 h após a injeção (i.p) de carragenina, conforme descrito por Borges *et al.* (2018). Para os testes de edema abdominal induzido por dextrana, histamina e prostaglandina E2, o tempo de análise comportamental foi estabelecido da seguinte forma: a cada 30min, ao longo 1h-30min, após a injeção (i.p) de dextrana; e também a cada 30min, ao longo de 1h, após a injeção (i.p) de histamina e/ou prostaglandina (Tabela 5).

Tabela 5 – Metodologia do tempo de análise comportamental, após a indução do edema abdominal por diferentes agentes inflamatórios

	CARRAGENINA	DEXTRANA	HISTAMINA	PGE ₂
Intervalo	1h	30min	30min	30min
Período	1-5h	1h30m	1h	1h

Fonte: A autora (2022).

Ao final do experimento, após análise comportamental e pesagem final, logo em seguida, foi realizada a eutanásia e imediatamente armazenados em solução de Bowin por 24h para as análises histopatológicas.

4.2.3.2.6 Análise histopatológica

A análise histopatológica da avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF em edema abdominal induzido por diferentes agentes inflamatórios, seguiu a metodologia descrita no item 4.2.3.1.3.

4.2.3.2.7 Análise estatística

A dose efetiva 50 (DE50) foi calculada a partir da análise de probitos, utilizando *software* GraphPad Prism versão 6.0. Para análise dos dados histopatológicos aplicou-se ANOVA (*one-way*) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação dos grupos testes e controle. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão médio. Resultados com $p < 0.05$, foram considerados estatisticamente significativos, utilizando o *software* GraphPad Prism versão 6.0. Para a análise dos resultados da atividade anti-inflamatória, utilizou-se o *software* GraphPad Prism versão 5.0, aplicou-se ANOVA (*one-way*) seguido do teste de Tukey-Kramer, para comparações entre os grupos testados e o controle. Resultados com $p < 0,05$ e $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram expressos com média $\pm$ o erro padrão médio.

4.2.3.2.8 *Docking* molecular em alvos biológicos relacionados ao processo inflamatório

Para a realização do estudo de *docking* molecular, as estruturas 3D dos alvos estudados foram obtidas a partir do Protein Data Bank, juntamente com as informações de cristalografia, a Ciclooxygenase-1 (COX-1, PDB ID: 3N8X, com resolução de 2,75 Å) complexada com um fármaco inibidor, a nimesulida; e a Ciclooxygenase-2 (COX-2, PDB ID: 5IKQ, com resolução de 2,41 Å) complexado com o ácido meclofenâmico (ORLANDO; MALKOWSKI, 2016; SIDHU *et al.*, 2010).

O programa utilizado na realização da ancoragem, foi *software* GOLD (Otimização genética para acoplamento de ligantes), o qual utiliza um algoritmo genético para obter experimentos de acoplamento entre determinados ligantes em sítios de ligação de proteínas, afim de obter os melhores modos de interação entre os compostos estudados submetidos nos alvos terapêuticos (CHANDAK *et al.*, 2014).

Para realização do acoplamento molecular, átomos de hidrogênios foram adicionados e as moléculas de água removidas das enzimas. Cada estrutura complexada foi extraída, antes da realização da simulação de *Docking*, para se obter os dados de validação de cada alvo. Na validação, foram calculados os valores de desvio quadrático médio (RMSD), que é o resultado obtido da comparação entre o experimental e a melhor posição que o ligante produziu no determinado encaixe. Posteriormente, para calcular o *docking* da estrutura submetida aos alvos, foram utilizadas as seguintes coordenadas obtidas na validação: COX-1: $x = -20,85$; $y = -50,42$ e $z = 1,75$; COX-2: $x = 22,65$; $y = 51,66$ e $z = 17,70$. Os aminoácidos que compõem os sítios de interação de cada alvo foram: COX-1: Arg120, Tyr355, Ile523 e Ser530; COX-2: Tyr385 e Ser530 (BORGES et al., 2018).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO FUNGO ENDOFÍTICO

O fungo endofítico utilizado para este estudo, isolado dos frutos de *E. oleraceae* foi identificado como *Neocosmospora ferrugineum* (Sand.-Den. & Crous) O'Donnell, Geiser, Kasson & T. Aoki 2020.

5.1.1 Caracterização morfológica

A Figura 21 apresenta a caracterização morfológica do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum*.

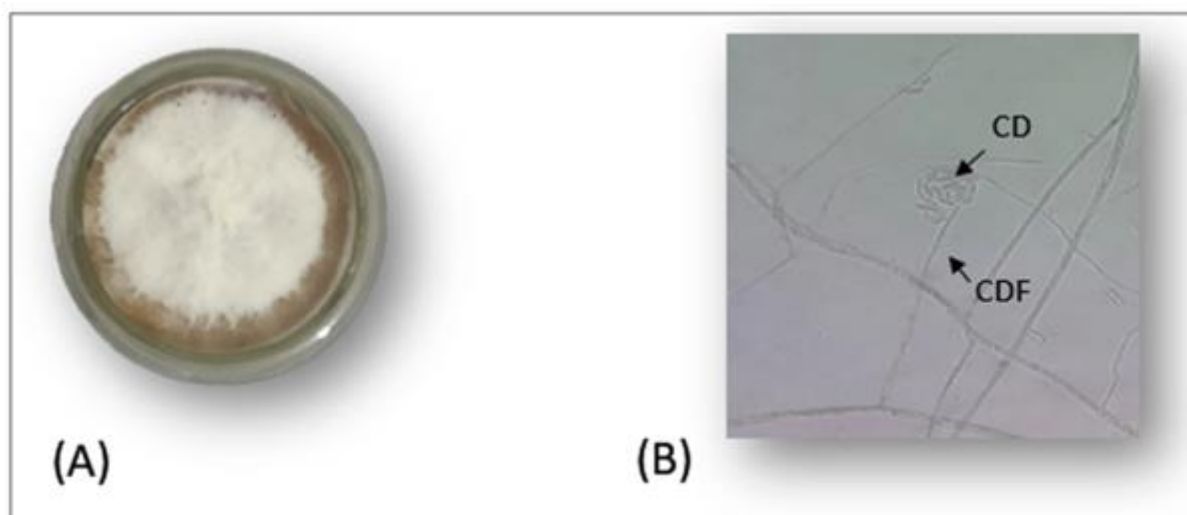


Figura 21 - Macromorfologia do fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum* isolado da *Euterpe Oleracea* Mart. (A) e aspecto microscópico do *Neocosmospora ferrugineum*. (B), indicando as seguintes características: conídios (CD) agrupados unicelulares, conidióforo (CDF) alongado perpendicular as hifas.

Fonte: A autora (2021)

5.1.2 Caracterização molecular

A amostra do fungo endofítico, foi identificado como CPQBA 2615-22-DRM 01, apresentou crescimento satisfatório, sem evidência de contaminação. Fragmentos dos genes TEF e beta tubulina foram amplificados e sequenciados a partir do DNA genômico extraído da amostra. O dendograma de distância genética construído a

partir das sequências recuperadas das bases de dados e da amostra esta apresentado na figura 22

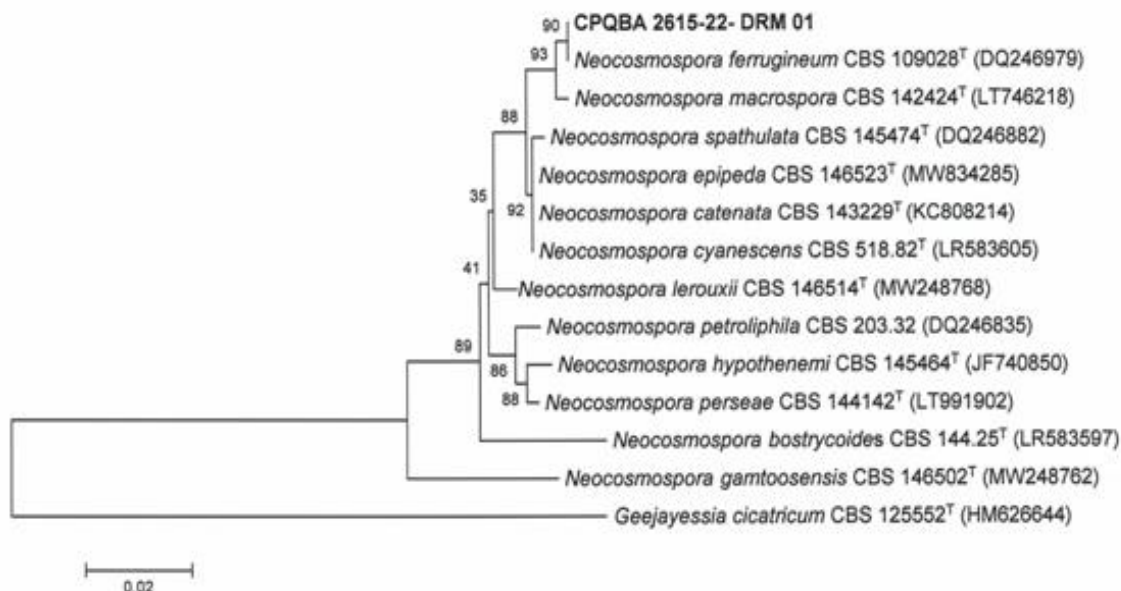


Figura 22 - Dendrograma baseado em distância genética utilizando o método *Neighbor-Joining*, demonstrando a relação entre a sequência parcial da região TEF da amostra CPQBA 2615-22-DRM 01 e sequências de linhagens de microorganismos relacionados presentes nas bases de dados Mycobank (CBS-Knaw, atual Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) e Genbank
Fonte: CPQBA – Unicamp (2022).

A sequência da região do gene TEF (EF1/EF2) da amostra CPQBA 2615-22-DRM 01 apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região do operon ribossomal da espécie *Neocosmospora ferrugineum*, depositados no banco de dados GenBank e do CBS-Knaw (atual Westerdijk Fungal Biodiversity Institute).

A análise de distância genética (figura 22) recuperou a amostra CPQBA 2615-22-DRM 01 em um grupamento com uma resolução de 90% com a linhagem tipo CBS 109028, para a espécie *Neocosmospora ferrugineum*. Assim, os resultados das análises realizadas nas bases de dados e da filogenia sugerem a identificação final da amostra CPQBA 2615-22-DRM 01 como *Neocosmospora ferrugineum* (Sand.-Den. & Crous) O'Donnell, Geiser, Kasson & T. Aoki 2020.

O fungo *Neocosmospora ferrugineum* foi identificado recentemente a nível de espécie (O'DONNELL; GEISER; KASSON; T. AOKI 2020). As espécies que compõem o gênero *Neocosmospora* quando isolados como endófitos ou patogênicas em vegetais, são identificadas de acordo com seu hospedeiro. O gênero *Neocosmospora* é um grande complexo, que engloba aproximadamente 68 espécies (SANDOVAL-DENIS; LOMBARD; CROUS, 2019).

Linhagens do gênero *Neocosmospora* foram isolados como endófitos em diversos vegetais (BIZ, 2014; BEZERRA, 2016; SILVA, 2020). Segundo Sandoval-Denis, Lombard e Crous (2019) espécies de *Neocosmospora* são conhecidos como produtores de compostos naturais bioativos, que exibem atividade antibacteriana (BACON *et al.*, 1996; MERLIN *et al.*, 2013); atividade citotóxica, com os agentes imunossupressores cyclosporine A e C, e naphthoquinones (NAKAJIMA *et al.*, 1989; SUGIURA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2014; TAKEMOTO *et al.*, 2014; RATHNA *et al.*, 2016; CHOWDHURY *et al.*, 2017); atividade enzimática, onde diversas enzimas são aplicadas em vários seguimentos industriais, incluindo as enzimas: chitosanases (LIU; BAO, 2009), cutinases (MANNESSE, 1997; LONGHI *et al.*, 2005), hidrolases (JALLOULI *et al.*, 2015), laccases (WU; NIAN, 2014) e lyases (LONGHI *et al.*, 2005); e também compostos utilizados para a biosíntese de nanopartículas (FATHIMA; BALAKRISHNAN 2014).

5.2 ANÁLISE

5.2.1 Análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) do EDMNF

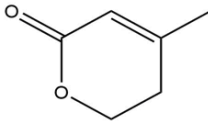
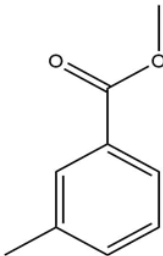
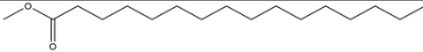
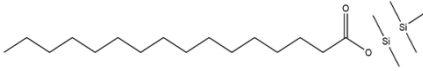
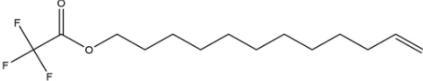
De acordo com Pal, Shaik e Begum (2020), os bioativos de origem endofítica, compõe uma área da pesquisa recentemente explorada que ganhou reconhecimento nas últimas duas décadas. Estes organismos são de grande importância biotecnológica, destacando-se, como eficientes produtores de metabólitos secundários bioativos, tornaram-se uma potencial fonte de novos produtos naturais para exploração na medicina, agricultura e indústria. Pesquisas recentes na literatura mostram inúmeros compostos farmacologicamente ativos de endófitos fúngicos de plantas medicinais, especialmente compostos com atividade anti-inflamatória (ZHANG *et al.*, 2018; KHAYAT *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020; PAL; SHAIK, BEGUM, 2020).

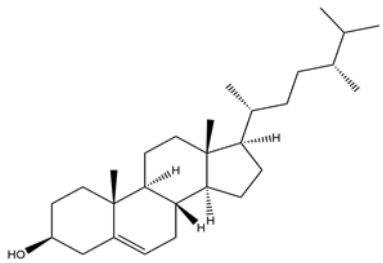
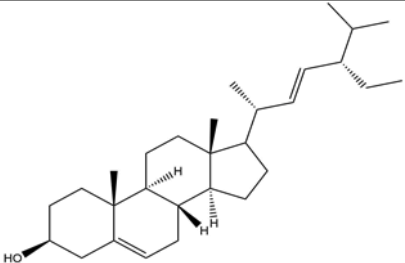
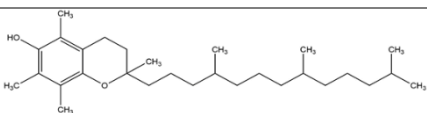
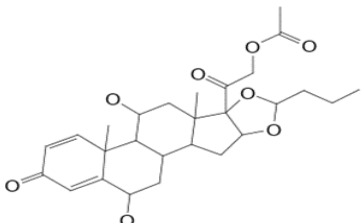
Dado o interesse na busca por novas terapias anti-inflamatórias e a diversidade estrutural e farmacológica dos compostos de origem endofítica, o presente estudo se propôs avaliar a ação anti-inflamatória do extrato diclorometânico/metanólico de *Neocosmospora ferrugineum* (EDMNF), fungo endofítico isolado dos frutos de *E. oleracea*. O fungo endofítico *Neocosmospora ferrugineum* foi cultivado em meio de

arroz e, o extrato diclorometânico/metanólico do micélio foi submetido à análise GC-MS.

A análise exploratória qualitativa do EDMNF evidenciou a presença de diferentes compostos no cromatograma, que foram relacionados a Nist Research Library (NIST), com valores de similaridade superiores a 80% dos espectros. Os compostos identificados no EDMNF estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Resultado da análise qualitativa. Compostos identificados por GC-MS no EDMNF.

Nome do composto	Similaridade (%) Banco de dados NIST	tR médio (Min)	Massa molar (M/z)	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Lactona desidromevalônica	> 80%	27,2	112.05	C ₆ H ₈ O ₂	
Ácido benzoico, 3-metil-, éster de metila	< 80%	28,6	150.06	C ₉ H ₁₀ O ₂	
Ácido hexacanoico, éster de metila	< 80%	46	270.25	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	
<i>n</i> -Ácido hexacanoico	< 80%	46,8	386.30	C ₂₁ H ₄₆ O ₂ Si ₂	
11-Dodecen-1-ol trifluoroacetato	< 80%	50,1	280.16	C ₁₄ H ₂₃ F ₃ O ₂	

Campesterol	< 80%	54,3	400.37	C ₂₈ H ₄₈ O	
Estigmasterol	< 80%	56,6	412.37	C ₂₉ H ₄₈ O	
Vitamina E	< 80%	57,5	430.38	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	
(22S) -21-acetoxy-6alpha,11beta-dihydroxy-16alpha,17alpha-propylmethylenedioxypregna-1,4-diene-3,20-dione	< 80%	58,4	488.24	C ₂₇ H ₃₆ O ₈	

Legenda: tR - tempo de retenção dos compostos. Identificação com base em similaridade da biblioteca NIST. Fonte: A autora (2021)

A análise dos picos proeminentes do resultado de GC-MS mostrou que nove compostos foram detectados a partir do EDMNF (Tabela 6). Embora tenham sido detectados, este estudo se concentrou apenas naqueles com alta similaridade no banco de dados NIST (> 80 %), uma vez que nenhum padrão químico foi utilizado para verificar a identidade dos compostos, sobretudo aqueles com baixos índices de similaridade (< 80 %) (MALONZO *et al.*, 2018).

Levando em consideração similaridade superior à 80% dos espectros experimentais em relação a NIST, o composto identificado como Lactona desidromevalônica (93,3%), foi o único com o percentual de similaridade acima de 80%, (Figura 23 e Tabela 7). Os outros compostos identificados apresentaram similaridade abaixo de 80%, quando comparados aos dados da Nist Research Library (Tabela 7).

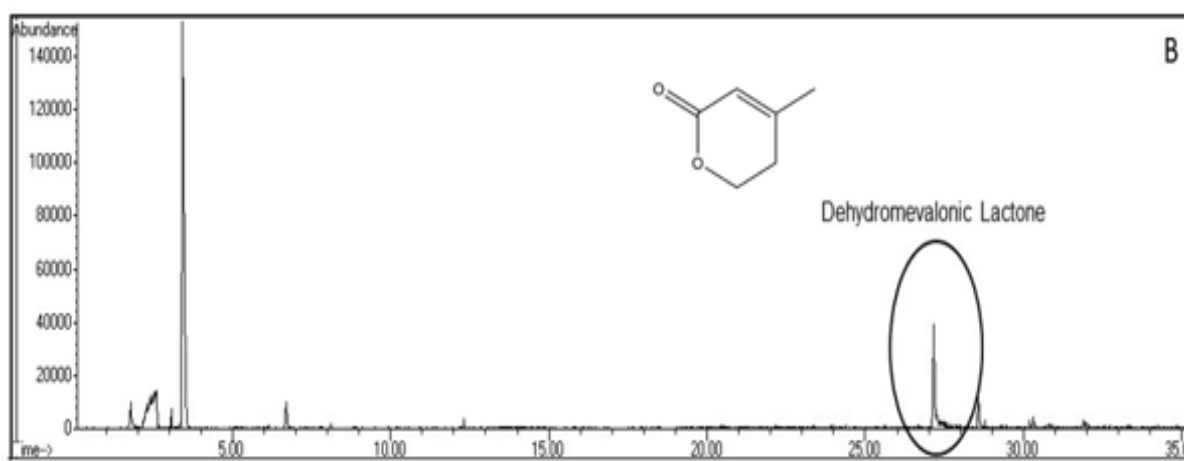


Figura 23 - Cromatograma obtido por GC-MS do EDMNF, mostrando o constituinte identificado como Lactona desidromevalônica, com 93,3% similaridade, quando comparado aos dados da Nist Research Library. (x= tempo e eixo Y = abundância)
Fonte: A autora (2022).

Tabela 7 – Resultado da análise qualitativa do EDMNF, mostrando o constituinte identificado como Lactona desidromevalônica, conforme detectado por GC-MS e comparado com a biblioteca NIST

Pico	tR médio (Min)	Similaridade (%) no banco de dados NIST	Massa molar (M/z)	Fórmula molecular	Nome do composto
(Fig. 1)	27,2	93,3%	112.05	C ₆ H ₈ O ₂	Lactona desidromevalônica

Legenda: tR: tempo de retenção. Fonte: A autora (2021).

O composto com similaridade > 80 % identificado no EDMNF, a Lactona desidromevalônica foi relatado por Krings *et al.* (2006), isolado a partir dos extratos Soxhlet de cacau em pó, como um composto volátil, conhecido por transmitir fragrância. Lactona desidromevalônica já foi caracterizada na literatura e, identificada em extratos vegetais, que apresentaram atividade antioxidante (BERWAL *et al.*, 2021; OKOKON *et al.*, 2013), em fungos multicelulares (HUANG *et al.*, 2019; KUMLA *et al.*, 2017; MALONZO *et al.*, 2018; VIDYALAKSHMI *et al.*, 2009), e em fungos endofíticos (ANISHA; RADHAKRISHNAN, 2017; YING *et al.*, 2014).

Estudos mostram duas lactonas isoladas de fungos endofíticos com atividade anti-inflamatória. *Lasiodiplactone A*, lactona obtida a partir do fungo endofítico de mangue, *Lasiodiplodia theobromae*, demonstrou atividade anti-inflamatória inibindo a produção de óxido nítrico (NO) em linhagens celulares RAW 264,7 estimuladas por LPS, com valor de IC₅₀ de 23,5µM (CHEN *et al.*, 2017). Phomol, o primeiro metabólito de origem endofítica com atividade anti-inflamatória, foi isolada de *Phomopsis sp.*, um fungo endofítico da planta medicinal *Erythrina crista-galli*. Esta lactona mostrou atividade anti-inflamatória no ensaio de edema de orelha em ratos com inibição de 53,20% (WEBER *et al.*, 2004).

5.3 ESTUDO DO EDMNF EM ZEBRAFISH ADULTO

5.3.1 Avaliação da toxicidade aguda oral e determinação da DL50

A toxicidade aguda refere-se aos efeitos adversos que ocorrem após a administração oral de uma única dose de uma substância ou de múltiplas doses administradas em 24 horas (OECD 425). Determinar a toxicidade do composto testado é uma etapa crucial nos estudos, uma vez que será a base para os ensaios biológicos. Neste ensaio de toxicidade aguda, foi proposto a determinação da DL50, que tradicionalmente é um dos parâmetros para avaliação da toxicidade aguda e, também se avaliou as alterações comportamentais e histopatológicas ocasionadas após a administração do EDMNF.

Como modelo toxicológico, tanto o *zebrafish* adulto quanto seus embriões e larvas, são cada vez mais utilizados para a triagem de toxicidade no desenvolvimento de drogas e produtos (CASSAR *et al.*, 2020). Souza *et al.* (2016), Carvalho *et al.* (2018), Borges *et al.* (2018); Ferreira *et al.* (2019) e Quitian-Useche *et al.* (2021)

demonstraram que o *zebrafish* adulto é um modelo ideal para avaliar toxicidade aguda, assim como, o tratamento via oral (método gavagem), é um método eficiente para avaliar o potencial tóxico de substâncias naturais ou químicas (QUITIAN-USECHE *et al.*, 2021).

Segundo OECD 425, nas situações em que há pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade da substância a ser testada, ou uma estimativa preliminar da DL50 ou nas quais se espera que o material de teste seja tóxico, o teste principal deve ser realizado, a dosagem deve ser iniciada com 175mg/kg. Conforme descrito, as doses selecionadas para o ensaio de toxicidade aguda seguiram de acordo com a OECD 425: 175mg/kg, 550mg/kg e a dose máxima 2000mg/kg.

Os animais foram observados cuidadosamente por um período de 3-6h quanto a manifestação de algum sinal de toxicidade ou morte. Em seguida, foram observados após 24 e 48 horas, conforme descrito por Souza *et. al.* (2016). O teste é encerrado quando um dos critérios de parada é atendido primeiro (OECD 425). No caso deste estudo, o primeiro critério de parada foi atendido, ou seja, 3 animais consecutivos sobreviveram no limite superior (dose 2000mg/kg), ao longo do experimento e após 48h de observação.

Com base nos resultados, o tratamento por via oral com EDMNF nas doses de 175, 550 e 2000mg/kg, não apresentou toxicidade aguda em *zebrafish* adultos. Todos os animais sobreviveram, inclusive na dose máxima, então, determinou-se que a DL50 está acima da dose de 2000mg/kg. De acordo com a OECD 425 o EDMNF pode ser classificado na categoria 5 (> 2000-5000mg/kg), que se destina a identificação de substâncias que apresentam um perigo de toxicidade aguda relativamente baixa, mas que, em certas circunstâncias, podem representar um perigo para populações vulneráveis.

Abutaha *et al.*, (2015) determinaram a toxicidade aguda do extrato bruto do endófito fúngico *Cochliobolus spicifer*, isolado de tamareira, em embriões de *zebrafish*, os resultados demonstraram que o extrato fúngico não induziu nenhum sinal de toxicidade nos embriões.

Baskar *et al.*, (2020) realizaram ensaio de toxicidade aguda em embriões de *zebrafish*, tratados com extrato de acetato de etila de micélio de *A. tamarii*, fungo endofítico isolado de *Opuntia ficus-indica*. Os embriões apresentaram redução

significativa no comprimento corporal e na contagem dos batimentos cardíacos, quando comparados ao grupo controle.

Onah *et al.*, (2020) consideram que a determinação da toxicidade de metabólitos de organismos endofíticos isolados de plantas medicinais conhecidas são essenciais para uma posterior aplicação farmacológica e biológica. Neste sentido, EDMNF demonstrou ser seguro e atóxico em doses altas para *zebrafish* adulto.

5.3.1.1 Análise comportamental

No presente estudo, as alterações comportamentais foram utilizadas como um dos parâmetros para análise de toxicidade aguda do EDMNF. Segundo Ribeiro (2013), ao entrarem em contato com qualquer substância tóxica ou quando submetidos a condições desfavoráveis, os *zebrafish* adultos podem apresentar respostas fisiológicas compensatórias pelo mecanismo de estresse, na tentativa de sobreviver (AMORIM, 2014; DONATTI, 2016; VENTURINI, 2010; WOLFF; SANTOS, 2019). Como resultado, o equilíbrio homeostático do animal é comprometido, sofrendo alterações a nível funcional, tecidual e comportamental, podendo até chegar à morte, quando essas alterações excedem os limites toleráveis pelo animal (CHROUSOS, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2013; SANTOS, 2019; ROTTMANN; FRANCIS-FLOYD; DURBOROW, 1992).

Além disso, nos últimos anos, o *zebrafish* adulto também destacou-se como um importante modelo comportamental para estudos toxicológicos e farmacológicos, diversas pesquisas estabeleceram parâmetros e protocolos comportamentais para *zebrafish* adulto (KALUEFF; STEWART, GERLAI, 2014; OLIVEIRA, 2020). A caracterização das alterações comportamentais em modelos experimentais, assim como no *zebrafish* adulto, são importantes para o entendimento e elucidação complementar sobre os efeitos da substância ou fármaco testado (MUSSULINI *et al.*, 2013).

O tratamento com EDMNF induziu alterações comportamentais nos animais, quando avaliados por 48 horas. Em todos os grupos tratados com EDMNF nas doses de 175, 550 e a dose máxima 2000mg/kg, logo após a administração (0h), todos os animais apresentaram, a alteração de estágio I: aumento de atividade natatória. Os animais tratados com a dose de 175mg/kg apresentaram apenas uma alteração

comportamental, sendo do estágio I, aumento de atividade natatória, até a terceira hora (3h) de experimento, após isto, se recuperaram e nadaram normalmente.

Os animais tratados com a dose de 550mg/kg, apresentaram alterações comportamentais de estágio I e III, como aumento de atividade natatória (I) e deposição do animal no fundo (III). Sendo que, 30% apresentaram aumento de atividade natatória (I) e 60% apresentaram deposição no fundo (III) até 24h após o tratamento. E, nas 24 horas após o tratamento 30 % ainda apresentaram deposição no fundo (III). No grupo dos animais tratados com a dose máxima de 2000mg/kg, todos apresentaram alterações de estágio I, aumento de atividade natatória, nas primeiras 24h de experimento, após esse período recuperaram seu comportamento normal, conforme mostrado na tabela 8.

Tabela 8 - Alterações comportamentais após tratamento com EDMNF nas doses de 175, 550 e 2000mg/kg por via oral, em diferentes tempos de observação, no ensaio de toxicidade aguda

Tempo	Estágio	175 mg/kg	550 mg/kg	2000 mg/kg	Controle
0h	I	100% (1)	100% (1)	100% (1)	-
0h	II	-	-	-	-
0h	III	-	-	-	-
3h	I	100% (1)	-	-	-
3h	II	-	-	-	-
3h	III	-	-	-	-
6h	I	-	-	-	-
6h	II	-	-	-	-
6h	III	-	-	-	-
24h	I	-	30% (1)	100% (1)	-
24h	II	-	-	-	-
24h	III	-	60% (1)	-	-
48h	I	-	-	-	-
48h	II	-	-	-	-
48h	III	-	-	-	-

Os valores em porcentagem representam a quantidade de peixes que apresentaram as respectivas alterações comportamentais, do total de peixes analisados para cada grupo (N=5/grupo). Estágio I: 1) aumento da atividade natatória, 2) espasmos e tremores no eixo da cauda. Estágio II: 1) natação

circular; 2) perda de equilíbrio. Estágio III: 1) deposição do animal no fundo 2) perda de motilidade; 3) morte. Fonte: A autora (2022)

Ribeiro (2013) ao avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico de Jambu em modelo zebrafish adulto, verificou que a maior concentração testada (170µg/mL) via imersão, ocasionou expressivas alterações comportamentais. Primeiramente os animais apresentaram um aumento da atividade natatória, seguido por tremores no eixo da cauda e perda da motilidade/postura, logo permaneceram no fundo do aquário até a morte.

Souza (2015) do mesmo modo, observou que, altas concentrações causam expressivas alterações comportamentais. Na avaliação da toxicidade aguda da nanoemulsão de álcool perílico (NPOH) via imersão, a concentração mais elevada (125µg/mL), ocasionou alterações como: aumento da atividade de nado, tremores no eixo da cauda, perda da motilidade/ postura deposição do animal no fundo do aquário e mortes.

Santos (2016) avaliou a toxicidade aguda de uma fitopreparação a base de leite de janaguba (*Himatanthus drasticus*) (FPLJ), via imersão, no modelo zebrafish adulto. Na concentração mais elevada da FPLJ (1500µg/mL), severas alterações comportamentais foram observadas, como aumento na atividade de nado, tremores no eixo da cauda, perda da motilidade, perda de postura, deposição do animal no fundo do aquário e inclusive alguns animais morreram. Além destas manifestações a respiração superficial dos peixes também foi observada.

Na avaliação da toxicidade aguda de amidas graxas obtidas do óleo de *Bertholletia excelsa* (AGOC) por via oral, realizada por Quitian-Useche *et al.* (2021), os zebrafish adultos que receberam a maior dose (1000mg/kg) apresentaram aumento de atividade natatória, tremores no eixo da cauda e deposição no fundo do aquário. No entanto, todos os animais sobreviveram após 48h de observação.

De modo geral, neste estudo, os animais apresentaram apenas dois tipos de alterações comportamentais: aumento de atividade natatória e deposição no fundo do aquário. A alteração comportamental mais evidente foi o aumento da atividade natatória, presente em todos os animais de todos grupos, sendo apresentada em até 24h de experimento. Segundo Huang *et al.* (2014), Borges *et al.* (2018) e Custódio de Souza *et al.* (2019), esta alteração ocorre, pois quando o animal entra em contato com substâncias estranhas, como neste caso, o tratamento via oral com EDMNF, desencadeia o seu primeiro mecanismo de defesa, caracterizado pelo comportamento

de fuga, na tentativa de diminuir a probabilidade de morte. Apenas os animais que receberam a dose de 550mg/kg apresentaram deposição no fundo do aquário, nas 24h após a administração do EDMNF. De acordo com Souza *et al.* (2016), pode ocorrer um comportamento de economia do gasto metabólico para que o animal consiga manter a homeostasia fisiológica.

5.3.1.2 Análise histopatológica

A histopatologia é um método sensível e eficaz utilizada para avaliação e diagnóstico dos efeitos tóxicos que afetam os tecidos animais (ALBINATI *et al.*, 2009; HEATH, 1995; LINS *et al.*, 2017; SCHWAIGER *et al.*, 1997) e, quando associada a outros métodos de análise, como o Índice de Alteração Histopatológica (IAH), utilizado para determinar os níveis de alterações/lesões e o comprometimento funcional do órgãos analisados, podem auxiliar na compreensão profunda dos efeitos tóxicos diretos e indiretos (SOUZA *et al.*, 2016). Além disto, Carvalho *et al.* (2018) considera o *zebrafish* útil para avaliação dos efeitos tóxicos de substâncias através do estudo histopatológico dos órgãos danificados. Neste contexto, observou-se o efeito do EDMNF nos tecidos hepático, intestinal e renal.

Apesar dos animais apresentarem comportamento de estresse após o tratamento com EDMNF, na análise histopatológica, os órgãos analisados não apresentaram danos ao nível dos tecidos, que compromettesse o funcionamento normal do órgão.

Os resultados da análise do tecido hepático demonstraram que todas as doses apresentaram apenas alterações de estágio I, como, perda ou atipia do contorno nuclear, intensa vacuolização citoplasmática e aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos. Esta última alteração foi demonstrada apenas no grupo que foi administrado a dose de 2000mg/kg (Figura 24). No que se refere ao índice de alterações histopatológicas (IAH), todas as doses 175mg/kg (1.66 ± 0.57), 550mg/kg (1.66 ± 0.57) e 2000mg/kg (2.66 ± 0.57) apresentarem valores entre 0 a 10, indicando normalidade neste órgão (Figura 25 e Tabela 9).

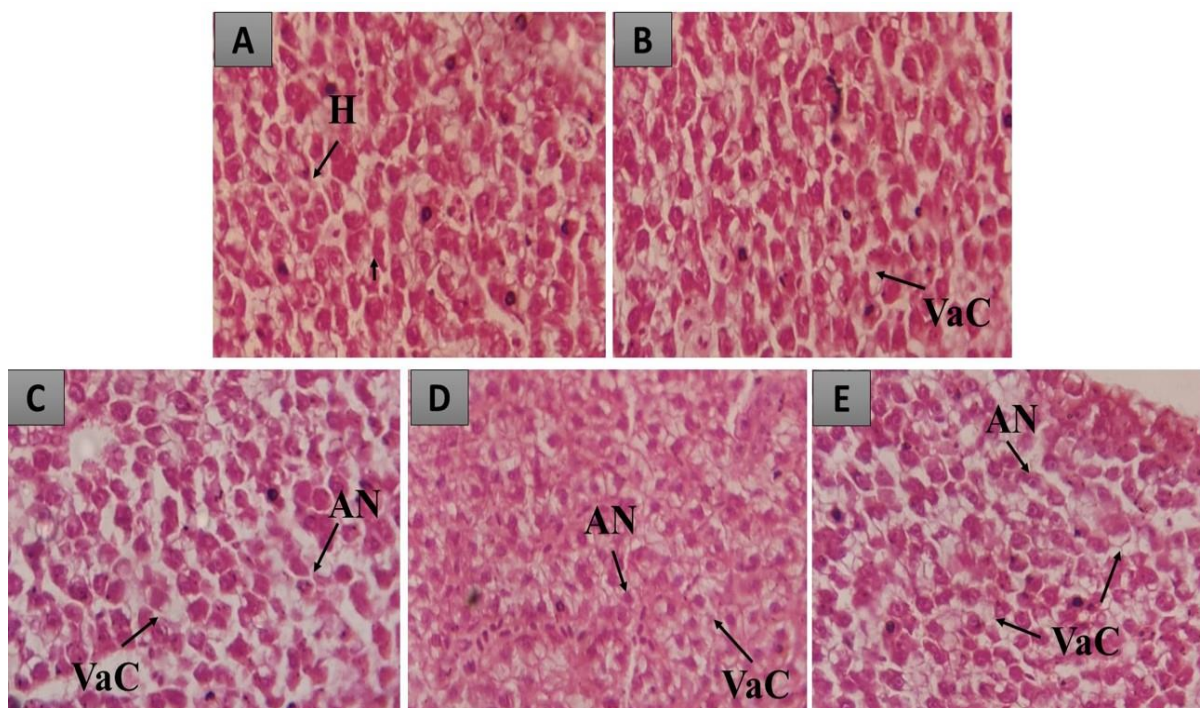


Figura 24 - Seção longitudinal do fígado de zebrafish (*Danio rerio*) adulto, mostrando as principais alterações observadas no teste de toxicidade aguda por via oral do EDMNF. **A** refere-se ao tecido hepático normal, **H** hepatócitos. **B** refere-se ao tecido hepático do grupo controle (solução salina), **VaC** intensa vacuolização citoplasmática. **C, D e E** refere-se ao tecido hepático dos grupos tratados com as dose de 175, 550 e 2000 mg/kg respectivamente, com **AN** atrofia nuclear, **VaC** intensa vacuolização citoplasmática. Todas as figuras foram aumentadas em 400 x, H e E.
Fonte: A autora (2022).

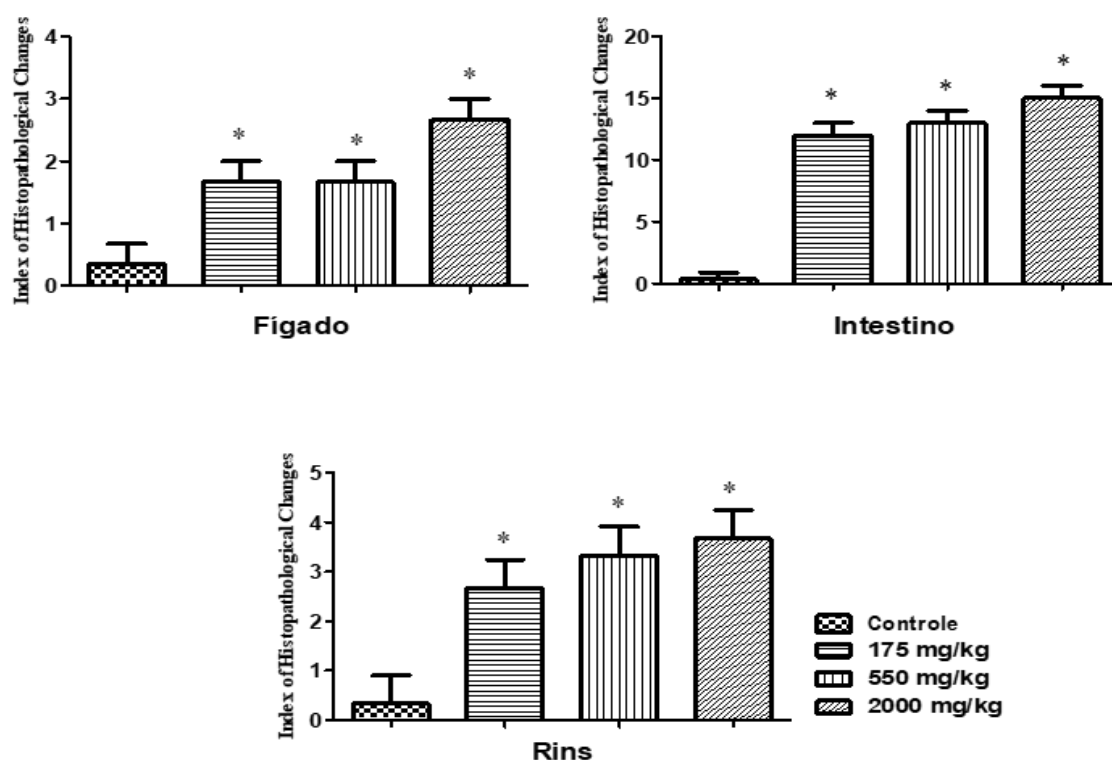


Figura 25 - Efeito do tratamento com EDMNF nas doses de 175, 550 e 2000mg/kg sobre o Índice de alterações histopatológicas em fígado, intestino e rins de zebrafish (*Danio rerio*) adultos, no teste de toxicidade aguda oral. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP (n=3/ grupo); * $p < 0,05$ para

grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste posthoc de Tukey.

Fonte: A autora (2022).

Tabela 9 - Distribuição dos valores de IAH para cada órgão de *zebrafish* adulto, no teste de toxicidade oral aguda do EDMNF, de acordo com as doses utilizadas

Órgãos (IAH)	Controle	EDMNF 175 mg/kg	EDMNF 550 mg/kg	EDMNF 2000 mg/kg
Fígado	0,33±0,57	1,66±0,57	1,66±0,57	2,66±0,57
Intestino	0,33±0,57	12,00±1,00	13,00±1,00	15,00±1,00
Rins	0,33±0,57	2,66±0,57	3,33±0,57	3,66±0,57

Fonte: A autora (2022).

No tecido intestinal, todas as doses apresentaram as seguintes alterações de estágio I: hipertrofia das células epiteliais, infiltração linfocitária estromal e infiltração de leucócito e, somente os animais que receberam a dose de 2000mg/kg apresentaram dilatação dos vasos presentes nas vilosidades e hiperplasia das células Caliciformes. Todas a doses testadas apresentaram apenas uma alteração de estágio II, o deslocamento da lâmina própria (Figura 26). O tecido intestinal apresentou alterações com IAH de 12.0±1.00, 13.0±1.00 e 15.0±1.00, para as doses de 175, 550 e 2000 mg/kg, respectivamente (Figura 25 e tabela 9), indicando que este órgão apresentou alterações leves a moderadas.

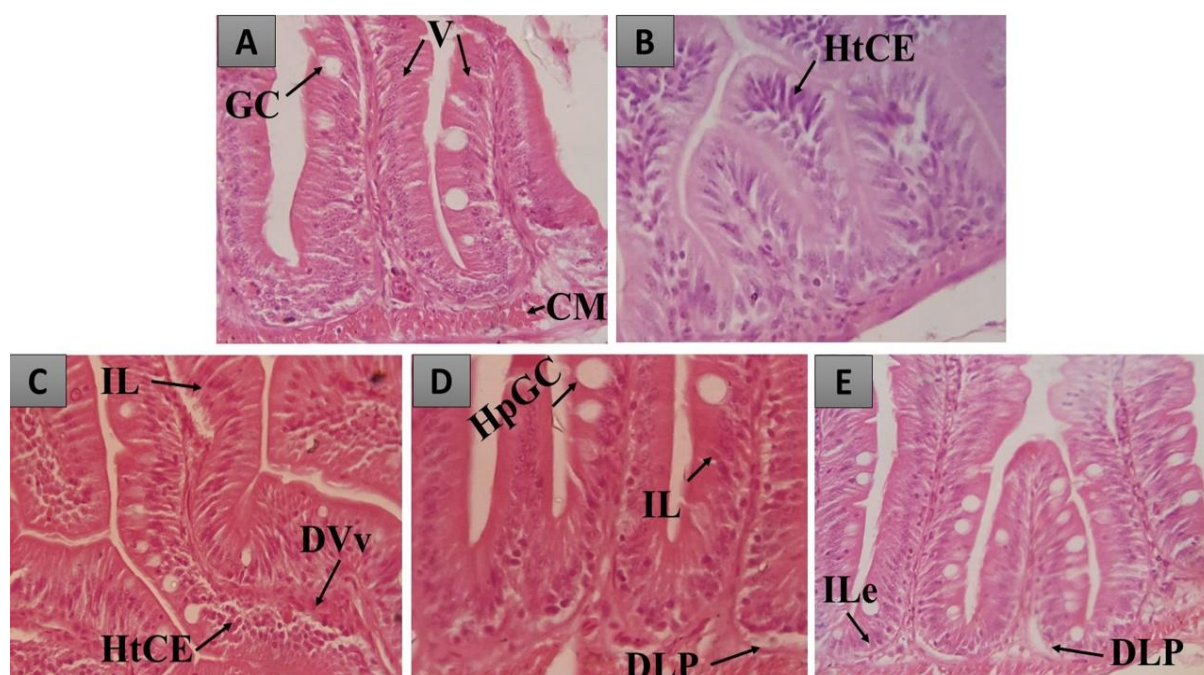


Figura 26 - Seção longitudinal do intestino de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, mostrando as principais alterações observadas no teste de toxicidade aguda por via oral do EDMNF. A refere-se ao tecido intestinal normal. B refere-se ao tecido intestinal do grupo controle (solução salina), mostrando HTCE hipertrofia das células epiteliais. C, D e E mostrando tecido hepático dos grupos tratados com as doses de 175, 550 e 2000 mg/kg, respectivamente, com HTCE hipertrofia das células epiteliais, IL infiltração linfocitária, ILE infiltração de leucócitos, DVV dilatação dos vasos presentes nas vilosidades. Todas as figuras foram aumentadas em 400 x, H e E.
Fonte: A autora (2022).

No tecido renal foi observado que as alterações de estágio I, degeneração hialina tubular leve, diminuição do espaço da cápsula de Bowman e dilatação dos capilares glomerulares, foram presentes em todas as doses testadas. A alteração, hipertrofia das células tubulares (estágio I), foi encontrada apenas nos animais que receberam as doses de 175 e 2000mg/kg (Figura 27). Os valores de IAH (2.66 ± 0.57 , 3.33 ± 0.57 , 3.66 ± 0.57), para as doses de 175, 550 e 2000mg/kg, respectivamente, indicam que os rins permaneceram funcionalmente normais (Figura 25 e tabela 9).

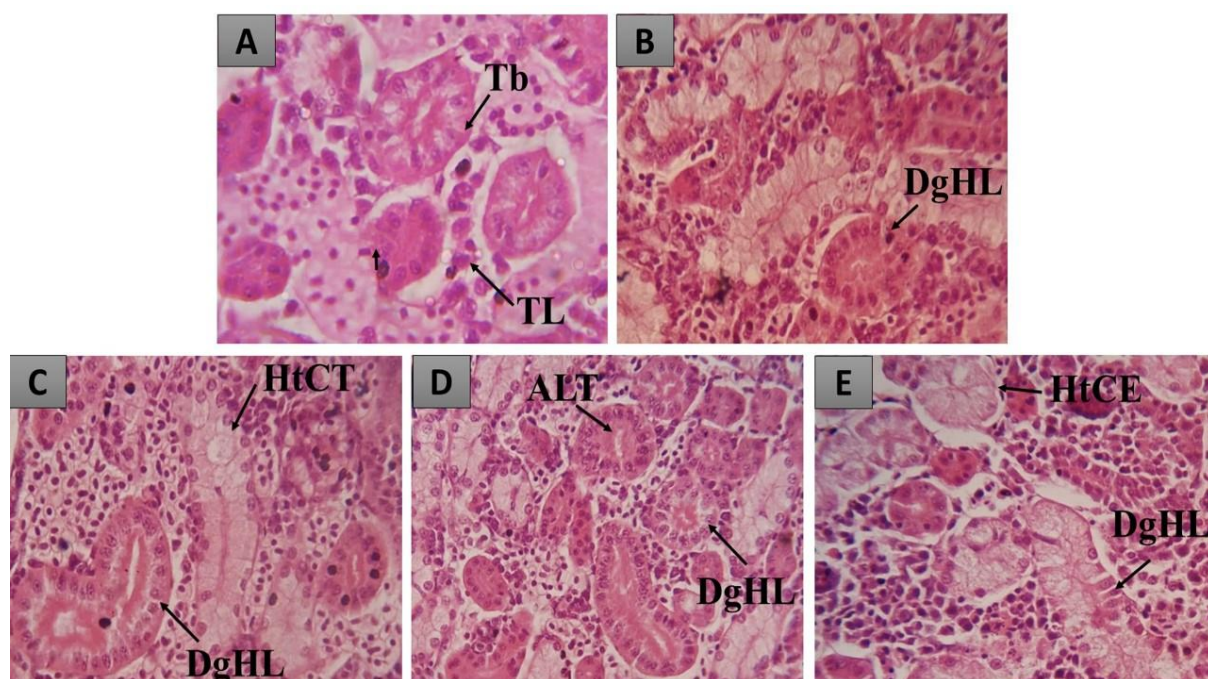


Figura 27 - Seção longitudinal do rim de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, mostrando as principais alterações observadas no teste de toxicidade aguda por via oral do EDMNF. A refere-se ao tecido renal normal. B refere-se ao tecido renal do grupo controle (solução salina). C, D e E refere-se ao tecido renal dos grupos tratados com as doses de 175, 550 e 2000 mg/kg, DGHHL degeneração hialina tubular leve, HtCT hiperplasia das células tubulares, ALT aumento do lúmen tubular, HTCE hipertrofia das células tubulares. Todas as figuras foram aumentadas em 9400, H e E.
Fonte: A autora (2022).

Avaliando estes resultados, observou-se que apenas o intestino apresentou alterações classificadas como leves a moderados, que segundo Carvalho *et al.* (2018) pode ser explicado, pelo fato do intestino, ser o primeiro órgão a entrar em contato com a substância administrada via oral e, os danos ocorrem principalmente a mucosa

intestinal, alterando a fisiologia do órgão. A hipertrofia de células epiteliais, alteração observada em todos os grupos tratados com EDMNF, é considerada por Takashima e Hibiya (1984) como um mecanismo de defesa, servindo como barreira para reduzir a entrada de substâncias estranhas no epitélio intestinal.

5.3.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EDMNF no teste de edema abdominal induzido por diferentes agentes inflamatórios

A utilização de agentes inflamatórios, como carragenina, dextrana, histamina, prostaglandinas, entre outros, em ensaios de inflamação aguda permitem avaliar a ação anti-inflamatória de diferentes substâncias e/ou extratos (COELHO DE SOUZA *et al.*, 2021)

5.3.2.1 Inibição de edema abdominal induzido por carragenina

Para avaliar a atividade anti-inflamatória do EDMNF utilizou-se o teste de edema abdominal induzido por carragenina em *zebrafish* adulto. Neste ensaio, validado por Huang *et al.* (2014), a resposta inflamatória é caracterizada por formação de edema na região abdominal, como resultado da regulação das proteínas pró-inflamatórias e do acúmulo de células no sítio inflamatório. Além disso, foi relatado que após a injeção da carragenina no peritônio dos animais, ocorre a liberação de vários mediadores inflamatórios (TNF- α e iNOS), indução dos sintomas característicos da inflamação aguda e, que medicamentos anti-inflamatórios clinicamente eficazes, foram capazes de inibir a resposta inflamatória causada pela carragenina em *zebrafish* adulto (HUANG *et al.*, 2014).

Os resultados dos tratamentos com EDMNF testados neste modelo de inflamação induzido por carragenina, estão demonstrados na figura 28. A administração intraperitoneal de carragenina induziu significativamente ($p > 0,01$) o edema abdominal no grupo controle negativo Cg (aplicado carragenina i.p.), quando comparado ao grupo controle PBS (aplicado PBS i.p.), demonstrando que o PBS (substância utilizada para solubilizar a carragenina) não interfere e/ou contribui na ação inflamatória da carragenina e, também, a viabilidade da metodologia. Assim como, a injeção de carragenina (i.p.) induziu o edema abdominal no grupo controle Vh (veículos do fármaco padrão Indometacina, v.o.), quando comparado ao grupo controle positivo Ind (Indometacina 10 mg / Kg, v.o.), mostrando que as substâncias utilizadas

como veículo não interferem e/ou contribuem para o efeito anti-inflamatório da Indometacina.

EDMNF apresentou efeito inibitório em todas as doses (10-2000mg/kg) no pico máximo do edema (0-5h). A dose de 2000mg/kg teve o maior efeito inibitório, reduzindo o edema em 75,42%, 1000mg/kg (73,04%), 500mg/kg (63,88%), 100mg/kg (60,99%) e 10mg/kg (47,17%). Desta forma, o efeito inibitório do EDMNF possui uma tendência a um comportamento dose-dependente. Comparando as maiores doses testadas (2000mg/kg e 1000mg/kg) do EDMNF, que também apresentaram os maiores efeitos inibitórios, com o grupo controle positivo (controle Ind), que reduziu o edema ($p < 0,05$) com 68,20% de inibição, pode-se observar que o EDMNF revelou um perfil de redução do edema semelhante e até superior ao controle positivo (figura 28).

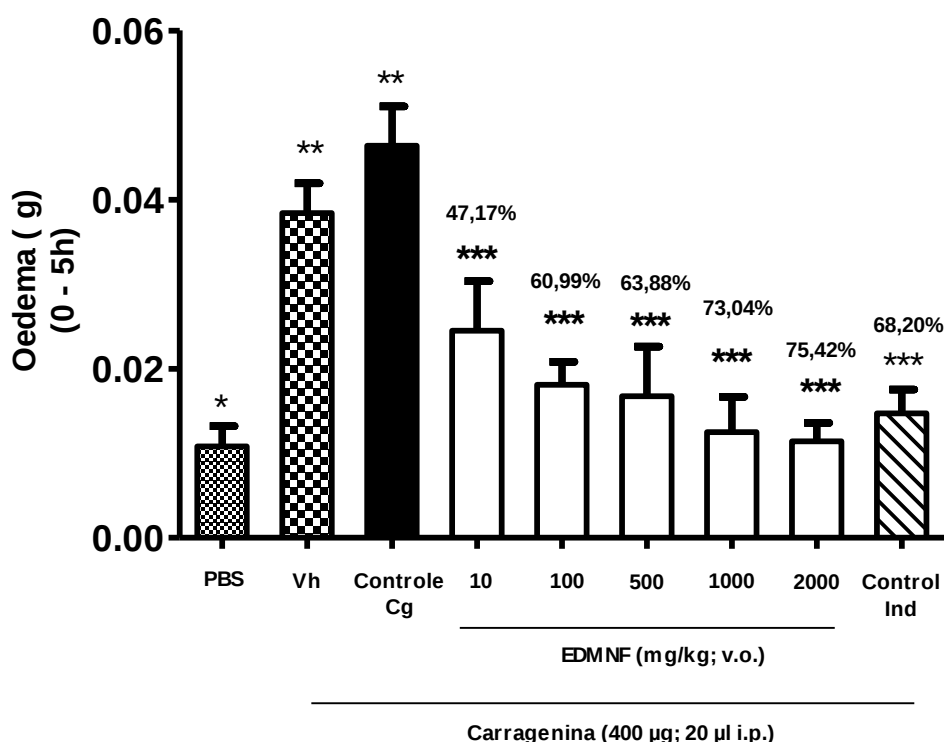


Figura 28 - Efeito da administração por via oral do EDMNF nas doses de 10, 100, 500, 1000 e 2000mg/kg sobre o edema abdominal induzido por carragenina em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos. As colunas representam a média $\pm$ erros padrão da média ($n=12$ /grupo) no pico máximo do edema (0-5h). Os números acima da barra indicam a porcentagem de inibição do edema. ANOVA de uma via com teste post-hoc Tukey (* $p \leq 0,01$ para controle PBS; ** $p > 0,01$ para controle Cg vs. Controle PBS e controle Vh vs. controle Ind; *** $p < 0,05$ para EDMNF e controle Ind vs. Controle Cg). Fonte: A autora (2022).

Diante dos resultados positivos, obtidos com EDMNF neste ensaio de inflamação e, considerando que, a formação do edema induzido por carragenina é

multifásico e mobiliza diferentes mediadores inflamatórios (COELHO DE SOUZA *et al.*, 2021), buscou-se avaliar especificamente os mediadores envolvidos nesta resposta. Então, uma vez que, a primeira fase do edema induzido por carragenina, que ocorre nos primeiros 60 minutos, está essencialmente associada a liberação de histamina/serotonina (REIS *et al.*, 2000), investigou-se o efeito do EDMNF na redução do edema abdominal induzido pelo agente inflamatório dextrana.

5.3.2.2 Inibição de edema abdominal induzido por dextrana

A dextrana é um agente inflamatório amplamente utilizado nos ensaios de inflamação aguda em roedores e, é reconhecida pela capacidade de liberar os mediadores inflamatórios histamina e serotonina a partir da desgranulação dos mastócitos (COELHO DE SOUZA *et al.*, 2021). Oehlers *et al.* (2012, 2013) utilizaram dextran sulfato de sódio, ou DSS, um polissacarídeo ramificado sulfatado sintético derivado de dextrana, para a indução de inflamação intestinal em larvas de *zebrafish*. Este modelo de inflamação por DSS tem sido utilizado para avaliar o potencial terapêutico de diversas substâncias para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, como a colite e doença de Crohn (OEHLERS *et al.*, 2013).

Para esta série experimental EDMNF foi utilizado na dose de 80 mg/kg (DE50), e apresentou efeito inibitório frente ao edema induzido por dextrana, conforme mostrado na figura 29. A administração intraperitoneal de dextrana induziu significativamente ($p > 0,01$) o edema abdominal no grupo controle negativo Dex, (aplicado dextrana i.p.), quando comparado ao grupo controle SS (aplicado solução salina i.p.), demonstrando a viabilidade da metodologia.

EDMNF inibiu significativamente o edema abdominal induzido por dextrana no seu pico máximo (0-1h30), com 71,71% de inibição (Figura 29). Em comparação ao grupo controle positivo (controle Cp) que apresentou 69,97% de inibição ($p < 0,05$), EDMNF apresentou resultado semelhante.

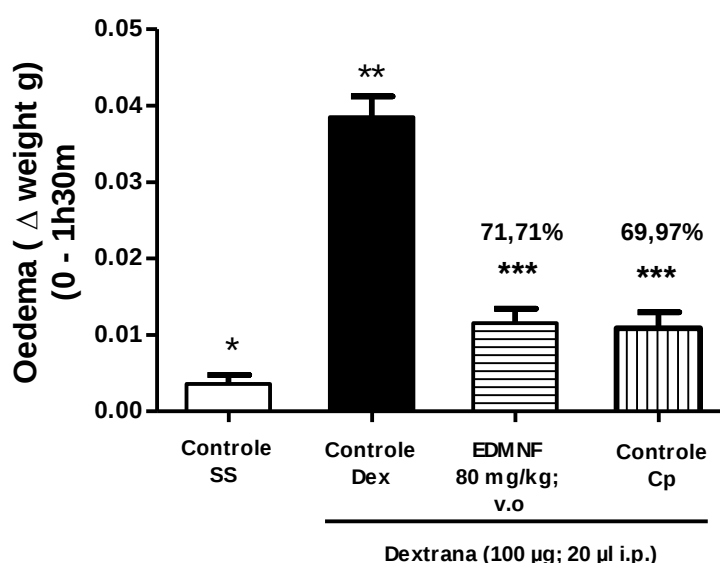


Figura 29 - Efeito da administração por via oral do EDMNF na dose de 80mg/kg (DE50) sobre o edema abdominal induzido por dextrana em zebrafish (*Danio rerio*) adultos. As colunas representam a média $\pm$ erros padrão da média (n=9/grupo), no pico máximo do edema induzido por dextrana (0-1h30). Os números acima da barra indicam a porcentagem de inibição do edema. ANOVA de uma via com teste post-hoc Tukey (*p < 0,01 para controle SS, **p > 0,01 para controle Dex vs. Controle SS; ***p < 0,05 EDMNF e controle Cp vs. Controle Dex).
Fonte: A autora (2022).

EDMNF evidenciou um efeito antiedematogênico em modelos de inflamação aguda (carragenina e dextrana) que produzem edema por diferentes mecanismos. A dextrana, sendo um polissacarídeo de alto peso molecular, promove um edema osmótico e acelular, a partir da desgranulação dos mastócitos, liberando os mediadores inflamatórios histamina e serotonina, que agem sobre seus respectivos receptores (H1, H2 e 5HT2), promovendo o aumento da permeabilidade vascular e acúmulo de líquidos. A carragenina, um polissacarídeo sulfatado extraído de algas, induz uma resposta inflamatória caracterizada principalmente pela presença de fluido celular com diferentes tipos celulares, que são liberados de acordo com as seguintes fases: a primeira fase, que acontece nos primeiros 60 min após a injeção de carragenina, havendo a liberação de histamina e serotonina, a segunda fase (61-120 min), ocorre a liberação de quininas, e na terceira fase (121-180min) ocorre a liberação principalmente de prostaglandina (COELHO DE SOUZA *et al.*, 2021).

Assim, a fim de esclarecer a influência do EDMNF sobre os mediadores inflamatórios e seu efeito antiedematogênico e, levando em consideração que, o EDMNF reduziu o edema induzido por dextrana (fase inicial) e carragenina (fase tardia), onde a histamina e prostaglandina desempenham um papel preponderante

(HATA; BREYER, 2004; THURMOND; GELFAND, DUNFORD, 2008), sua interferência sobre estes mediadores do processo inflamatório foram investigados.

5.3.2.3 Inibição de edema abdominal induzido por histamina e prostaglandina E2 (PGE2)

A histamina é um importante mediador químico inflamatório, responsável por diversos efeitos na inflamação aguda, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, formação de edema, contração do músculo liso (THURMOND; GELFAND, DUNFORD, 2008).

A PGE2 apresenta potente atividade vasodilatadora, liberada tanto por células residentes quanto por estímulos inflamatórios, logo nas primeiras horas após o estímulo introduzido no organismo, tem papel fundamental na vasodilatação durante a formação do edema de pata induzido por carragenina (SOLOMON; JUHLIN, KIRSCHENBAUM, 1968; CLAUDINO, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A inflamação induzida pelos mediadores histamina e PGE2, no ensaio de edema de pata utilizando roedores, é um modelo estabelecido e validado para estudar processos inflamatórios (GUEDES *et al.*, 2020; PERIANAYAGAM SHARMA, PILLAI, 2006; TAMADDONFARD; FARSHID, HOSSEINI, 2012), contudo, a utilização de ambos, em ensaio de indução de edema abdominal em modelo *zebrafish* adulto, ainda não havia sido relatado.

Para esta série experimental EDMNF foi utilizado na dose de 80mg/kg (DE50), e apresentou efeito inibitório frente ao edema induzido por histamina e PGE2, conforme mostrado na figura 30 e 31. A administração intraperitoneal de histamina e PGE2 induziu significativamente ($p > 0,01$), o edema abdominal nos grupo controle negativo Hist e PGE2 (aplicado histamina e PGE2 i.p.), quando comparado ao grupo controle SS (aplicado solução salina i.p.), demonstrando a viabilidade da metodologia.

EDMNF apresentou efeito inibitório para histamina de 58,58%. Quando comparado ao grupo controle positivo (controle Cp) que apresentou 74,33% de inibição ($p < 0,05$), observou-se que o EDMNF teve efeito inibitório menor que o controle positivo (Figura 30).

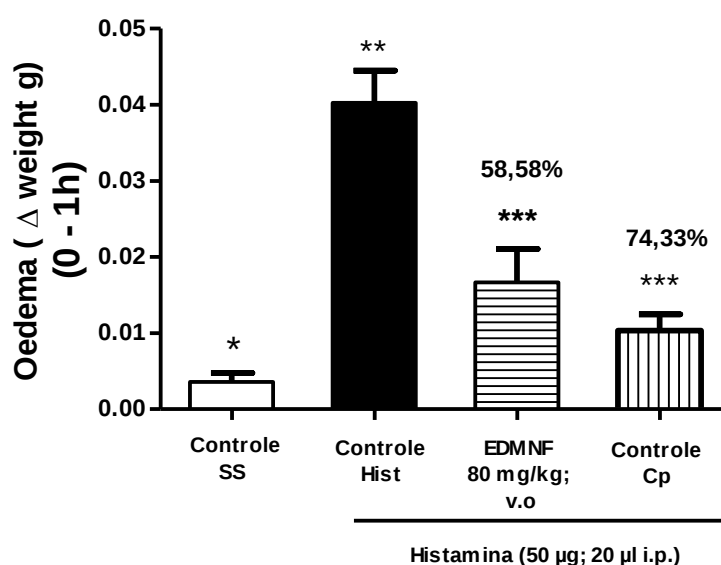


Figura 30 - Efeito da administração por via oral do EDMNF na dose de 80 mg/kg (DE50) sobre o edema abdominal induzido por histamina em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos. As colunas representam a média $\pm$ erros padrão da média (n=9/grupo), no pico máximo do edema induzido por histamina (0-1h). Os números acima da barra indicam a porcentagem de inibição do edema. ANOVA de uma via com teste post-hoc Tukey (*p < 0,01 para controle SS, **p > 0,01 para controle Hist vs. Controle SS; ***p < 0,05 para EDMNF e controle Cp vs. Controle Hist).
Fonte: A autora (2022).

No teste de edema abdominal induzido por PGE₂, EDMNF apresentou um potencial de inibição (p $\geq$ 0,05) de 53,33% e, quando comparado ao seu controle positivo (controle Ind) que inibiu o edema 55,55%, observou-se um perfil semelhante de redução de edema (Figura 31).

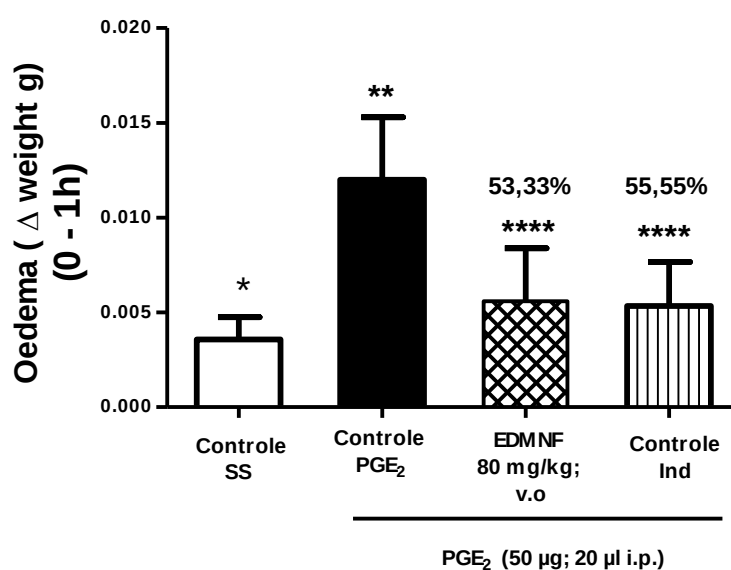


Figura 31 - Efeito da administração por via oral do EDMNF na dose de 80 mg/kg (DE50) sobre o edema abdominal induzido por PGE₂ em *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos. As colunas representam a média $\pm$ erros padrão da média (n=9/grupo), no pico máximo do edema induzido por prostaglandina (0-1h). Os

números acima da barra indicam a porcentagem de inibição do edema. ANOVA de uma via com teste post-hoc Tukey (*p < 0,01 para controle SS, **p > 0,01 para controle PGE₂ vs. Controle SS; ****p ≥ 0,05 para EDMNF e controle Cp vs. Controle PGE₂).
Fonte: A autora (2022).

Os testes realizados com tratamento do EDMNF (DE50 80mg/kg), frente ao edema induzido pelos agentes histamina e PGE₂, também se mostraram promissores. Em ambos, EDMNF foi capaz de inibir o edema no seu pico máximo, assim como, a comparação com o perfil de inibição produzido pelos respectivos fármacos padrões, utilizados como controle positivo (Indometacina e Ciproheptadina), foi semelhante, demonstrando a eficácia do EDMNF (Figuras 30 e 31).

Baseado nos efeitos promovidos pelo EDMNF, na inibição do edema induzido por dextrana e histamina e, considerando que a histamina é o principal mediador em ambos os ensaios, pode-se sugerir uma atividade anti-histamínica para EDMNF, permitindo inferir que o mesmo, pode estar inibindo a liberação de histamina dos mastócitos e/ou tecidual e/ou bloqueando os receptores de histamina (ANDRADE *et al.*, 2007).

No que se refere a inibição do edema promovido por carragenina e PGE₂, pode-se presumir que o efeito antiedematogênico do EDMNF foi determinado pelo efeito anti-inflamatório. O mecanismo desse efeito, por um lado, pode estar relacionado a inibição do aumento da permeabilidade vascular, que ocorre após a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, citocinas e prostaglandinas (COELHO DE SOUZA *et al.*, 2021), pois diversos estudos sugerem que a PGE₂ atua sinergicamente com outros mediadores, como a histamina e bradicinina, especialmente na contribuição à dor e edema associados com processos inflamatórios (ARMSTRONG; MARR, JONES, 1995; KINGSTON; GREAVES, 1985; WILLIAMS; HIGGS, 1988), assim como, pode ter ocorrido através de um efeito antagonista parcial ao efeito edematogênico desses mediadores inflamatórios (COELHO DE SOUZA *et al.*, 2021).

Portanto, analisando este conjunto de resultados, de acordo com Roome *et al.* (2008) e Coelho De Souza *et al.* (2021) é possível inferir que o EDMNF atue nos eventos vasculares e celulares da inflamação, provavelmente pela inibição da síntese, liberação e/ou ação destes mediadores sobre os seus respectivos receptores.

5.3.2.4 Análise comportamental

No presente estudo, a análise comportamental foi utilizada como uma ferramenta para avaliar a efetividade do EDMNF em prevenir as alterações comportamentais, apresentadas pelos animais após a injeção (i.p) de diferentes agentes inflamatórios (carragenina, dextrana, histamina e PGE2).

5.3.2.4.1 Teste de edema abdominal induzido por carragenina

Após a injeção de carragenina (i.p.), a cada uma hora, no período de 1 a 5 horas foram observados os parâmetros comportamentais, como mostrado na tabela 10. No grupo controle PBS (solução salina v.o e PBS i.p.), observou-se a presença das alterações comportamentais de estágio I e III. Na primeira hora, 51% dos animais apresentaram aumento de atividade natatória (I) e perda da motilidade (III). Na segunda e terceira hora, 17% apresentaram perda da motilidade. Na quarta e quinta 27% dos animais ainda apresentavam aumento de atividade natatória, perda da motilidade e tremores na cauda (I).

Tabela 10 - Alterações comportamentais em *zebrafish* adultos no teste de edema abdominal induzido por carragenina, avaliados durante o período de 1 a 5 horas

		1H	2H	3H	4H	5H
Controle PBS	Estágio I	1	-	-	1 e 2	1 e 2
	Estágio II	-	-	-	-	-
	Estágio III	2	2	2	2	2
	Total	51%	17%	17%	27%	27%
Controle Negativo (Cg)	Estágio I	1 e 2	-	1 e 2	2	-
	Estágio II	1	1 e 2	-	-	2
	Estágio III	1 e 2	2	1 e 2	1 e 2	2
	Total	94%	35%	52%	60%	26%
Controle Veículo (Vh)	Estágio I	1 e 2	1 e 2	1 e 2	1 e 2	1 e 2
	Estágio II	-	-	-	-	-
	Estágio III	2	2	2	2	2
	Total	92%	68%	67%	59%	59%
Controle Positivo (Ind)	Estágio I	1 e 2	2	-	-	-
	Estágio II	-	-	-	-	-
	Estágio III	2	2	2	2	2
	Total	43%	26%	34%	17%	17%
EDMNF 10 mg/kg	Estágio I	1 e 2	1 e 2	1 e 2	2	2
	Estágio II	-	-	-	-	-
	Estágio III	2	2	2	-	-

	Total	84%	43%	43%	25%	9%
EDMNF 100 mg/kg	Estágio I	1 e 2	2	2	2	-
	Estágio II	-	-	-	-	-
	Estágio III	2	2	2	2	-
	Total	43%	26%	26%	18%	0%
EDMNF 500 mg/kg	Estágio I	1 e 2	1 e 2	2	-	1 e 2
	Estágio II	-	-	2	-	-
	Estágio III	1 e 2	1 e 2	2	1 e 2	1 e 2
	Total	61%	77%	43%	34%	44%
EDMNF 1000 mg/kg	Estágio I	1 e 2	1	1 e 2	-	2
	Estágio II	-	-	-	-	-
	Estágio III	2	2	2	2	2
	Total	35%	50%	59%	25%	61%
EDMNF 2000 mg/kg	Estágio I	1 e 2	2	2	2	-
	Estágio II	-	-	-	-	-
	Estágio III	2	2	2	-	-
	Total	59%	26%	34%	9%	0%

Os valores em porcentagem representam a quantidade de peixes que apresentaram as respectivas alterações comportamentais, do total de peixes analisados para cada grupo (N=12/grupo). Estágio I: 1) aumento da atividade natatória, 2) espasmos e tremores no eixo da cauda. Estágio II: 1) natação circular; 2) perda de equilíbrio. Estágio III: 1) deposição do animal no fundo; 2) perda de motilidade; 3) morte.

Fonte: A autora (2022).

Os animais do controle negativo (Cg) (solução salina v.o e carragenina i.p.), apresentaram alterações comportamentais dos três estágios, na primeira hora de experimento, 94% dos animais apresentaram aumento de atividade natatória (I), tremores na cauda (I), natação circular (II), perda de equilíbrio (II), deposição no fundo

do aquário (III) e perda da motilidade (III). A partir da segunda hora observou-se a presença de alterações de estágio I e III, com uma redução dos valores percentuais para 35%. Na terceira e quarta hora, observou-se um aumento nos percentuais para 52% e 60%, respectivamente e os animais ainda apresentaram aumento de atividade natatória, tremores na cauda, perda da motilidade e a deposição no fundo. Na quinta hora este percentual diminuiu para 26%, no entanto, os animais ainda apresentaram perda de equilíbrio e deposição no fundo.

O grupo controle veículo (Vh) (veículos da Indometacina v.o e carragenina i.p.), durante todo o experimento, apresentou alterações de estágio I e III: aumento de atividade natatória (I), presença de tremores na cauda (I) e deposição do animal no fundo (III). Na primeira hora 92% dos animais apresentaram estas alterações e, observou-se que o percentual dos animais diminuiu ao longo do tempo, na segunda hora 68%, na terceira hora 67% e na quarta e quinta hora 59% dos animais ainda apresentavam estas alterações.

O grupo controle positivo (Ind) (Indometacina v.o e carragenina i.p.), na primeira e segunda hora foram observadas alterações de estágio I e III. Sendo que, na primeira hora, 43% dos animais apresentaram aumento de atividade natatória (I), tremores na cauda (I) e deposição no fundo do aquário (III). Na segunda hora 26% apresentaram tremores na cauda e deposição no fundo do aquário. A partir da terceira hora, 34% dos animais permaneceram no fundo aquário e, na quarta e quinta hora, reduziu para 17% dos animais.

No que se refere, as alterações comportamentais, observadas nos grupos das cinco doses do EDMNF (10, 100, 500, 1000 e 2000mg/kg) administradas via oral e carragenina via intraperitoneal, os animais apresentaram alterações de estágio I e III, apenas o grupo tratado com 500mg/kg, apresentou uma alteração de estágio II.

O grupo dos animais tratados com a dose 10 mg/kg, demonstraram alterações de estágio I no decorrer de todo o experimento, onde, 84% dos animais apresentaram aumento de atividade natatória, tremores na cauda e deposição no fundo aquário, na primeira hora. Na segunda e terceira hora, 43% ainda apresentavam estas alterações. Na quarta e quinta hora, este percentual diminuiu para 25% e 9%, respectivamente, e os animais apresentaram apenas tremores na cauda.

No grupo tratado com a dose de 100 mg/Kg, a análise comportamental, indicou apenas alterações de estágio I e III, até a quarta hora após a aplicação da carragenina.

Na primeira hora, apenas 43% dos animais apresentaram aumento de atividade natatória, tremores na cauda e repouso no fundo. Este percentual diminuiu para 26% na segunda e terceira hora, e os animais apresentaram tremores na cauda e repouso no fundo. Na quarta hora este percentual diminuiu para 9%. Logo em seguida voltaram ao comportamento normal.

O grupo que corresponde aos animais tratados com a dose de 500mg/kg via oral e carragenina via intraperitoneal, demonstraram alterações dos três estágios, sendo as alterações de estágio I e III mais evidentes. Na primeira hora 61% dos animais apresentaram aumento de atividade natatória, tremores na cauda, perda da motilidade e deposição no fundo. Na segunda hora, os percentuais aumentaram. A partir da terceira hora, o percentual diminuiu para 43%, e os animais ainda apresentaram presença de tremores na cauda, perda de equilíbrio e da motilidade. Na quarta os percentuais diminuíram, e os animais apresentavam deposição no fundo e perda da motilidade, e se manteve até a quinta hora.

Em animais tratados com a dose de 1000mg/kg, observou-se aumento de atividade natatória, tremores na cauda na primeira e perda da motilidade em 35% na primeira hora. Houve um aumento para 50% dos animais na segunda hora, que se manteve até a terceira hora. Na quarta hora, 25% os animais apresentaram apenas deposição no fundo. No entanto, na quinta hora este percentual aumentou para 61%.

No grupo tratado com a dose de 2000mg/Kg, a análise comportamental indicou alterações de nível I e III, até a quarta hora após a aplicação da carragenina, onde 59% dos animais apresentaram aumento de atividade natatória, tremores na cauda e perda da motilidade na primeira hora. Logo em seguida, na segunda hora este percentual diminuiu para 26%, aumentou para 34% na terceira hora, no entanto, na quarta hora diminuiu para 9%. A partir da quinta hora, os animais voltaram ao comportamento normal.

Na análise comportamental os grupos controle (PBS, Cg, Vh, Ind) apresentaram alterações comportamentais ao longo de todo o experimento. Na primeira hora, de forma mais evidente. No entanto, algumas alterações se mantêm até o final do experimento. Os grupos tratados com o EDMNF (10 – 2000mg/kg), também apresentaram alterações durante o experimento, no entanto, de acordo com a tabela 10 é possível observar que os maiores percentuais se apresentam até a terceira hora de avaliação, em todas as doses testadas a partir da quarta hora os

percentuais reduzem e, exceto pelos grupos tratados com as doses de 500 e 1000mg/kg, que na quinta hora, ocorre um aumento no percentual de animais com alterações comportamentais, já os grupos tratados com as doses de 10, 100 e 2000mg/kg, na quinta hora, apresentam pouca ou nenhuma alteração, voltando ao seu comportamento normal.

O grupo controle negativo Cg, que recebeu aplicação do agente inflamatório carragenina via intraperitoneal, conforme mostrado na tabela 10, foi o grupo que apresentou todos os estágios de alterações comportamentais, onde 94% dos animais apresentaram alterações na primeira hora e, no pico máximo do edema, na quinta hora, 26% dos animais ainda apresentavam alterações. Em relação ao grupo controle positivo Ind, o qual recebeu Indometacina via oral e carragenina via intraperitoneal, pode-se observar que 34% dos animais apresentaram alterações na primeira hora e, que este mesmo percentual se manteve no pico máximo do edema da carragenina.

Os grupos tratados com EDMNF 10, 100 e 2000mg/kg apresentaram melhor recuperação quando comparados aos grupos controle negativo Cg e positivo Ind, na quinta hora, no pico máximo do edema da carragenina. Diante disso, pressupõe-se que, o fato do EDMNF apresentar um efeito anti-inflamatório, pode estar minimizando a ação da carragenina e, conseqüentemente reduzindo as alterações comportamentais provocadas por sua ação inflamatória.

5.3.2.4.2 Teste de edema abdominal induzido por dextrana

Para o teste de edema abdominal induzido com dextrana, a análise foi a cada 30min após a indução, por um período de 90min, conforme mostrado na tabela 11. No grupo controle SS (solução salina v.o e S. Salina via i.p), observou-se a presença das alterações comportamentais de estágio I e III em 51% dos animais, 30min após aplicação da dextrana, como, aumento de atividade natatória e deposição do animal no fundo. Após 60min, estes percentuais diminuíram, para 34%. E após 90min, apenas 14% dos animais apresentaram repouso no fundo.

Os animais do controle negativo (Dex) (solução salina v.o e dextrana via i.p), 100% dos animais apresentaram alterações ao longo de todo experimento. Nos 30min após aplicação da dextrana, apresentaram presença de tremores na cauda e perda da motilidade. O aumento de atividade natatória, foi observado após 60min, em 100% dos animais e se manteve até 90min após a aplicação de dextrana intraperitoneal.

Tabela 11 - Alterações comportamentais em *zebrafish* adultos no teste de edema abdominal induzido por dextrana, avaliados durante o período de 90 minutos

		30'	60'	90'
Controle SS	Estágio I	1	1	-
	Estágio II	-	-	-
	Estágio III	2	2	2
	Total	51%	34%	14%
Controle negativo (Dex)	Estágio I	2	1	1
	Estágio II	-	-	-
	Estágio III	2	-	-
	Total	100%	100%	100%
Controle positivo (Cp)	Estágio I	2	2	2
	Estágio II	-	-	-
	Estágio III	2	1 e 2	2
	Total	84%	84%	84%
EDMNF 80 mg/kg	Estágio I	1 e 2	1 e 2	2
	Estágio II	-	-	-
	Estágio III	2	1 e 2	2
	Total	41%	84%	44%

Os valores em porcentagem representam a quantidade de peixes que apresentaram as respectivas alterações comportamentais, do total de peixes analisados para cada grupo (N=9/grupo). Estágio I: 1) aumento da atividade natatória, 2) espasmos e tremores no eixo da cauda. Estágio II: 1) natação circular; 2) perda de equilíbrio. Estágio III: 1) deposição do animal no fundo; 2) perda de motilidade; 3) morte.

Fonte: A autora (2022).

O grupo controle positivo (Cp) (Ciproheptadina v.o e dextrana via i.p), apresentou alterações de estágio I e III, no decorrer de todo o experimento. Em 30min após a aplicação da dextrana, 84% dos animais apresentaram tremores na cauda e perda da motilidade. E se manteve até 90 após aplicação da dextrana.

No grupo tratado com EDMNF dose de 80mg/kg, a análise comportamental indicou alterações de nível I e III. Após 30min, 41% apresentaram aumento de atividade natatória, tremores na cauda e perda da motilidade. Após 60min, este percentual aumentou para 84% e os animais passaram a ficar no fundo do aquário.

No entanto, após 90 minutos, o percentual diminuiu assim como o número de alterações.

O grupo tratado com EDMNF 80mg/kg apresentou melhor recuperação quando comparado aos grupos controle negativo Dex e positivo Cp, 90min após a injeção (i.p.) de dextrana. Diante disso, pressupõe-se que, o fato do EDMNF apresentar um efeito anti-inflamatório, pode estar minimizando o efeito do agente inflamatório dextrana e, portanto diminuindo as alterações comportamentais.

5.3.2.4.3 Teste de edema abdominal induzido por histamina

Para os testes de edema abdominal induzido com histamina a análise comportamental foi realizada a cada 30min após a indução, pelo período de 60min (Tabela 12). No grupo controle SS (solução salina v.o e S. Salina via i.p), observou-se a presença das alterações comportamentais de estágio I e III em 51% dos animais, 30min após aplicação da dextrana, como, aumento de atividade natatória e deposição do animal no fundo. Após 60min, estes percentuais diminuíram, para 34%.

Tabela 12 - Alterações comportamentais em *zebrafish* adultos no teste de edema abdominal induzido por histamina, avaliados durante o período de 60 minutos

		30'	60'
Controle SS	Estágio I	1	1
	Estágio II	-	-
	Estágio III	2	2
	Total	51%	34%
Controle negativo (Hist)	Estágio I	1	1
	Estágio II	-	-
	Estágio III	1 e 2	-
	Total	100%	100%
Controle Positivo (Cp)	Estágio I	1 e 2	2
	Estágio II	-	-
	Estágio III	2	2
	Total	100%	84%

EDMNF 80mg/kg	Estágio I	1	2
	Estágio II	-	-
	Estágio III	2	2
	Total	100%	51%

Os valores em porcentagem representam a quantidade de peixes que apresentaram as respectivas alterações comportamentais, do total de peixes analisados para cada grupo (N=9/grupo). Estágio I: 1) aumento da atividade natatória, 2) espasmos e tremores no eixo da cauda. Estágio II: 1) natação circular; 2) perda de equilíbrio. Estágio III: 1) deposição do animal no fundo; 2) perda de motilidade; 3) morte.

Fonte: A autora (2022).

Os animais do grupo controle negativo (Hist) (solução salina v.o e histamina via i.p), 100% dos animais apresentaram alterações ao longo de todo o experimento, como aumento de atividade natatória, deposição no fundo e perda motilidade.

O grupo controle positivo (Cp) (Ciproeptadina v.o e dextrana via i.p), apresentou alterações de estágio I e III, durante todo o experimento. Após 30min, 100% apresentaram aumento de atividade natatória, presença de tremores na cauda e deposição no fundo. E logo após 60min da aplicação da histamina, 84 % apresentaram tremores na cauda, e repouso no fundo.

No grupo tratado com a dose de 80mg/kg do EDMNF (v.o) e histamina (i.p), a análise comportamental indicou alterações de nível I e III, sendo que 100% dos animais apresentaram aumento de atividade natatória e deposição no fundo, após 30min. No então, após 60min, observou-se que este percentual reduziu para 51% e passou a apresentar tremores na cauda.

O grupo tratado com EDMNF 80mg/kg apresentou melhor recuperação quando comparado aos grupos controle negativo Hist e positivo Cp, 60min após a injeção (i.p.) de histamina. Neste ensaio, também sugere-se que, o efeito anti-inflamatório do EDMNF, pode estar minimizando o efeito do agente inflamatório histamina e, portanto diminuindo as alterações comportamentais.

5.3.2.4.4 Teste de edema abdominal induzido por prostaglandina E2 (PGE2)

Para os testes de edema abdominal induzido por PGE2, a análise comportamental foi realizada a cada 30min após a indução, pelo período de 60min (Tabela 13). No grupo controle SS (solução salina v.o e S. Salina via i.p), observou-se a presença das alterações comportamentais de estágio I e III em 51% dos animais,

30 minutos após aplicação da dextrana, como, aumento de atividade natatória e deposição do animal no fundo. Após 60min, estes percentuais diminuíram, para 34%.

Tabela 13 - Alterações comportamentais em *zebrafish* adultos no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina E2, avaliados durante o período de 60 minutos.

		30'	60'
Controle SS	Estágio I	1	1
	Estágio II	-	-
	Estágio III	2	2
	Total	51%	34%
Controle negativo (PGE ₂)	Estágio I	2	-
	Estágio II	-	-
	Estágio III	2	2
	Total	84%	84%
Controle positivo (Ind)	Estágio I	2	2
	Estágio II	-	-
	Estágio III	2	2
	Total	90%	100%
EDMNF 80 mg/kg	Estágio I	1	2
	Estágio II	-	-
	Estágio III	2	2
	Total	100%	84%

Os valores em porcentagem representam a quantidade de peixes que apresentaram as respectivas alterações comportamentais, do total de peixes analisados para cada grupo (N=9/grupo). Estágio I: 1) aumento da atividade natatória, 2) espasmos e tremores no eixo da cauda. Estágio II: 1) natação circular; 2) perda de equilíbrio. Estágio III: 1) deposição do animal no fundo; 2) perda de motilidade; 3) morte.

Fonte: A autora (2022).

Nos animais do controle negativo (PGE₂) (solução salina v.o e PGE₂ via i.p.), observou-se que, 30min após aplicação da prostaglandina E2, 84% dos animais apresentaram tremores na cauda e deposição no fundo. Este percentual se manteve 60min após aplicação, no entanto, os animais permaneciam no fundo do aquário.

O grupo controle positivo (Cp) tratado com Indometacina (v.o) e PGE₂ via i.p) (G3), apresentou alterações de estágio I e III, durante todo o experimento. Após

30min, 90% dos animais apresentaram tremores na cauda e a deposição dos animais no fundo, Após 60min, um pequeno aumento neste percentual, onde 100% dos animais passaram a apresentar estas alterações.

No grupo tratado com EDMNF (80mg/kg) via oral e PGE2 via intraperitoneal, após 30min, 100% apresentaram alterações, sendo aumento de atividade natatória e deposição no fundo. Sendo que após 60 min, houve uma diminuição neste percentual para 84%, os animais ainda permaneceram no fundo e apresentaram tremores na cauda.

Neste ensaio o grupo tratado com EDMNF 80mg/kg não apresentou melhor recuperação quando comparado aos grupos controle negativo Hist e positivo Cp, 60min após a injeção (i.p.) de histamina.

5.3.2.5 Análise histopatológica

Neste estudo, as ferramentas histopatológicas foram utilizadas como parâmetro para avaliar o efeito anti-inflamatório do EDMNF, em prevenir as alterações histológicas causadas pela injeção (i.p.) de diferentes agentes inflamatórios (carragenina, dextrana, histamina e prostaglandina E2), no fígado, intestino e rins.

De acordo com Carvalho *et al.* (2018), o *zebrafish* é um excelente modelo para estudar alterações teciduais causadas por agentes inflamatórios injetados via intraperitoneal e, para estudar o papel dos glicocorticoides na redução dos danos causados, pois devido o *zebrafish* ser um animal de pequeno porte, a injeção de um agente inflamatório na região abdominal, pode causar danos em órgãos vitais.

Ekambaram, Perumal e Pavadai (2017), Borges *et al.* (2018) e Quitian-Useche *et al.* (2021) utilizaram a análise histopatológica, como um dos parâmetros para evidenciar o efeito anti-inflamatório de produtos naturais, onde foi possível observar nas seções histológicas, que as substâncias testadas, foram eficazes na prevenção de alterações histopatológicas causadas pela carragenina (i.p.) nas brânquias, fígado, intestino e rins.

5.3.2.5.1 Teste de edema abdominal induzido por carragenina

Alterações histopatológicas: Fígado

No estudo histopatológico do fígado, no grupo controle PBS (animais tratados com solução salina v.o e PBS via i.p.), observou-se em sua grande maioria alterações

de nível I: perda ou atipia do contorno celular e nuclear, aumento do volume celular, intensa vacuolização citoplasmática, vacuolização nuclear e aumento do volume relativo dos vasos, quanto as alterações de nível II, houve a presença de atrofia nuclear, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear e hiperemia. O valor de IAH (9.58 ± 3.98) indica que as alterações encontradas neste órgão não comprometeram seu funcionamento.

Os animais do grupo controle negativo (Cg) (animais tratados com solução salina v.o e carragenina via i.p.), apresentaram alterações de nível I, como, perda ou atipia do contorno celular e contorno nuclear, aumento do volume celular, intensa vacuolização citoplasmática, diminuição do glicogênio, aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos, aumento do volume relativo dos vasos e, alterações do nível II: atrofia nuclear, diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, rompimento celular e hiperemia e, alteração no nível III, necrose. O valor de IAH foi de 29.58 ± 14.20 , isto indica que este órgão, sofreu alterações de moderadas a graves.

No grupo controle veículo (Vh) (animais tratado com veículos da indometacina v.o e carragenina via i.p.), o valor de IAH (13.50 ± 0.43) indicou que o fígado apresentou alterações leves a moderadas. Na análise, apresentou alterações de nível I e nível II: desarranjo dos cordões hepáticos (I), perda ou atipia do contorno celular e contorno nuclear (I), aumento do volume celular (I), intensa vacuolização citoplasmática (I), atrofia nuclear (II), degeneração citoplasmática (II), degeneração nuclear (II), aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos e hiperemia (II).

O grupo controle positivo (Ind) (animais tratados com Indometacina v.o e injeção i.p. de carragenina), nos tecidos do fígado, o valor de IAH (37.67 ± 1.23) (tabela), indica alterações de moderadas a graves neste órgão e, as alterações observadas foram desarranjo dos cordões hepáticos (I), perda ou atipia do contorno celular (I), perda ou atipia do contorno nuclear (I), intensa vacuolização citoplasmática (I), aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos (I), atrofia nuclear (II), diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos (II), degeneração citoplasmática (II), degeneração nuclear (II), hiperemia (II) e necrose (III).

Quanto as alterações hepáticas, encontradas nos grupos tratados com EDMNF (10, 100, 500, 1000 e 2000mg/kg) administradas via oral e carragenina via intraperitoneal, no grupo tratado com a dose 10mg/kg, foram observadas alterações

de nível I: desarranjo dos cordões hepáticos, perda ou atipia do contorno celular e contorno nuclear, aumento do volume celular, vacuolização nuclear e, alterações de nível II: degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, rompimento celular, hiperemia e degeneração dos canalículos biliares e, necrose como alteração de nível III; com valor de IAH 38.67 ± 0.14 indicando alterações moderadas a graves neste órgão.

No grupo tratado com a dose 100mg/kg, a análise indicou várias alterações de nível I como, perda ou atipia do contorno celular e contorno nuclear, intensa vacuolização citoplasmática, aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos, e algumas alterações de nível II: Atrofia nuclear, diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos, degeneração citoplasmática, hiperemia. Essas alterações classificaram este órgão com funcionamento normal, com o IAH de 10 ± 1.73 .

Na análise histopatológica do grupo tratado com a dose 500mg/kg, o fígado apresentou o valor IAH de 6.16 ± 0.57 , caracterizando um órgão dentro dos níveis normais e, alterações de nível I como, perda ou atipia do contorno nuclear, intensa vacuolização citoplasmática, aumento do volume relativo dos vasos e, apenas hiperemia, como alteração de nível II.

Os animais tratados com as doses 1000 e 2000mg/kg apresentaram alterações teciduais de nível I e II, como perda ou atipia do contorno celular e contorno nuclear (I), intensa vacuolização citoplasmática (I), aumento do volume celular (I), diminuição do glicogênio (I), atrofia nuclear (II), degeneração citoplasmática (II) e hiperemia (II). No entanto, apenas a dose de 1000mg/g, apresentou necrose focal (III), com um IAH de 35.92 ± 0.144 , caracterizando alterações moderadas a graves neste órgão. As alterações encontradas no grupo tratado com dose de 2000mg/kg, com IAH de 12.67 ± 1.52 , demonstra que este órgão sofreu alterações leves a moderadas.

Resumidamente, as principais alterações observadas em todos os grupos são: hiperemia, atrofia nuclear, degeneração nuclear, atipia nuclear, intensa vacuolização citoplasmática, que estão descritas na Figura 32, não provocaram danos irreversíveis, que ocasionasse o comprometimento funcional deste órgão. Nos grupo tratados com EDMNF, as doses de 100mg/kg (10 ± 1.73) e 500mg/kg (6.16 ± 0.57), apresentaram os menores valores de IAH, quando comparado ao controle negativo (Cg) (29.58 ± 14.20), além disso, estas doses, foram mais eficazes que o controle positivo (Indometacina 10mg/kg) (37.67 ± 1.23) na prevenção de alterações histopatológicas causadas pela

carragenina (i.p.) no fígado, visto que, os valores de IAH dos grupos tratados com EDMNF (100 e 500 mg/kg), que variaram entre 0 a 10, correspondem a um órgão que permaneceu funcionalmente normal (figura 33 e tabela 14).

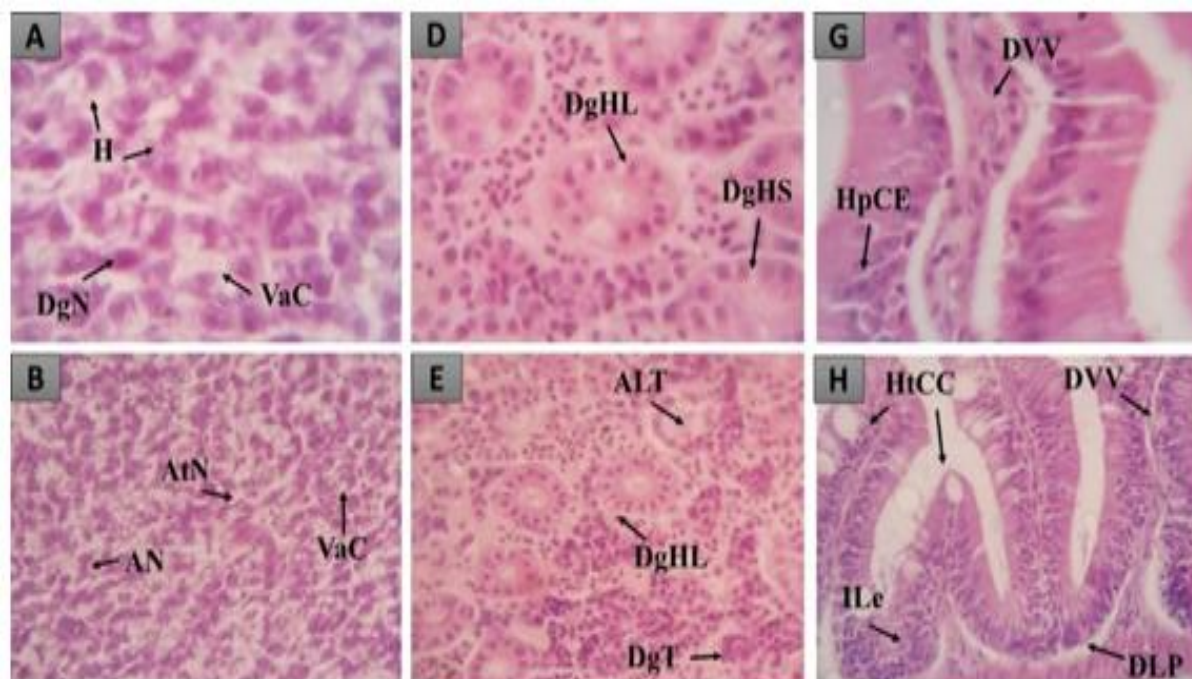


Figura 32 - Seção longitudinal do fígado, rins e intestino de zebrafish (*Danio rerio*) adulto, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por carragenina. A e B mostrando tecido hepático; C e D mostrando tecido renal; E e F mostrando tecido intestinal, com as principais alterações, H hiperemia, AN atrofia nuclear, DGN degeneração nuclear, AtN atipia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática, DGHl degeneração hialina tubular leve, DGHS degeneração hialina tubular severa, ALT aumento do lúmen tubular, DgT degeneração tubular, ILe infiltração leucocitária estromal, DLP destacamento da lâmina própria, DVV dilatação dos vasos nas vilosidades, HtCC hipertrofia das células caliciformes, HpCE hiperplasia das células epiteliais. Todas as figuras foram aumentadas em 9400, H e E.

Fonte: A autora (2022).

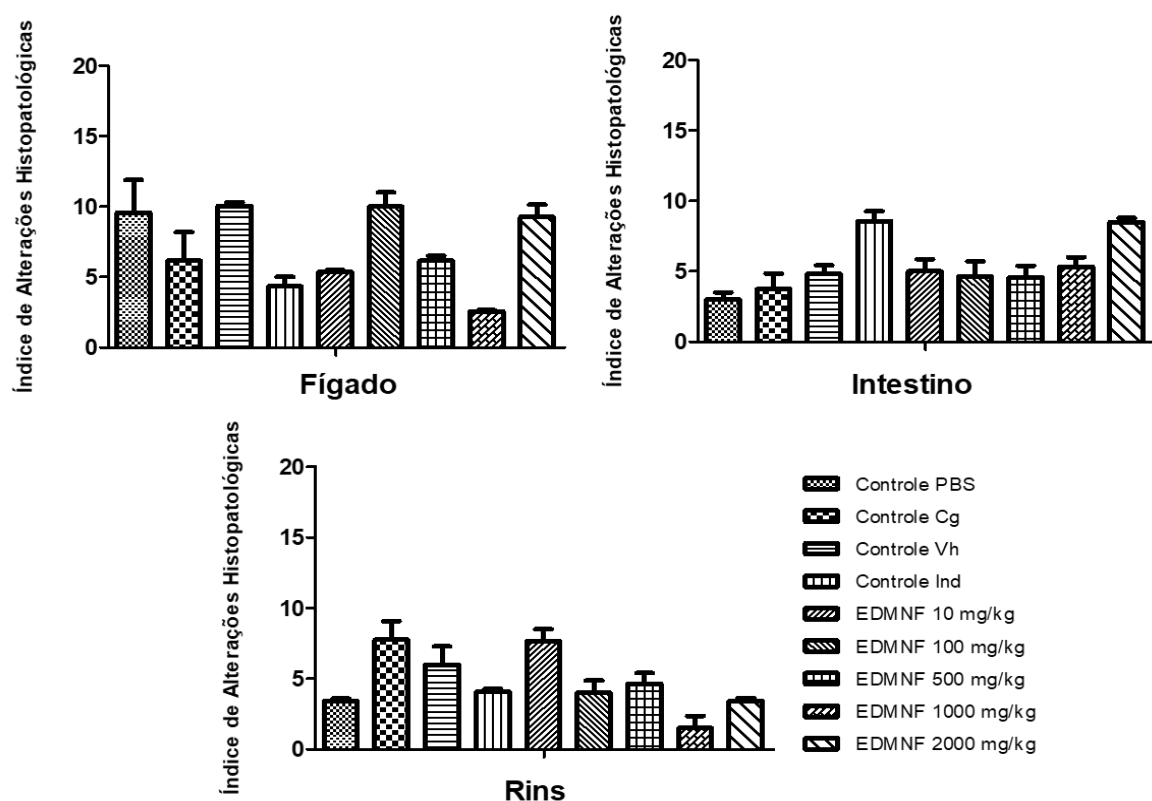


Figura 33 - Efeito da administração oral de solução salina (2µl, controle PBS e Cg), Tween+DMSO+água destilada (2µl, controle Vh), Indometacina (10 mg/kg, controle Ind), EDMNF (10, 100, 500, 1000 e 2000mg/kg) sobre o índice de alterações histopatológicas (IAH) em fígado, intestino e rins de *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos, com aplicação de carragenina intraperitoneal (400µg, 20µL). Os dados são apresentados como média ± DP (n=12/ grupo); * p <0,05 para grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste postthoc de Tukey. Fonte: A autora (2022).

Tabela 14 - Índice de alterações histopatológicas (IAH) para cada órgão (fígado, intestino e rins) de *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos, no teste de edema abdominal induzido por carragenina

	Fígado	Intestino	Rins
Controle PBS	9.58±3.98	34.33±0.28	3.41±0.28
Controle Cg	29.58±14.20	34.58±0,62	11.17±2.25
Controle Vh	13.50±0,43	33.50±2.16	6.00±2.25
Controle Ind	37.67±1,23	8.58±1.18	4.83±0.38
EDMNF 10 mg/kg	38.67±0.14	5.00±1.52	7.66±1.44
EDMNF 100 mg/kg	10±1,73	4.66±1.80	4.00±1.52
EDMNF 500 mg/kg	6.16±0.57	4.58±1.42	4.66±1.28
EDMNF 1000 mg/kg	35.92±0.144	5.33±1.15	1.50±1.52
EDMNF 2000 mg/kg	12.67±1.52	8.50±0.50	3.41±0.38

Os dados são apresentados como média ± DP (n=12/ grupo); * p <0,05 para grupo controle negativo. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste postthoc de Tukey. Fonte: A autora (2022).

Alterações histopatológicas: Intestino

No tecido intestinal, os grupos controle PBS, controle negativo (Cg), controle veículo (Vh) e o controle positivo (Ind), apresentaram semelhantes alterações de nível I: dilatação dos vasos presentes nas vilosidades, desprendimento do revestimento epitelial do ápice das vilosidades intestinais, atrofia dos vilos, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia das células caliciformes, degeneração da camada muscular, infiltração linfocitária estromal, vacuolização de enterócitos, infiltração de leucócitos, degeneração celular, destacamento da lâmina própria e, de nível II: descamação da mucosa intestinal e degeneração vilosa. A alteração de nível III: necrose focal, foi observada em todos os grupos, exceto no controle positivo (Ind). Quanto aos valores de IAH dos grupos controle PBS (34.33 ± 0.28), controle negativo (Cg) (34.58 ± 0.62) e controle veículo (Vh) (33.50 ± 2.16), indicou que este órgão sofreu alterações de moderadas a graves. No entanto, o grupo controle positivo (Ind), apresentou IAH de 8.58 ± 1.18 (Tabela 14), indicando que este órgão funcionalmente está normal.

Nos grupos tratados com EDMNF, o valor de IAH (5.00 ± 1.52) do grupo tratado com a dose 10mg/kg, indica normalidade neste órgão. Quanto as alterações, foram em sua grande maioria de nível I (hipertrofia das Células Epiteliais, hiperplasia das células Caliciformes, degeneração da camada muscular, infiltração linfocitária estromal, degeneração celular, destacamento da lâmina própria) e, apenas a descamação da mucosa intestinal, como alteração de nível II.

Os animais tratados com a dose 100mg/kg, apresentaram alterações de nível I, dentre elas, hiperplasia das células caliciformes, infiltração linfocitária estromal, infiltração de leucócitos, degeneração celular e destacamento da lâmina própria; apenas uma alteração de nível II: descamação da mucosa intestinal e, IAH de 4.66 ± 1.80 , indicando normalidade neste órgão.

O grupo tratado com a dose 500mg/kg, apresentou desprendimento do revestimento epitelial do ápice das vilosidades intestinais (I), hiperplasia das células Caliciformes (I), infiltração de leucócitos (I), destacamento da lâmina própria (II) e descamação da mucosa intestinal (II). O valor de IAH (4.58 ± 1.42) indica normalidade no órgão.

Os animais tratados com a dose 1000mg/kg, apresentaram os dois níveis de alterações histopatológicas: hiperplasia das células caliciformes (I), degeneração da camada muscular (I), infiltração linfocitária estromal (I), vacuolização de enterócitos

(I), infiltração de leucócitos (I), encurtamento da lâmina própria (II), degeneração celular I, destacamento da lâmina própria (II), o valor de IAH (5.33 ± 1.15) (Tabela 14) indica que o intestino permaneceu funcionalmente normal.

No grupo tratados com a dose 2000mg/kg, ocorreram alterações de nível I: infiltração de leucócitos, degeneração celular, destacamento da lâmina própria e, alterações de nível II: fusão parcial ou completa de vilosidades. Os valores de IAH do fígado (8.50 ± 0.50) (Tabela 14) indicam que este órgão permaneceu funcionalmente normal.

Em suma, dentre as principais alterações observadas em todos os grupos destaca-se, a infiltração leucocitária estromal, o destacamento da lâmina própria, a dilatação dos vasos nas vilosidades, a hipertrofia das células caliciformes e a hiperplasia das células epiteliais (Figura 32). Todos os grupos tratados com EDMNF (10mg/kg (5.00 ± 1.52), 100mg/kg (4.66 ± 1.80), 500mg/kg (4.58 ± 1.42), 1000mg/kg (5.33 ± 1.15) e 2000mg/kg (8.50 ± 0.50)) apresentaram os menores valores de IAH, quando comparado ao controle negativo (Cg) (34.58 ± 0.62). Ademais todas as doses de EDMNF foram eficazes na prevenção de alterações causadas por carragenina (i.p.), visto que, todos os valores de IAH, variaram entre 0 a 10, assim como o controle positivo (Ind) (8.58 ± 1.18), indicando que este órgão permaneceu funcionalmente normal (Figura 33 e tabela 14).

Alterações histopatológicas: Rins

No que se refere ao tecido renal, a perda do contorno celular ou contorno celular atípico (I), degeneração hialina tubular leve (I), hipertrofia das células tubulares (I), obstrução tubular (I), aumento do lúmen tubular (I) e hiperemia (II), foram as alterações de nível I e II (Figura 28), encontradas no grupo controle PBS, com o IAH de 3.41 ± 0.28 (Tabela 14), classificando este órgão com funcionamento normal.

O grupo controle negativo (Cg), apresentou alterações histopatológicas de nível I e II: perda do contorno celular ou contorno celular atípico (I), degeneração hialina tubular leve (I), hipertrofia das células tubulares (I), diminuição do espaço da cápsula de Bowman (I), dilatação dos capilares glomerulares (I), aumento do lúmen tubular (I), degeneração hialina tubular severa (II), degeneração nuclear das células tubulares (II), degeneração citoplasmática das células tubulares (II) e hiperemia (II) (Figura 28), com IAH de 11.17 ± 2.25 , indicando órgão com alterações de leves a moderadas.

Em animais tratados com os veículos da Indometacina (v.o) e injeção de carragenina (i.p.), foram encontradas alterações de nível I, como degeneração hialina tubular leve, hipertrofia das células tubulares, desorganização tubular, aumento do espaço da cápsula de Bowman, aumento do lúmen tubular e, alterações de nível II: degeneração hialina tubular severa, degeneração glomerular, degeneração nuclear das células tubulares, com valor de IAH dentro da normalidade (6.00 ± 2.25).

O grupo tratado com Indometacina (v.o) e carragenina (i.p), apresentou, IAH de 4.83 ± 0.38 , indicando normalidade neste órgão. Quanto as alterações, apenas a hiperemia, do nível II e, algumas do nível I: perda do contorno celular ou contorno celular atípico, degeneração hialina tubular leve, hipertrofia das células tubulares, obstrução tubular, aumento do lúmen tubular.

Os grupos tratados com as doses de 10 e 1000mg/kg do EDMNF apresentaram alterações teciduais semelhantes, tanto de nível I quanto de nível II: perda do contorno celular ou contorno celular atípico (I), degeneração hialina tubular leve (I), hipertrofia das células tubulares (I), aumento do lúmen tubular (I), obstrução tubular (I), degeneração citoplasmática das células tubulares (II), hiperemia (II), degeneração hialina tubular severa (II) e degeneração tubular II. Os valores de IAH 7.66 ± 1.44 e 1.50 ± 1.52 , respectivamente, indicam que estas alterações não alteraram o funcionamento deste órgão.

Nos grupos tratados com as doses de 100, 500 e 2000mg/kg do EDMNF, os valores de IAH (4.00 ± 1.52 , 4.66 ± 1.28 e 3.41 ± 0.38) indicam que os rins permaneceram funcionalmente normais. As alterações de nível I e II também foram semelhantes: degeneração hialina tubular leve (I), hipertrofia das células tubulares (I), obstrução tubular (I), aumento do lúmen tubular (I), degeneração hialina tubular severa (II) e hiperemia (II).

De maneira resumida, a degeneração hialina tubular leve, degeneração hialina tubular severa, aumento do lúmen tubular e a degeneração tubular, foram as alterações mais comuns em todos os grupos (Figura 32). Além disso, todos os grupos tratados com EDMNF 10 (7.66 ± 1.44), 100 (4.00 ± 1.52), 500 (4.66 ± 1.28), 1000 (1.50 ± 1.52) e 2000 mg/kg (3.41 ± 0.38), apresentaram os menores valores de IAH, quando comparado ao controle negativo (Cg) (11.17 ± 2.25). Ademais todas as doses de EDMNF foram eficazes na prevenção de alterações causadas por carragenina

(i.p.), visto que, todos os valores de IAH, variaram entre 0 a 10, assim como o controle positivo (Ind) (4.83 ± 0.38) (Figura 33 e tabela 14).

5.3.2.5.2 Teste de edema abdominal induzido por dextrana

Alterações histopatológicas: Fígado

Na análise histopatológica do fígado, o grupo controle SS (solução salina via oral + solução salina via intraperitoneal), não apresentou alterações, portanto o valor de IAH foi de (0.25 ± 0.50). No grupo controle negativo (Dex) (solução salina via oral + dextrana via intraperitoneal), o valor de IAH (1.75 ± 0.95) indicou que o fígado permaneceu funcionalmente normal e, observou-se apenas alterações de estágio I: aumento do volume celular, intensa vacuolização citoplasmática e diminuição do glicogênio.

O grupo controle positivo (Cp) tratado previamente com Ciproheptadina via oral e injeção intraperitoneal de dextrana, apresentou alterações de estágio I e II, como, perda ou atipia do contorno nuclear (I), intensa vacuolização citoplasmática (I), atrofia nuclear (II), hiperemia (II), o valor de IAH (1.25 ± 0.95) indica que estas alterações não influenciaram no funcionamento deste órgão.

Quanto as alterações hepáticas, encontradas no grupo tratado com EDMNF 80 mg/kg, foi observado apenas intensa vacuolização citoplasmática, alteração de estágio I, considerada como normal, com IAH de 0.50 ± 0.57 . As principais alterações identificadas neste tecido estão descritas na figura 34, e os valores de IAH na figura 35 e na tabela 15.

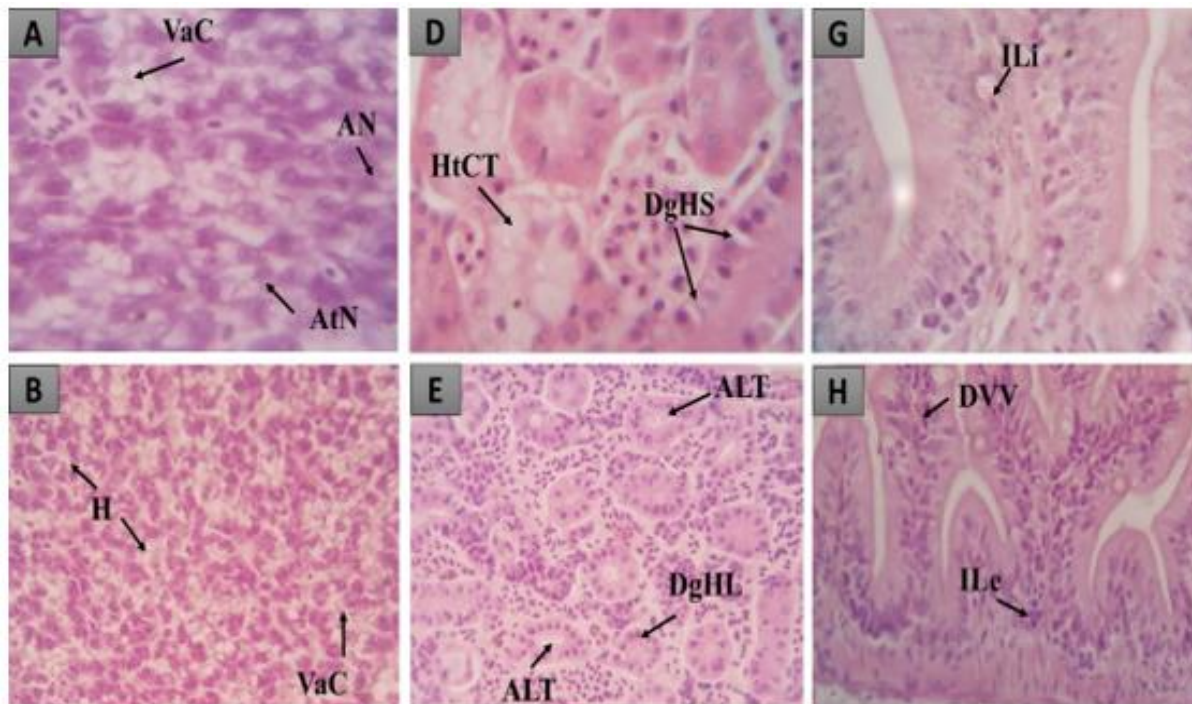


Figura 34 - Seção longitudinal do fígado, rins e intestino de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por dextrana. Todas as figuras foram aumentadas em 400 x, H e E. A e B mostrando tecido hepático; C e D mostrando tecido renal; E e F mostrando tecido intestinal, mostrando principais alterações, AN atrofia nuclear, AtN atipia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática, DGHl degeneração hialina tubular leve, DGHs degeneração hialina tubular severa, ALT aumento do lúmen tubular, DgT degeneração tubular, HtCT hipertrofia das células tubulares, ILe infiltração leucocitária estromal, ILi infiltração linfocitária, DVV dilatação dos vasos nas vilosidades.

Fonte: A autora (2022).

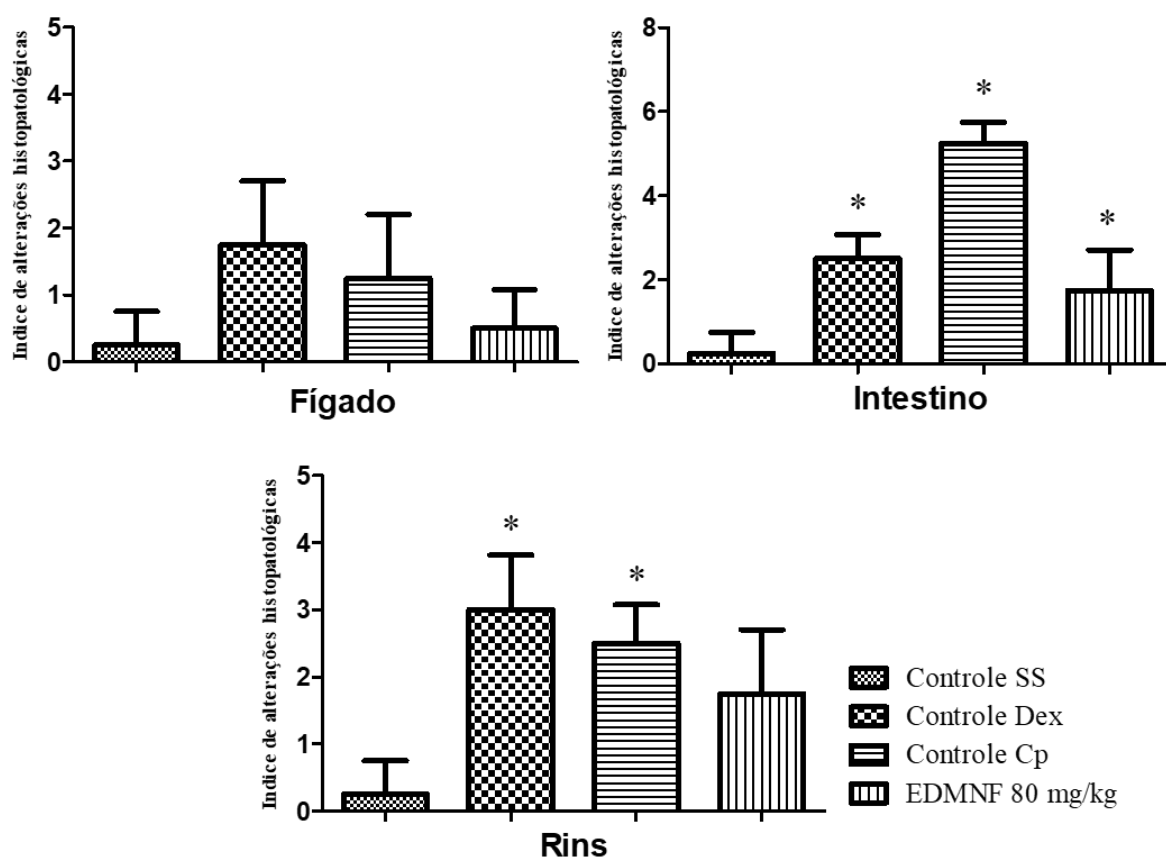


Figura 35 - Efeito da administração oral de solução salina (2µl, controle SS e Dex), ciproceptadina (10mg/kg, controle Cp), EDMNF 80mg/kg sobre o índice de alterações histopatológicas (IAH) em fígado, intestino e rins de *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos, com aplicação de dextrana via intraperitoneal (100 µg, 20 µL). Os dados são apresentados como média ± DP (n=9/ grupo); * p <0,05 para grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste postthoc de Tukey. Fonte: A autora (2022).

Tabela 15 - Distribuição dos valores de IAH para cada órgão de *zebrafish* adulto, no teste de edema abdominal induzido por dextrana.

Órgãos (IAH)	Controle SS	Controle Dex	Controle Cp	EDMNF 80 mg/kg
Fígado	0,25±0,50	1,75±0,95	1,25±0,95	0,50±0,57
Intestino	0,25±0,50	2,50±0,57	5,25±0,50	1,75±0,95
Rins	0,25±0,50	3,00±0,81	2,50±0,57	1,75±0,95

Fonte: A autora (2022).

Alterações histopatológicas: Intestino

Na análise do tecido intestinal, todos os grupos apresentaram apenas alterações de nível I. A hipertrofia das Células Epiteliais, foi a única alteração apresentada pelo grupo controle SS, com o IAH igual a zero (0.25±0.50). O grupo

controle negativo (Dex), com IAH de 2.5 ± 0.57 , apresentou dilatação dos vasos presentes nas vilosidades, infiltração linfocitária estromal e infiltração de leucócitos.

A maioria das alterações foi observado no grupo controle positivo (Cp), com IAH de 5.25 ± 0.50 , apresentou, dilatação dos vasos presentes nas vilosidades, hipertrofia das Células Epiteliais, hiperplasia das células Caliciformes, infiltração linfocitária estromal, vacuolização de enterócitos, infiltração de leucócitos, degeneração celular, todas de estágio I.

No grupo tratado com EDMNF 80mg/kg, observou-se as seguintes alterações de estágio I: dilatação dos vasos presentes nas vilosidades, hipertrofia das Células Epiteliais e infiltração de leucócitos, com valor de IAH 1.75 ± 0.95 . Todos os valores de IAH estabelecidos para o tecido intestinal, indicaram que este órgão se manteve funcionalmente normal. As principais alterações identificadas neste tecido estão descritas na figura 34, e os valores de IAH na figura 35 e na tabela 15.

Alterações histopatológicas: Rins

No tecido renal, a degeneração hialina tubular leve (I), foi a única alteração apresentada pelo grupo controle SS, com o IAH igual a zero (0.25 ± 0.50). Em relação ao grupo controle negativo (Dex), o IAH de 3.00 ± 0.81 , demonstrou que os rins, permaneceram funcionalmente normais e, as alterações observadas foram apenas de estágio I: degeneração hialina tubular leve, hipertrofia das células tubulares, diminuição do espaço da cápsula de Bowman, dilatação dos capilares glomerulares, aumento do lúmen tubular.

Dentre as alterações apresentadas pelo grupo controle positivo (Cp), observou-se degeneração hialina tubular leve I, hipertrofia das células tubulares I, aumento do lúmen tubular I, degeneração hialina tubular severa II; estas alterações não foram capazes de influenciar no funcionamento deste órgão, pois o valor de IAH (2.50 ± 0.57) indica normalidade no tecido renal.

No grupo tratado com EDMNF 80 mg/kg via oral e injeção de dextrana via intraperitoneal, com o IAH de 1.75 ± 0.95 , foram observados apenas alterações de estágio I, que não provocaram danos ao tecido, dentre elas: degeneração hialina tubular leve, diminuição do espaço da cápsula de Bowman, dilatação dos capilares glomerulares, aumento do lúmen tubular. As principais alterações identificadas neste tecido estão descritas na figura 34, e os valores de IAH na figura 35 e na tabela 15.

Observa-se que o grupo tratado com EDMNF 80 mg/kg em todos os tecidos analisados neste teste, apresentou os menores valores de IAH, variando entre 0.50 ± 0.57 e 1.75 ± 0.95 , quando comparado ao controle negativo (Dex). De acordo com os valores de IAH, o tratamento com EDMNF 80mg/kg foi tão eficaz e/ou melhor quanto o controle positivo (Cp) (10mg/kg) na prevenção de alterações histopatológicas em todos os órgãos analisados.

5.3.2.5.3 Teste de edema abdominal induzido por histamina

Alterações histopatológicas: Fígado

Os resultados da análise histológica do fígado no teste de edema abdominal induzido por histamina, identificou que o grupo controle SS (solução salina via oral + solução salina via intraperitoneal), não apresentou alterações, portanto o valor de IAH foi de (0.25 ± 0.50) .

No grupo controle negativo (Hist) (solução salina via oral + histamina via intraperitoneal), o valor de IAH (1.75 ± 0.95) indicou que o fígado permaneceu funcionalmente normal e, observou-se apenas alterações de estágio I: perda ou atipia do contorno nuclear, intensa vacuolização citoplasmática e aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos.

O grupo controle positivo (Cp) tratado previamente com Ciproheptadina via oral e injeção intraperitoneal de dextrana, apresentou apenas alterações de estágio I: como, intensa vacuolização citoplasmática e aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos, o valor de IAH (1.25 ± 0.95) indica que estas alterações não influenciaram no funcionamento deste órgão.

No grupo tratado com EDMNF 80mg/kg, foi observado apenas alterações hepáticas de estágio I: perda ou atipia do contorno nuclear, aumento do volume celular, intensa vacuolização citoplasmática, aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos. Os valores de IAH 0.50 ± 0.57 , significam normalidade neste órgão. As principais alterações identificadas neste tecido estão descritas na figura 36, e os valores de IAH na figura 37 e na tabela 16.

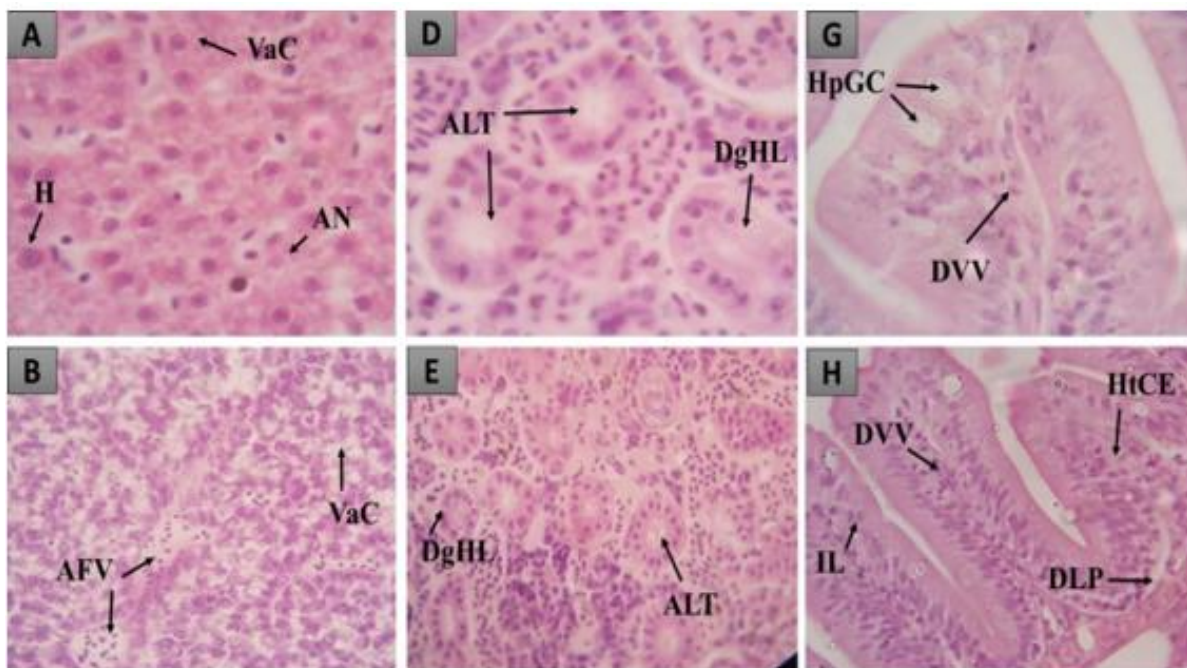


Figura 36 - Seção longitudinal do fígado, rins e intestino de *zebrafish* (*Danio rerio*) adulto, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por histamina. A e B mostrando tecido hepático; C e D mostrando tecido renal; E e F mostrando tecido intestinal, mostrando principais alterações, AN atrofia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática, DgHL degeneração hialina tubular leve, ALT aumento do lúmen tubular, HtCE hipertrofia das células epiteliais, ILi infiltração linfocitária, DVV dilatação dos vasos nas vilosidades, DLP destacamento da lâmina própria. Todas as figuras foram aumentadas em 9400, H e E. Fonte: A autora (2022).

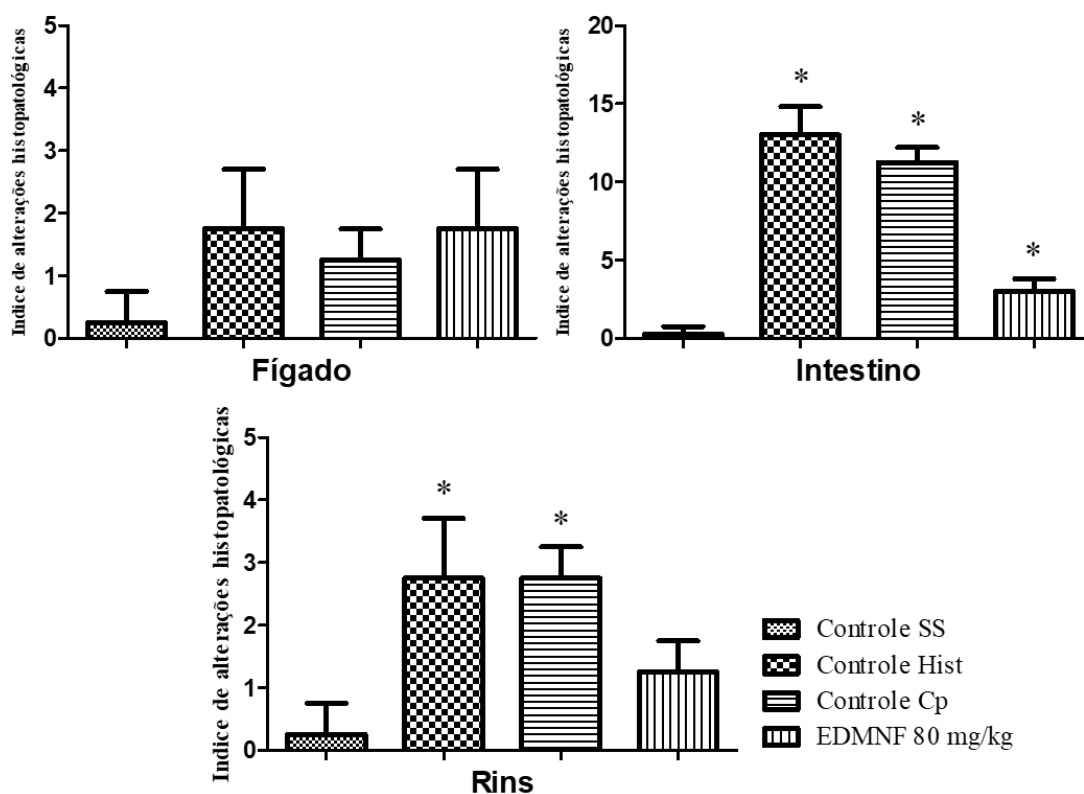


Figura 37 - Efeito da administração oral de solução salina (2µl, controle SS e Hist), ciproheptadina (10mg/kg, controle Cp), EDMNF 80mg/kg sobre o índice de alterações histopatológicas (IAH) em fígado, intestino e rins de *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos, com aplicação de histamina via intraperitoneal (50µg, 20µL). Os dados são apresentados como média ± DP (n=9/ grupo); * p <0,05 para grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste posthoc de Tukey. Fonte: A autora (2022).

Tabela 16 - Distribuição dos valores de IAH para cada órgão de *zebrafish* adulto, no teste de edema abdominal induzido por histamina

Órgãos (IAH)	Controle SS	Controle Hist	Controle Cp	EDMNF 80 mg/kg
Fígado	0,25±0,50	1.75±0.95	1.25±0.50	1.75±0,95
Intestino	0,25±0,50	13.00±1.88	11.2±0.95	3,00±0,81
Rins	0,25±0,50	2.75±0.95	2.75±0,50	1.25±0,50

Fonte: A autora (2022).

Alterações histopatológicas: Intestino

Na análise do tecido intestinal, o grupo controle SS, com o IAH igual a zero (0.25±0.50), não apresentou nenhuma alteração tecidual. O grupo controle negativo (Hist), com IAH de 13.0±1.8, apresentou alterações teciduais leves a moderadas, como, dilatação dos vasos presentes nas vilosidades, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia das células Caliciformes, infiltração linfocitária estromal e infiltração de leucócitos, todas de estágio I e, apenas deslocamento da lâmina própria, como alteração de estágio II.

As alterações observadas no grupo controle positivo (Cp), dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (I), hipertrofia das células epiteliais (I) e deslocamento da lâmina própria (II), com IAH de 11.2±0.95, foram classificadas como leves a moderadas.

No grupo tratado com EDMNF 80 mg/kg, observou-se apenas alterações de estágio I: dilatação dos vasos presentes nas vilosidades, hipertrofia das Células Epiteliais, hiperplasia das células Caliciformes, infiltração linfocitária estromal, e infiltração de leucócitos, com valor de IAH 3.00±0.81, indicam que este órgão se manteve funcionalmente normal. As principais alterações identificadas neste tecido estão descritas na figura 36, e os valores de IAH na figura 37 e na tabela 16.

Alterações histopatológicas: Rins

No tecido renal, o grupo controle SS, com o IAH igual a zero (0.25 ± 0.50), não apresentou nenhuma alteração tecidual. Em relação ao grupo controle negativo (Hist), o IAH de 2.75 ± 0.95 , demonstrou que os rins, permaneceram funcionalmente normais e, as alterações observadas foram apenas de estágio I: degeneração hialina tubular leve I, hipertrofia das células tubulares I, diminuição do espaço da cápsula de Bowman I, dilatação dos capilares glomerulares I.

Dentre as alterações apresentadas pelo grupo controle positivo (Cp), observou-se apenas de estágio I: degeneração hialina tubular leve, hipertrofia das células tubulares e aumento do lúmen tubular, estas alterações não foram capazes de influenciar no funcionamento deste órgão, pois o valor de IAH (2.75 ± 0.50) indica normalidade no tecido renal.

No grupo tratado com EDMNF 80mg/kg via oral e injeção de histamina via intraperitoneal, com o IAH de 1.25 ± 0.50 , foram observados apenas duas alterações de estágio I, que não provocaram danos ao tecido, são elas: degeneração hialina tubular leve e hipertrofia das células tubulares. As principais alterações identificadas neste tecido estão descritas na figura 36, e os valores de IAH na figura 37 e na tabela 16.

Nota-se que o grupo tratado com EDMNF 80mg/kg em todos os tecidos analisados neste teste, apresentou os menores valores de IAH, variando entre 1.25 ± 0.50 e 3.00 ± 0.81 , quando comparado ao controle negativo (Hist). O tratamento com EDMNF (80mg/kg) foi tão eficiente e/ou superior quanto o controle positivo (Cp) (10 mg/kg) na prevenção de alterações histopatológicas no intestino e rins.

5.3.2.5.4 Teste de edema abdominal induzido por prostaglandina E2

Alterações histopatológicas: Fígado

Os resultados da análise histológica do fígado no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina (PGE2), identificaram que, o grupo controle SS (solução salina via oral + solução salina via intraperitoneal), apresentou apenas, perda ou atipia do contorno nuclear, como alteração de estágio I, portanto o valor de IAH foi de (0.25 ± 0.50), indicando normalidade neste órgão.

O grupo controle negativo (PGE2) (solução salina via oral + PGE2 via intraperitoneal), com o valor de IAH (5.00 ± 1.41) indicou que o fígado permaneceu

funcionalmente normal e, observou-se apenas alterações de estágio I: perda ou atipia do contorno nuclear, aumento do volume celular, intensa vacuolização citoplasmática e diminuição do glicogênio.

No grupo controle positivo (Ind) tratado previamente com Indometacina via oral e injeção intraperitoneal de PGE2, observou-se apenas alterações de estágio I: como, perda ou atipia do contorno nuclear, aumento do volume celular e intensa vacuolização citoplasmática, o valor de IAH (3.75 ± 0.95) indica que estas alterações não influenciaram no funcionamento deste órgão.

O grupo tratado com EDMNF 80mg/kg, apresentou alterações hepáticas de estágio I: perda ou atipia do contorno nuclear e celular, intensa vacuolização citoplasmática e diminuição do glicogênio. Atrofia nuclear, foi a única alteração de estágio II observada neste grupo. Os valores de IAH 2.25 ± 0.95 , significam normalidade neste órgão. As principais alterações identificadas neste tecido estão descritas na figura 38, e os valores de IAH na figura 39 e na tabela 17.

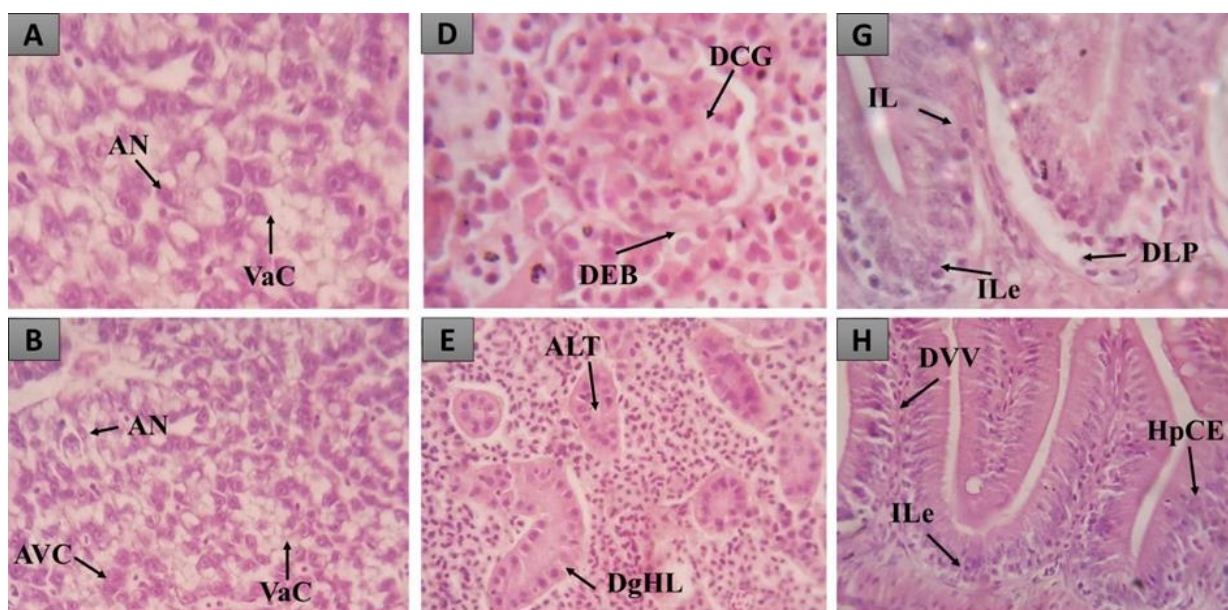


Figura 38 - Seção longitudinal do fígado, rins e intestino de zebrafish (*Danio rerio*) adulto, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina (PGE2). A e B mostrando tecido hepático; C e D mostrando tecido renal; G e H mostrando tecido intestinal, mostrando principais alterações, AN atrofia nuclear, VAC intensa vacuolização citoplasmática, DGHHL degeneração hialina tubular leve, DEB diminuição do espaço da cápsula de Bowman, DCG dilatação dos capilares glomerulares ALT aumento do lúmen tubular, DgT degeneração tubular, ILe infiltração leucocitária estromal, DLP destacamento da lâmina própria, DVV dilatação dos vasos nas vilosidades, HpCE hiperplasia das células epiteliais. Todas as figuras foram aumentadas em 400 x, H e E.

Fonte: A autora (2022).

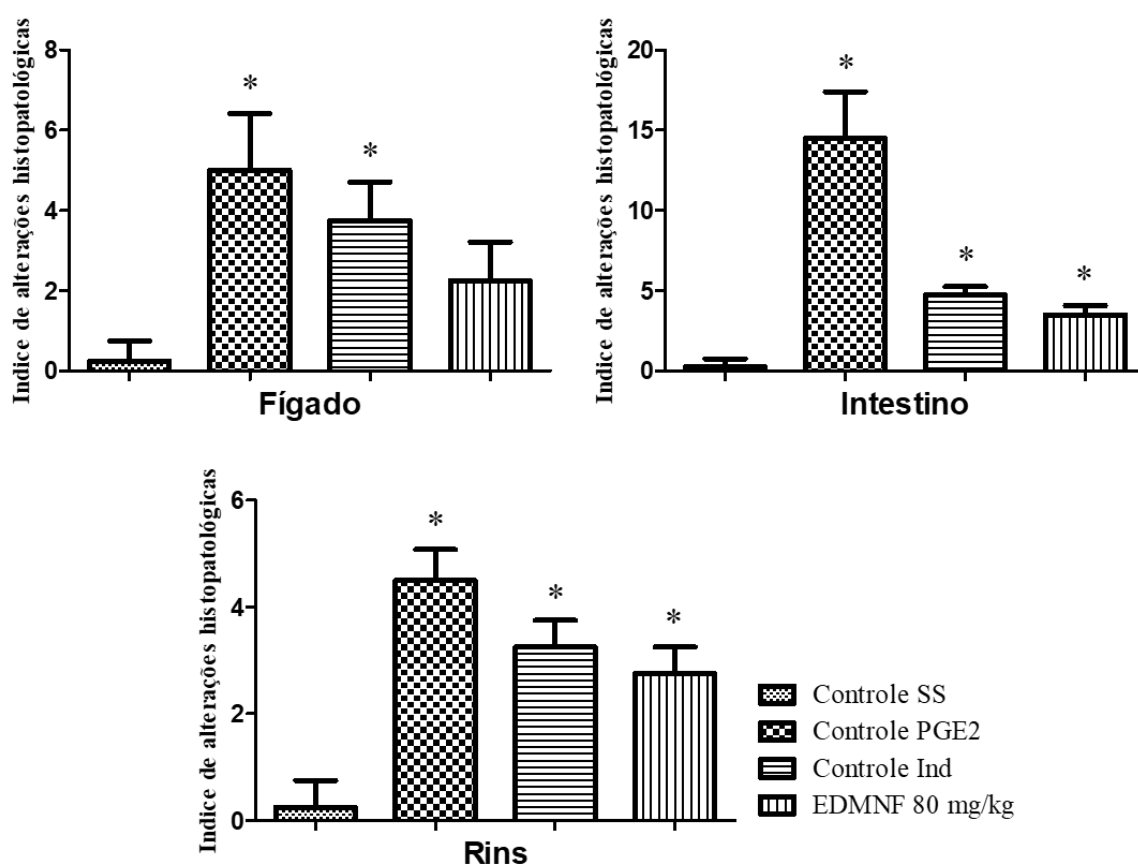


Figura 39 - Índice de alterações histopatológicas (IAH) em fígado, intestino e rins de *zebrafish* (*Danio rerio*) adultos, na avaliação do efeito do EDMNF sobre as alterações histopatológicas no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina (PGE₂). Os dados são apresentados como média ± DP (n=9/ grupo); * p <0,05 para grupo normal. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA *one-way* seguida do teste posthoc de Tukey.
Fonte: A autora (2022).

Tabela 17 – Distribuição dos valores de IAH para cada órgão de *zebrafish* adulto, no teste de edema abdominal induzido por prostaglandina E₂

Órgãos (IAH)	Controle SS	Controle PGE ₂	Controle Ind	EDMNF 80 mg/kg
Fígado	0,25±0,50	5.00±1.41	3.75±0,95	2.25±0,95
Intestino	0,25±0,50	14.50±2.88	4.75±0,50	3,50±0,57
Rins	0,25±0,50	4.50±0,57	3.25±0,50	2.75±0,50

Fonte: A autora (2022).

Alterações histopatológicas: Intestino

Na análise do tecido intestinal, o grupo controle SS, com o IAH igual a zero (0.25±0.50), não apresentou nenhuma alteração tecidual. O grupo controle negativo (PGE₂), com IAH de 14.50±2.88, apresentou alterações teciduais leves a moderadas,

como, dilatação dos vasos presentes nas vilosidades, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia das células Caliciformes, infiltração linfocitária estromal, vacuolização de enterócitos, infiltração de leucócitos e edema, todas de estágio I e, apenas deslocamento da lâmina própria, como alteração de estágio II.

As alterações observadas no grupo controle positivo (Ind), dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (I), hipertrofia das células epiteliais (I), hiperplasia das células Caliciformes (I), infiltração linfocitária estromal (I), infiltração de leucócitos (I) e deslocamento da lâmina própria II, com IAH de 4.75 ± 0.50 , foram classificadas como normais.

No grupo tratado com EDMNF 80mg/kg, observou-se alterações de estágio I: dilatação dos vasos presentes nas vilosidades, hipertrofia das Células Epiteliais, hiperplasia das células Caliciformes, infiltração linfocitária estromal, vacuolização de enterócitos, infiltração de leucócitos e, e deslocamento da lâmina própria de estágio II, com valor de IAH 3.50 ± 0.57 , indicam que este órgão se manteve funcionalmente normal. As principais alterações identificadas neste tecido estão descritas na figura 38, e os valores de IAH na figura 39 e na tabela 17.

Alterações histopatológicas: Rins

No tecido renal, o grupo controle SS, com o IAH igual a zero (0.25 ± 0.50), não apresentou nenhuma alteração tecidual. Em relação ao grupo controle negativo (PGE₂), o IAH de 4.50 ± 0.57 , demonstrou que os rins, permaneceram funcionalmente normais e, as alterações observadas foram apenas de estágio I: degeneração hialina tubular leve e hipertrofia das células tubulares.

Dentre as alterações apresentadas pelo grupo controle positivo (Ind), observou-se apenas de estágio I: degeneração hialina tubular leve, hipertrofia das células tubulares, diminuição do espaço da cápsula de Bowman, dilatação dos capilares glomerulares e aumento do lúmen tubular, estas alterações não foram capazes de influenciar no funcionamento deste órgão, pois o valor de IAH (3.25 ± 0.50) indica normalidade no tecido renal.

No grupo tratado com EDMNF 80mg/kg via oral e injeção de PGE₂ via intraperitoneal, com o IAH de 2.75 ± 0.50 , foram observados alterações de estágio I e II, que não provocaram danos ao tecido, são elas: hipertrofia das células tubulares (I), diminuição do espaço da cápsula de Bowman (I), dilatação dos capilares glomerulares

(I), aumento do lúmen tubular (I), degeneração citoplasmática das células tubulares (II) e degeneração nuclear das células tubulares (II).

Destaca-se que o grupo tratado com EDMNF 80mg/kg em todos os tecidos analisados neste teste, apresentou os menores valores de IAH, variando entre 2.25 ± 0.95 e 3.50 ± 0.57 , quando comparado ao controle negativo (PGE2). EDMNF 80mg/kg, conforme mostrado na figura 39 e tabela 17, foi tão eficaz e/ou superior quanto o controle positivo (Ind) 10mg/kg na prevenção de alterações histopatológicas em todos os órgãos. As alterações observadas, descritas na figura 38, não foram capazes de causar a perda da função dos tecidos.

Fundamentado nos resultados da análise histopatológica descritos acima, os grupos tratados com EDMNF nas doses de 100 e 500mg/kg, foram as doses mais eficazes na prevenção de alterações histopatológicas causadas pela carragenina (i.p.) no fígado, assim como, a DE50 (80mg/kg) do EDMNF, foi eficaz na prevenção de alterações histopatológicas no fígado, ocasionadas pela injeção (i.p.) de dextrana, histamina e PGE2.

O fígado é fundamental para a realização do processo de metabolização de drogas, desintoxicação de substâncias, biotransformação e eliminação de xenobióticos, principalmente na forma de conjugados, sem maiores consequências, contudo, dependendo do tipo de substância e/ou concentração, podem lesionar o fígado de diversas maneiras (CARVALHO, 2018; KULKARNI, 1994 *apud* RABELO, 2008). O fígado do *zebrafish* apresenta aspectos estruturais e funcionais, semelhante ao dos mamíferos, logo, sua histopatologia pode ser comparada à de mamíferos (SOUZA *et al.*, 2019). Portanto, qualquer disfunção no tecido hepático pode ser prejudicial ao animal e até provocar a morte (CARVALHO *et al.*, 2018)

Na avaliação histopatológica foram observadas alterações nos hepatócitos e vasos sanguíneos em todos os grupos tratados com EDMNF e que receberam injeção (i.p.) dos agentes inflamatórios (carragenina, dextrana, histamina e PGE2). Algumas alterações na morfologia celular do fígado, refletem o aumento da atividade funcional deste órgão. O aumento do volume celular dos hepatócitos e a perda ou atipia do contorno celular e nuclear, encontradas em todos os grupos, são alterações que caracterizam o aumento da metabolização hepática (SILVA, 2004; VLIEGENTHART *et al.*, 2014).

A intensa vacuolização citoplasmática nos hepatócitos, alteração presente em todos os grupos, segundo Rigolin-Sá (1998), pode ser explicada pela diminuição da concentração do glicogênio e aumento da quantidade de lipídios no fígado e que estes, por sua vez, podem se combinar com agentes tóxicos, os quais se acumulariam nos hepatócitos, podendo alterar o funcionamento normal do órgão. A degeneração citoplasmática, atrofia nuclear e hiperemia, são retratadas por Silva (2004) e Borges *et al.* (2018), como um mecanismo de defesa a agentes tóxicos, onde o fígado na tentativa de adaptação, aumenta o fluxo sanguíneo, que conseqüentemente, libera mais nutrientes, oxigênio e macrófagos para as áreas danificadas, evitando a hipóxia e auxiliando no processo de desintoxicação (TAKASHIMA; HIBIYA, 1984; CARVALHO *et al.*, 2018).

A alteração necrose focal, observada somente no grupo controle negativo Carragenina, controle positivo Indometacina e nos grupos tratados com EDMNF (10 e 1000 mg/kg), no teste de edema abdominal induzido por carragenina, segundo Robins e Contran (2005) esta alteração no tecido hepático está relacionada aos processos de intoxicação, visto que, o fígado é o principal metabolizador de xenobióticos em *zebrafish*, sendo a expressão da gravidade da lesão proporcional ao tipo de lesão, duração, severidade da agressão e estado fisiológico.

North *et al.* (2010) observaram a presença de necrose em larvas de *zebrafish* sob tratamento com paracetamol. Poleksic; Karan (1999) relataram a presença de necrose nos hepatócitos de carpas. Carvalho *et al.* (2018) observou necrose nos hepatócitos de *zebrafish* e, expõe a importância de estudos histopatológicos para analisar os danos causados, uma vez que, o fígado desempenha um papel importante no armazenamento de energia e outros processos metabólicos.

As alterações hepáticas encontradas neste estudo podem ser resultado da associação dos tratamentos via oral do EDMNF e/ou fármacos padrões com a injeção intraperitoneal dos agentes inflamatórios, visto que, a administração de duas substâncias diferentes, levando em consideração que alguns compostos possuem um metabolismo complexo, isto requer uma extensa atividade hepática, podendo causar danos e influenciar na estrutura celular deste órgão (FERREIRA *et al.*, 2019).

O intestino do *zebrafish* é composto por três divisões funcionais, a porção anterior, também conhecido como bulbo intestinal, média e posterior. Devido à ausência de estômago neste animal, o bulbo intestinal, atua como principal local de

digestão de proteínas e lipídeos e, possui importante papel na absorção de nutrientes (DAMMSKI; MÜLLER, 2011). Estes processos são realizados por células mucosas, células inflamatórias e por enterócitos, presentes na camada mucosa, que através do epitélio intestinal, além de promoverem absorção de nutrientes, atuam na resposta imune, na reciclagem de enzimas e no equilíbrio osmótico (HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2013).

Em relação ao estudo histopatológico do intestino todos os grupos tratados com EDMNF (10, 100, 500, 1000 e 2000mg/kg, e a DE50=80mg/kg) foram eficazes na prevenção de alterações causadas por carragenina, dextrana, histamina e PGE2 (i.p.), visto que, todos os valores de IAH, variaram entre 0 a 10, assim como o controle positivo indometacina e ciproheptadina, indicando que estes órgãos permaneceram funcionalmente normais. Entretanto, a infiltração linfocitária, destacamento da lâmina própria, infiltração leucocitária estromal e dilatação dos vasos nas vilosidades, foram as alterações histológicas comuns em todos os grupos, que provavelmente são decorrentes da injeção intraperitoneal nos animais, pois segundo Carvalho *et al.* (2018), a injeção intraperitoneal é considerada uma técnica invasiva, que pode lesionar o intestino, ocasionando inflamação na lâmina própria intestinal e infiltração leucocitária no tecido epitelial.

A anatomia glomerular e a função dos rins do *zebrafish* são similares aos dos humanos (DAMMSKI; MÜLLER, 2011). Os rins são órgãos que estão diretamente relacionados ao metabolismo de fármacos, sendo responsáveis pela filtração e eliminação de seus metabólitos, determinando o tempo de meia-vida destas substâncias no organismo humano (FERREIRA *et al.*, 2019). Os rins do *zebrafish* adulto atuam no controle da homeostase, na eliminação da água que entra no peixe pela boca, e na excreção de substâncias através da filtração glomerular, secreção tubular ativa e reabsorção tubular passiva (BORGES *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2019; HOLDEN; LAYFIELD; MATTHEWS, 2013).

Na análise do tecido renal os valores de IAH, variaram entre 0 a 10, em todos os grupos tratados com EDMNF (10, 100, 500, 1000 e 2000 mg/kg, e a DE50=80 mg/kg), indicando sua eficácia na prevenção das alterações causadas pelos agentes inflamatórios carragenina, dextrana, histamina e PGE2 via intraperitoneal, no entanto, algumas alterações nos glomérulos e túbulos renais foram observadas. Os rins do *zebrafish* quando expostos a 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 hipercromasia, eosinofilia e apoptose celular. Estas condições levam à proliferação desordenada das células tubulares, que ocorre quando em contato com substâncias tóxicas, como mecanismo compensatório. Neste contexto, a degeneração hialina tubular leve, 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). Todavia, estas lesões relacionadas à estrutura do lúmen renal, não alteraram o funcionamento dos rins. Com base nos resultados obtidos as principais alterações encontradas nos tecidos hepático, intestinal e renal, que estão descritas na figura, não provocaram danos irreversíveis, que ocasionasse o comprometimento funcional destes órgãos.

5.3.2.6 *Docking* molecular do composto lactona desidromevalônica em alvos biológicos relacionados ao processo inflamatório

Diante dos resultados obtidos, investigou-se através do *docking* molecular, o modo de interação entre a Lactona desidromevalônica (identificada no EDMNF por GC-MS, os alvos biológicos COX-1 e COX-2, para prever a afinidade das interações com esses alvos, e assim verificar seu possível envolvimento no efeito anti-inflamatório apresentado pelo EDMNF.

O *docking* molecular é uma simulação computacional que avalia e analisa detalhadamente a formação de complexos receptor-ligante, e que utiliza os resultados para *screening* virtual e/ou entender mecanismos de ação (CUNHA et al. 2006; VEJA-TEIJIDO; CARACELLI, ZUKERMAN-SCHPECTOR, et al. 2006). Nos estudos de pesquisa em química computacional, os métodos de ancoragem molecular estão sendo cada vez mais utilizados como estratégias na descoberta de novos candidatos a fármacos (HAGE-MELIM et al. 2019).

Nos estudos de *docking* molecular os valores de RMSD calculados na validação, são necessários para se obter a acurácia das melhores poses de encaixes em comparação com as poses obtidas diretamente do PDB, simulando um experimento real. Os valores de RMSD obtidos no *docking* das enzimas Ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) foram menores que 2 Å (YUSUF et al., 2008),

sendo considerados satisfatórios. A estrutura COX-1 obteve RMSD de 0,515 Å e a COX-2 obteve RMSD de 0,461 Å.

Na simulação de *docking* com a Lactona desidromevalônica e os ligantes complexados dos alvos, foram utilizados para análise das interações, os resultados que obtiveram maior valor de GoldScore, pois indica melhor encaixe (HAGE-MELIM *et al.*, 2019).

As Ciclooxygenases (COX-1 e COX-2) convertem o ácido araquidônico (AA) para prostaglandina H₂ (PGH₂), que posteriormente servirá como substrato para as enzimas prostaglandina sintase, que são responsáveis pela produção das cinco principais prostaglandinas bioativas geradas *in vivo*, PGE₂, PGF₂α, PGD₂, PGI₂ (prostaciclina) e TXA₂ (tromboxano) (SIDHU *et al.*, 2010; HATA; BREYER 2004). As prostaglandinas produzidas via COX-1, são responsáveis por algumas funções fisiológicas de proteção, enquanto as geradas via COX-2, são sintetizadas após estímulos inflamatórios e traumas tissulares, desempenhando papel fundamental em estados de doença, incluindo câncer, inflamação, doenças cardiovasculares e hipertensão. A maioria dos AINES são não-seletivos e atuam inibindo tanto COX-1 quanto COX-2. Entretanto, a supressão da COX-1 está associada aos efeitos colaterais. A busca e desenvolvimento por novos compostos com atividade anti-inflamatória deve lidar com um tênue equilíbrio de inibição entre COX-1 e COX-2, sem inibir totalmente esta última, sendo que o mais favorável seria não formar complexo com a COX-1 (HATA; BREYER, 2004).

Nas interações realizadas entre cada ligante, a Lactona desidromevalônica e o inibidor complexado: nimesulida, com o alvo COX-1; o ligante complexado, o fármaco Nimesulida, obteve um GoldScore igual a 74,11 e a Lactona desidromevalônica em comparação obteve um valor abaixo dessa estrutura, apresentando GoldScore igual a 38,98 (Tabela 18). Quanto as interações intermoleculares com os aminoácidos do sítio de ligação, necessários para inibir esse alvo (COX-1) e desempenhar o efeito anti-inflamatório, a Lactona desidromevalônica obteve o mesmo valor de interações que a molécula complexada: nimesulida (Tabela 18). No entanto, a estrutura nimesulida obteve mais interações com os aminoácidos do sítio de ligação, interagindo com os resíduos Arg120 e Ile523, com interações hidrofóbicas, enquanto, a Lactona desidromevalônica interagiu somente com o Ile523, com interações hidrofóbicas (Tabela 18 e Figura 40A)

Tabela 18 - Interações moleculares entre a COX-1, ligante complexado e lactona desidromevalônica

Molécula	Resíduos AA	Tipo de Interações	GoldScore
Ligante Complexado: Nimesulida	Arg120 ; Leu352; Met522; Ile523 ; Ala527;	2 Hydrogen Bond; 1 Eletrostatic; 5 Hydrophobic;	74,11
Lactona desidromevalônica	Ser530; Ala527; Leu384, Met522, Ile523 ; Tyr385; Trp387; Phe518;	1 HydrogenBond; 7 Hydrophobic;	38,98

Fonte: A autora (2022).

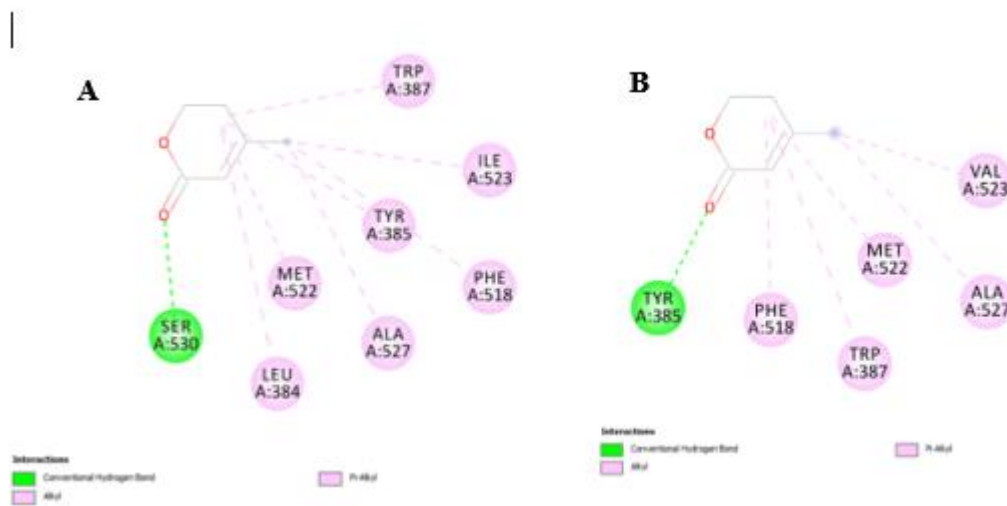


Figura 40 - Docking molecular entre a lactona desidromevalônica e a COX-1 (A) e COX-2 (B) em formato 2D

Fonte: A autora (2022).

No modo de interação entre o alvo COX-2 e os ligantes, o complexado: ácido meclofenâmico e a Lactona desidromevalônica, o valor de GoldScore da estrutura do ácido meclofenâmico (70,29) foi superior ao da Lactona desidromevalônica (33,85) (Tabela 19), o que demonstra que o complexado possui melhor acoplamento com esse alvo (Chandak et al. 2014). Assim como, nas interações moleculares, o ácido meclofenâmico obteve maior número de interações, quando comparado a Lactona desidromevalônica, com o alvo COX-2 (Tabela 19 e Figura 40B). Os dois ligantes submetidos ao *docking* obtiveram apenas interação com um dos aminoácidos importantes do sítio de ligação, o resíduo Try385. Por conta disso, desempenham

possível efeito que pode causar inibição nessa enzima (COX-2) (Orlando e Malkowski 2016). Os resultados *in silico* demonstraram o envolvimento da substância Lactona desidromevalônica na inibição das isoformas COX-1 e COX-2, com valores de GoldScore semelhantes.

Tabela 19 - Interações moleculares entre a COX-2, ligante complexado e a lactona desidromevalônica

Molécula	Resíduos AA	Tipo de Interações	GoldScore
Ligante Complexado: Ácido Meclofenâmico	Leu352; Val349; Tyr385 ; Met522; Ile523; Gly526; Ala527; Ser530; Leu531;	2 Hydrogen Bond; 1 Eletrostatic; 8 Hydrophobic;	70,29
Lactona desidromevalônica	Ile523; Tyr385 ; Trp387; Phe518; Met522; Ala527;	1 HydrogenBond; 5 Hydrophobic;	33,85

Fonte: A autora (2022).

Portanto, analisando este conjunto de resultados, de acordo com Roome *et al.*, (2008) e Coelho-De-Souza *et al.*, (2021) é possível inferir que o EDMNF atue nos eventos vasculares e celulares da inflamação, provavelmente pela inibição da síntese, liberação e/ou ação destes mediadores sobre os seus respectivos receptores, envolvendo as isoformas COX-1 e COX-

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Os resultados deste estudo demonstraram que o EDMNF apresenta atividade anti-inflamatória significativa, inclusive desencadeando um efeito dose-dependente.
- EDMNF apresentou atividade antiedematogênica no modelo de edema abdominal induzido por diferentes agentes inflamatórios (carragenina, dextrana, histamina e prostaglandina E2)
- Os resultados apontam que o efeito anti-inflamatório de EDMNF é mediado através de mecanismos que envolvem a inibição dos mediadores inflamatórios histamina e prostaglandina E2.
- Embora nenhum composto tenha sido isolado e testado, a ação anti-inflamatória do EDMNF, pode ser confirmado pelos estudos *in silico*, no qual, o composto lactona desidromevalônica, identificado no EDMNF por GC/MS, exibiu interações com os alvos terapêuticos COX-1 e COX-2.
- Analisando este conjunto de resultados, é possível inferir que o EDMNF atue nos eventos vasculares e celulares da inflamação, provavelmente pela inibição da síntese, liberação e/ou ação destes mediadores sobre os seus respectivos receptores, envolvendo as isoformas COX-1 e COX-2.
- Este estudo reflete a potencialidade de fungos endofíticos isolados da *E. oleracea*, na produção de compostos com atividade anti-inflamatória.

- AAMIR, S.; SUTAR, S.; SINGH, S. K.; BAGHELA, A. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. **Plant Pathology & Quarantine**, Thailand, v. 5, n. 2, p. 74–81, 2015. Available Doi 10.5943/ppq/5/2/6 Access: 21 ago. 2019
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005.
- ABUTAHA, N.; MASHALY, A.; AL-MEKHLAFI, F.; FAROOQ, M. Larvicidal activity of endophytic fungal extract of *Cochliobolus spicifer* (Pleosporales: Pleosporaceae) on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 50, n. 3, p. 405–414, 2015. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13355-015-0347-6> Access: 21 ago. 2019
- ALBINATI, A. C. L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B; CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D. DE; SANTOS, G.B.; VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 621–627, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-0935200900030001> Acesso em: 21 ago. 2019
- ALLER, M. A. ARIAS, J.L.; ARIAS, J. L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Med Hypotheses**, New York, v. 68, n. 1, p. 202–9, 2007. Available: doi: 10.1016/j.mehy.2006.07.004. Access: 21 ago. 2019
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 41, n. 1, p. 1–16, 2010. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-010-0034-4> Access: 21 ago. 2019
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 90, n. 6, p. 1829–1845, 2011. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-011-3270-y> Access: 21 ago. 2019
- AMORIM, J. A. S. Avaliação do espectro de reação de um sistema de diagnóstico por vídeo rastreio de peixes zebra (*Danio rerio*) expostos a cinco tóxicos distintos. Orientador: Luis Filipe Pereira de Oliva Teles. 2014, 79 F. Dissertação (Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e Toxicologia e Contaminação Ambientais, Universidade do Porto, Portugal, 2014. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/77654/2/33694.pdf> Acesso em: 21 ago. 2019
- ANDRADE, H. F. **Caracterização molecular de fungos da micoteca/ufpe e screening da produção de taxol**. Orientador: Márcia Vanusa da Silva. 2015. 56 F. Dissertação (Mestra em Biotecnologia Industrial) – Universidade Federal de

Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia Industrial, 2015.
Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/17081> Acesso em: 21 ago. 2019

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 109, n. 3, p. 464–471, 2007. Available: doi: 10.1016/j.jep.2006.08.023. Access: 21 ago. 2019

ANISHA, C.; RADHAKRISHNAN, E. K. Metabolite analysis of endophytic fungi from cultivars of *Zingiber officinale* Rosc. Identifies myriad of bioactive compounds including tyrosol. **3 Biotech**, Berlin, v. 7, n. 2, p. 1–10, 2017. Available: doi: 10.1007/s13205-017-0768-8 Access: 21 ago. 2019

ARAÚJO, W. L., LACAVA, P. T.; MARCO, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. (COORD). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Esalq, 2010.

ARMSTRONG, R.A., MARR, C., JONES, R.L. Characterization of the EP-receptor mediating dilatation and potentiation of inflammation in rabbit skin. **Prostaglandins**, New York, v. 49, n. 4, p. 205-224, 1995. Available: Doi: 10.1016/0090-6980(95)00015-3. Access: 21 ago. 2019

ASHLEY, N. T., WEIL, Z. M., NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural variation. **Annu Rev Ecol Systemat**, Palo Alto, California, v. 43, p. 385-406, 2012. Available: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530> Access: 21 ago. 2019

AZEVEDO, L. **Microorganismos endofíticos EM: Ecologia Microbiana**. São Paulo: Embrapa, 1998.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and environmental microbiology**, Washington, DC, v. 62, n. 11, p. 4039–4043, 1996.
<https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4039-4043.1996>. Access: 20 maio 2022.

BANNENBERG, G. L.; CHIANG, N.; ARIEL, A.; ARITA, M.; TJONAHEN, E.; GOTLINGER, K. H.; HONG, S.; SERHAN, C. N. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. **J Immunol.**, Baltimore :v. 174, n. 7, p. 4345-55. Apr. 2005. Available: doi: 10.4049/jimmunol.174.7.4345. Access: 21 ago. 2019

BASKAR, K.; CHINNASAMY, R.; PANDY, K.; VENKATESANB, M. SEBASTIANB, P. J.; SUBBAN, M.; THOMAS, A.; KWEKA, E. J. DEVARAJANA, N. Larvicidal and histopathology effect of endophytic fungal extracts of *Aspergillus tamaris* against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Heliyon**, New York, v. 6, n. 10, p. e05331, 2020. Available: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05331> Access: 10 ago. 2021

BATISTA, B. N.; RAPOSO, N. V. M.; SILVA, I. R. Isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de açaizeiro. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 161–174, 2018. Disponível em: DOI 10.5935/2446-4775.20180015. Acesso em: 21 ago. 2019

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J. **Processo Inflamatório. 1. Alterações Vasculares e Mediação Química**. Jaboticabal: Unesp, 2006. Disponível em: http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam_aspectosvasculares2006.pdf. Acesso em: 21 ago. 2019

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J. **Processo Inflamatório. 1. Alterações Vasculares e Mediação Química**. 2006. Disponível em: http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/GERVASIOHENRIQUEBECHARA/inflam_aspectosvasculares2006.pdf Acesso em: 21 ago. 2019

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **J antibiotic**, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 1-26. 2005. Available: <https://www.nature.com/articles/ja20051> Access: 21 ago. 2019

BERNAUD, F. S. R.; FUNCHAL, C. Atividade Antioxidante do Açaí. **Nutrição Brasil**, Porto Alegre, v. 10, n. 5, set/out. 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S1981-6723201800010030600002&lng Acesso em: 21 ago. 2019

BERWAL, M. K.; HALDHAR, S. M.; RAM, C.; GORA, J. S.; SINGH, D.; SAMADIA, D. K. GC-MS/MS-based phytochemical screening of therapeutic potential of *Calligonum polygonoides* L. flower bud against chronic diseases. **Phcog Mag**, Mumbai, v. 17, n. 5, p. 68-76, 2021. Available: <http://www.phcog.com/text.asp?2021/17/5/68/318026> Access: 10 ago. 2021

BEVILACQUA, M.P.; STENGALINS, S.; GIMBRONE, M.A.; SEED, B. Endothelium leukocyte adhesion molecule-1 an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science**, New York, v. 243, n. 4895, p. 1160-5, 1989. Available: DOI: 10.1126/science.2466335. Access: 21 ago. 2019

BOCHSLER, P.N.; SLAUSON, D.O. Inflammation and repair of tissue. *In*: SLAUSON, D.O.; COOPER, B.J. (Ed). **Mechanisms of disease: A Textbook of comparative general pathology**, 3rd Edition, St. Louis: Mosby, 2002. p. 140-245.

BORGES, R.S.; KEITA, H.; ORTIZ, B. L. S.; SAMPAIO, T. I. S.; FERREIRA, I. M.; LIMA, E. S.; SILVA, M. J. A.; FERNANDES, C.P.; OLIVEIRA, A. F. M. F. M.; CONCEIÇÃO, E. C.; RODRIGUES, A. B. L.; PEREIRA FILHO, A. C. M.; CASTRO, A. N.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in Zebrafish studies. **Inflammopharmacology**, Basel, Boston, v. 26, n. 4, p. 1057–1080, 2018. Available: <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-017-0438-9> Access: 21 ago. 2019

BRASILEIRO FILHO, G. **BOGLIOLO - Patologia geral**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BUCHBAUER, G. (2011). Book review: Andreas Herrmann (ed.). The chemistry and biology of volatiles. Chichester, UK: Wiley & Sons Ltd, 2010. **Flavour and Fragrance Journal**, New York, v. 26, n. 2, p. 139–139. Available: doi:10.1002/ffj.2037 Access: 21 ago. 2019

CAMPOS-SÁNCHEZ, J.C.; ESTEBAN, M. Á. Review of inflammation in fish and value of the zebrafish model. **J Fish Dis**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 123-139, Feb. 2021. Available: <https://doi.org/10.1111/jfd.13310> Access: 10 ago. 2021

CARVALHO, J. C. T.; KEITA, H.; SANTANA, G. R.; SOUZA, G. C.; SANTOS, I. V. F.; AMADO, J. R. R.; KOUROUMA, A.; PRADA, A. L.; CARVALHO, H. O.; SILVA, M. L.

Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: a histopathological study. **Inflammopharmacology**, Basel, Boston, v. 26, n. 1, p. 273–284, 2018. Available: DOI: 10.1007/s10787-017-0362-z Access: 21 ago. 2019

CARVALHO, J. C. T.; SERTIÉ, J. A.; BARBOSA, M. V.; PATRÍCIO, K. C.; CAPUTO, L. R.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 64, n. 2, p. 127–133, 1999. Available: DOI: 10.1016/s0378-8741(98)00116-0 Access: 21 ago. 2019

CARVALHO, J.C.T. Validacao quimica-farmacologica da especie vegetal *Pterodon emarginatus* Vog. (atividade anti-inflamatoria). Orientador: jayme antonio aboin sertie. 1998. 184 F. Tese (Doutorado) FCF, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1998.

CASSAR, S.; CASSAR, I.; FREEMAN, J. L.; GAMSE, J. T.; ITURRIA, I.; LAWRENCE, C.; MURIANA, A.; PETERSON, R. T.; VAN CRUCHTEN, S.; ZON, L. I. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 33, n. 1, p. 95–118, 2020. Available: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00335> Access: 10 ago. 2021

CASTILLO, U.; HARPER, J. K.; STROBEL, G. A.; SEARS, J.; ALES, K.; FORD, E.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAVAR, D.; JENSEN, J. B.; PORTER, H.; ROBISON, R.; MILLAR, D.; HESS, W. M.; CONDRON, M.; TELOW, D. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 224, n. 2, p. 183–190, 2003. Available: doi: 10.1016/S0378-1097(03)00426-9. Access: 21 ago. 2019

CASTRO, C. C.; GUTIÉRREZ, A. H.; SOTÃO, H. M. P. Fungos conidiais em *Euterpe oleracea* Mart. (Açaizeiro) na Ilha do Combu, Pará-Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 26, n. 4, pp. 761-771, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000400005> Acesso em: 21 ago. 2019

CASTRO, C.C.; GUTIÉRREZ, A.H.; SOTÃO, H.M.P. Fungos conidiais em *Euterpe oleracea* Mart. (Açaizeiro) na Ilha do Combu, Pará-Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 761-771, 2012. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/S0102-33062012000400005> Acesso em: 21 ago. 2019

CEDRIM, P. C. A. S., BARROS, E. M. A.; GOMES DO NASCIMENTO, T. Propriedades antioxidantes do açaí (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 21. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.09217>. Acesso em: 21 ago. 2019

CHANDAK, N.; KUMAR, P.; KAUSHIK, P.; VARSHNEY, P. SHARMA, C.; DHIRENDER KAUSHIK, D.; JAIN, S.; ANEJA, K. R.; SHARMA, P. K. Dual evaluation of some novel 2-amino-substituted coumarinylthiazoles as anti-inflammatory-antimicrobial agents and their docking studies with COX-1/COX-2 active sites. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, Basingstoke, UK, v. 29, n. 4, p. 476–484, 2014. Available: DOI: 10.3109/14756366.2013.805755 Access: 21 ago. 2019

CHAPLA, V.; BIASETTO, C. ; ARAUJO, A.. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de novos e bioativos naturais. **Revista virtual de**

Química, Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 421-437, jun. 2013. Available: <http://hdl.handle.net/11449/75343> Access: 21 ago. 2019

CHEN, S.; LIU, Z.; LIU, H.; LONG, Y.; CHEN, D.; LU, Y.; SHE, Z. Lasiodiplactone A, a novel lactone from the mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* ZJ-HQ1. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 15, n.,30, p. 6338–6341, 2017. Disponível em: doi:10.1039/c7ob01657c Acesso em: 21 ago. 2019

CHENG, J.; MA, T.; LIU, W.; WANG, H.; JIANG, J.; WEI, Y.; TIAN, H.; ZOU, N.; ZHU, Y.; SHI, H.; CHENG, X.; WANG, C. In vivo evaluation of the antiinflammatory and analgesic activities of compound Muniziqi granule in experimental animal models. **BMC Complementary and Alternative Aedicine**, London, v. 16, n. 1, p. 20, 2016. Available: DOI: 10.1186/s12906-016-0999-y Access: 21 ago. 2019

CHOWDHURY, N. S.; SOHRAB, M. H.; RANA, M. S.; HASAN, C. M.; JAMSHIDI, S.; RAHMAN, K. M. Cytotoxic Naphthoquinone and Azaanthraquinone Derivatives from an Endophytic *Fusarium solani*. **J Nat Prod**, United Arab Emirates, v. 80, n. 4, p.1173-1177, 2017. Available: doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00610. Epub 2017 Mar 3. PMID: 28257197. Access: 20 maio 2022.

CHROUSOS, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 851, p. 311–335, 1998. Available: DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x Access: 21 ago. 2019

CLARDY, J.; WASH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, London, v. 432, 829-837, 2004. Available: DOI: 10.1038/nature03194 Access: 21 ago. 2019

CLAUDINO, R. F. **Caracterização farmacológica e molecular dos mecanismos envolvidos no edema de pata induzido pela prostaglandina E2 (PGE2) em camundongos**. Florianópolis, 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; ALVES-SOARES, R.; OLIVEIRA, H. D.; GOMES-VASCONCELOS, Y. A.; SOUZA, P. J. C.; SANTOS-NASCIMENTO, T.; OLIVEIRA, K. A.; DINIZ, L. R. L.; GUIMARÃES-PEREIRA, J.; LEAL-CARDOSO, J. H. The essential oil of *hyptis crenata* pohl ex benth. Presents an antiedematogenic effect in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirao Preto, v. 54, n. 3, p. 1–9, 2021. Available: <https://doi.org/10.1590/1414-431x20209422> Access: 10 ago. 2021

CONFORTO, E. DE C.; CONTIN, D. R. Desenvolvimento do açazeiro de terra firme, cultivar pará, sob atenuação da radiação solar em fase de viveiro. **Bragantia**, Campinas, SP, v. 68, n. 4, p. 979–983, 2009. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/908/90818711018.pdf> Acesso em: 21 ago. 2019

CORDERO-MALDONADO, M. L.; SIVERIO-MOTA, D.; VICET-MURO, L.; WILCHES-ARIZÁBALA, I. M.; ESGUERRA, C. V.; WITTE, P. A.; CRAWFORD, A. D. 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**, São Francisco, v. 8, n. 10, 2013. Available: DOI:10.1371/journal.pone.0075404. Access: 21 ago. 2019

- CRAWFORD, A. D.; LIEKENS, S.; KAMUHABWA, A. R.; MAES, J.; MUNCK, S.; BUSSON, R.; ROZENSKI, J.; ESGUERRA, C. V.; WITTE, P. A. M. Zebrafish bioassay-guided natural product discovery: Isolation of angiogenesis inhibitors from East African medicinal plants. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2011. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014694> Access: 21 ago. 2019
- CUNHA, R., L., O.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I., COMASSETO, J.V. Revisiting the addition reaction of TeCl₄ to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2ol. **J. Organometallic Chem.**, Lausanne, v. 691, n. 23, p. 4807-4815, 2006. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2006.05.055> Access: 21 ago. 2019
- D'ALENÇON, C. A.; PEÑA, O. A.; WITTMANN, C.; GALLARDO, V. E.; JONES, R. A.; LOOSLI, F.; LIEBEL, U.; GRABHER, C.; ALLENDE, M. L. A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. **BMC Biology**, v. 8, p. 151, 2010. Available: DOI <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-151> Access: 05 jun 2020
- DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R. **Zebrafish**: manual de criação em biotério. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2011. 05 jun 2020
- DE ALMEIDA, J. O.; OLIVEIRA, V. R. T.; AVELAR, J. L. S.; MOITA, B. S.; LIMA, L. M. COVID-19: Fisiopatologia e alvos para intervenção terapêutica. **Rev. Virtual Quim.** Rio de Janeiro, v. 12, n. 6, p. 1464-1497, 2020. Available: <http://rvq.sbgq.org.br> Access: 10 ago. 2021
- DEZAM, A. P. G.; VASCONCELLOS, V. M.; LACAVA, P. T.; FARINAS, C. S. Microbial production of organic acids by endophytic fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Atlanta, GA, v. 11, n. July, p. 282–287, jul. 2017. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.001> Acesso em: 05 jun 2020
- DIAS, M. M. D. S.; MARTINO, H. S. D.; NORATTO, G.; ROQUE-ANDRADE, A.; STRINGHETA, P. C.; TALCOTT, S.; RAMOS, A. M.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Anti-inflammatory activity of polyphenolics from açai (*Euterpe oleracea* Martius) in intestinal myofibroblasts CCD-18Co cells. **Food & Function**, London, v. 6, n. 10, 3249–3256. 2015. Available: <https://doi.org/10.1039/C5FO00278H> Access: 05 jun 2020
- DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. **Biotechnology**, Atlanta, v. 26, p. 49-80, 1994. Available: doi: 10.1016/b978-0-7506-9003-4.50009-5. Access: 05 jun 2020
- EKAMBARAM, S. P.; PERUMAL, S. S.; PAVADAI, S. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. **Inflammopharmacology**, Basel, Boston, v. 25, n. 1, p. 147–158, 2017. Available: DOI: 10.1007/s10787-016-0303-2 Access: 05 jun 2020
- FATHIMA, B. S.; BALAKRISHNAN, R. M. Biosynthesis and optimization of silver nanoparticles by endophytic fungus *Fusarium solani*, **Materials Letters**, Washington, n. 132, p. 428–431, 2014. Available: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.matlet.2014.06.143>. Access: 20 maio 2022.
- FAVACHO, H. A. S.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, K. C.; MEDEIROS, B. J. L.; SOUSA, P. J. C.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory and

antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 105–114, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000007> Acesso em: 05 jun 2020

FELIN, I. D.; FELIN, C. R. **Patologia geral**: alterações inflamatórias e reparo. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia, 2009.

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas Endophytic F otential for the Production of Bioactive Substances. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 73–79, 2006. Disponível em: <http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/43/pdf> Acesso em: 05 jun 2020

FERREIRA, D. Q.; FERRAZ, T. O.; ARAÚJO, R. S.; CRUZ, R. A. S.; FERNANDES, C. P.; SOUZA, G. C.; ORTIZ, B. L. S.; SARQUIS, R. S. F. R.; MIRANDA, J. C. M. M.; GARRETT, R.; CARVALHO, J. C. T.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M. Libidibia ferrea (Jucá), a traditional anti-inflammatory: A study of acute toxicity in adult and embryos zebrafish (danio rerio). **Pharmaceuticals**, Basel, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2019.

FLEIT, H. B. Chronic Inflammation. In: MCMANUS LM, MITCHELL RN (ed.) **Pathobiology of Human Disease**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 300–14.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase sozymes, characterization, purification, molecular, cloning and functions. **Hypertension**, Alemanha, v. 23, n. 6, p.1121-1131, 1994. Available: <http://ahajournals.org> Access: 05 jun 2020

GALOTTA, A. L. Q. A.; BOAVENTURA, M. A. D. Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria* Mart. Arecaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 610–613, 2005. Available: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000400011> Access: 05 jun 2020

GARBIN, V. P.; HELM, C. V.; DALZOTO, P. DO R.; STUART, A. K. DA C.; ROMAGNOLI, B. A. A.; PIRES, T. DE F.; PIMENTEL, I. C. Endophytic fungi of *Euterpe edulis* (açaí-do-sul) fruits: antimicrobial activity and its relation with the growing medium. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, MT, v. 17, n. 1, p. 14–21, 2019. Available: <https://periodicos.unemat.br/index.php/rcaa> Access: 05 jun 2020

GHENO, O. **Zebrafish na ciência brasileira: produção científica, impacto e colaboração**. Orientador: Luciana Calabro. 2015. 65 F. Dissertação (Mestre educação em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do SUL, Porto Alegre. 2015.

GIORDANO, J.; GERSTMANN, H. Patterns of serotonin- and 2- methylserotonin-induced pain may reflect 5-HT3 receptor sensitization. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 483, n. 2/3, p. 267-269, 2004. Available: DOI: 10.1016/j.ejphar.2003.10.044 Access: 05 jun 2020

HAGE-MELIM, L.; POIANI J. G. C.; SILVA, C. H. T. P.; BOYLAN, F. In silico study of the mechanism of action, pharmacokinetic and toxicological properties of some N-methylantranilates and their analogs. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.

131, p. 110556, Jan. 2019. Available: DOI: 10.1016/j.fct.2019.06.003 Access: 05 jun 2020

HALL, T. A. BioEdit: Um Editor de Alinhamento de Sequência Biológica Amigável e Programa de Análise para Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A.; PORCO JR., J. A.; TOMER, D. P.; ONEILL, J. L.; HEIDER, E. M.; GRANT, S. M. Pestacin: A 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, London, v. 59, n. 14, p. 2471–2476, 2003. Available: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(03\)00255-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(03)00255-2) Access: 05 jun 2020

HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 147–166, 2004. Available: DOI: 10.1016/j.pharmthera.2004.06.003 Access: 05 Jun 2020

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. 2. ed. Florida: CRC Press, 1995.

HOLDEN, J. A.; LAYFIELD, L. J.; MATTHEWS, J. L. The Zebrafish: Atlas of Macroscopic and Microscopic Anatomy.. Cambridge MA: Cambridge University Press, 2012.

HUANG, J.; SHE, J.; YANG, X.; LIU, J.; ZHOU, X.; YANG, B. A new macrodiolide and two new polycyclic chromones from the fungus *penicillium* sp. SCSIO041218. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 9, p. 1–7, 2019. Available: DOI: 10.3390/molecules24091686 Access: 05 jun 2020

HUANG, S. Y.; FENG, C-W.; HUNG, H-C.; CHAKRABORTY, C.; CHEN, C-H.; CHEN, W-F.; JEAN, Y-T-H.; WANG, H-M. D.; SUNG, C-S.; SUN, Y-M.; WU, C-Y.; LIU, W.; HSIAO, C-D.; WEN, Z-H. A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 9, n. 8, 2014. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104414> Access: 05 jun 2020

ISHII, S.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Prog Lipid Res**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 41-82, 2000. Available: DOI: 10.1016/s0163-7827(99)00016-8 Access: 05 jun 2020

IVANOVA, V., KOLAROVA, M., ALEKSIEVA, K., SCHLEGEL, R., SCHUMANN, P., GRAEFE, U. Octadeca-8,11-dienoic acid methylester, a new fatty acid metabolite from *Fistulina hepatica*. **Journal of Modern Medicinal Chemistry**, London, 1, 43–48, 2013.

JADULCO, R.; BRAUERS, G.; EDRADA, R. E.; EBEL, R.; SUDARSONO, V. W.; PROKSCH, P. New Metabolites from Sponge-Derived Fungi *Curvularia lunata* and. **Journal of Natural Products**, Washington,, v. 65, n. 5, p. 730–733, 2002. Available: <https://doi.org/10.1021/np010390i> Access: 05 jun 2020

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, V.; MAJAHAN, R. T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research - Scholar Research Library**, Udaipur, India, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011. Available:

<https://www.researchgate.net/publication/258884981> A review Natural products from plant associated endophytic fungi Access: 05 jun 2020

JALLOULI, R.; OTHMAN, H.; AMARA, S.; PARSIEGLA, G.; CARRIERE, F.; SRAIRI-ABID, N.; GARGOURI, Y.; BEZZINE, S. The galactolipase activity of *Fusarium solani* (phospho) lipase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 3, p. 282-9, 2015. Available: doi: 10.1016/j.bbalip.2014.12.010. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25529980. Access: 20 maio 2022.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014. Available: doi: 10.1016/j.tips.2013.12.002 Access: 05 jun. 2020

KASSUYA, C. A. L.(org.). **Aspectos gerais da inflamação e da dor**. Dourados, MS: Editora UFGD, 2013 (Coleção Cadernos Acadêmicos).

KHAYAT, M. T.; IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, G. A.; ABDALLAH, H. M. Anti-inflammatory metabolites from endophytic fungus *Fusarium* sp. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 29, p. 104–109, feb. 2019. Available: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.11.024> Access: 05 jun. 2020

KHLOYA, P.; KUMAR, S.; KAUSHIK, P.; SURAIN, P.; KAUSHIK, D.; SHARMA, P.K. Synthesis and biological evaluation of pyrazolylthiazole carboxylic acids as potent anti-inflammatory-antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 1177–81, 15 mar. 2015.

KIM, M.H.; SON, Y-J; LEE, S. Y.; YANG, S. Y.; YU, Y-S.; YOON, D. H.; YANG, Y.; KIM, S. H.; LEE, D.; RHEE, M. H.; KAMG, H.; KIM, T. W.; SUNG, G. H.; CHO, J. Y. JAK2-targeted anti-inflammatory effect of a resveratrol derivative 2,4-dihydroxy-N-(4-hydroxyphenyl)benzamide. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 86, n. 12, p. 1747–61, dez. 2013. Available: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.006> Access: 10 jun 2020

KINGSTON, W. P., GREAVES, M. W. Actions of prostaglandin E2 metabolites on skin microcirculation. **Agents Actions**, Germany, v. 16, n. 1-2, p. 13-14, 1985. Available: DOI: 10.1007/BF01999628 Access: 10 jun 2020

KOBORI, M., YOSHIDA, M., OHNISHI-KAMEYAMA, M., SHINMOTO, H. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. **British journal of pharmacology**, London, 150, 209–219, 2007.

KRINGS, U.; ZELENKA, K.; WU, S.; BERGER, R. G. Thin-layer high-vacuum distillation to isolate volatile flavour compounds of cocoa powder. **European Food Research and Technology**, EUA, v. 223, n. 5, p. 675–681, 2006. Available: Access: 10 jun 2020

KUBES, P.; KAMWAR, S.; NIU, X-F.; GABOURY, J. P. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Hoboken, NJ, v. 7, p.1293–1299, 1993. Available: <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.13.8405815> Access: 10 jun 2020

KULKARNI, A. P; BYCZKOWSKI. Hepatotoxicology. In: HODGSON, E; LEVI, P. E. **Introduction to biochemical toxicology**. New York: Wiley-Interscience, 1994, p. 459-489.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KUMLA, D.; AUNG, T. S; BUTTACHON, S.; DETHOUP, T.; GALES, L.; PEREIRA J. A.; INÁCIO, Â.; COSTA, P. M.; LEE, M.; SEKEROGLU, N.; SILVA, A. M. S.; PINTO, M. M. M.; KIJJOA, A. A. A new dihydrochromone dimer and other secondary metabolites from cultures of the marine sponge-associated fungi *Neosartorya fennelliae* KUFA 0811 and *Neosartorya tsunodae* KUFC 9213. **Marine Drugs**, Basel, Switzerland, 15, n. 12, p. 375, 2017. Available: DOI: 10.3390/md15120375 Access: 10 jun 2020

KUNDU, J.K.; SURH, Y.J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 659, n. 1-2, p. 15–30, mar. 2008, Available: DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.03.002 Access: 10 ago. 2021

LEARY, S; UNDERWOOD, W.; ANTHONY, R.; CARTNER, S.; COREY, D.; GRANDIN, T.; GREENACRE, C.; GWALTNEY-BRANT, S.; McCRACKIN, M. A.; MEYER, R.; MILLER, D.; SHEARER, J.; YANONG, R. **AVMA** guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2013. 102p. Available: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>. Access: 10 ago. 2021

LEE, H. S.; PHAT, C.; NAM, W. S.; LEE, C. Optimization of culture conditions of *Fusarium solani* for the production of neoN-methylsalsalvamide. **Biosci Biotechnol Biochem.**, Tokyo, Japan v. 78, n. 8, p. 1421-7, 2014. Available: doi: 10.1080/09168451.2014.921554. Epub 2014 Jun 12. PMID: 25130748. Access: 20 maio 2022.

LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIYAZAKI, C. M. S.; MIGUEL, O.G.; CÔCCO, L.C.; YAMAMOTO, C.I.; MIGUEL, M. D. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia- SP, v. 14, n. 2, p. 321–326, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200011>. Acesso em: 10 ago. 2021

LINS, J. A. P. N; KIRSCHNIK, P. G; QUEIROZ, V. S. CÍRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**. Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LIU, H.; BAO, X. Characterization of a chitosanase from *Fusarium solani* and its expression in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Wei Sheng Wu Xue Bao.**, China, v. 49, n. 12, p. 1607-12, 2009. Available: PMID: 20222446. Access: 20 maio 2022.

LONGHI S, NICOLAS A, JELSCH C. Structure-function studies on cutinase, a small lipolytic enzyme with a water accessible active site. In: ALBERGHINA, L. (ed), **Protein engineering in industrial biotechnology**. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2005. p. 75-114.

LORDAN, R.; TSOUPRAS, A.; ZABETAKIS, I. **Inflammation**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

LOWENSTEIN, C.J.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger minireview. **Cell Press**, EUA, v. 70, n. 5, p. 705–707, 1992. Available: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90301-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90301-R) Access: 10 ago. 2021

MA, L.; CHEN, H.; DONG, P., LU, X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. **Food Chemistry**, London, v. 139, n.1–4, p. 503-508, 2013. Available: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.030> Access: 10 ago. 2021

MAGALHÃES, T. S. S. A.; MACEDO, P. C. O. CONVERTI, A.; LIMA, Á. N. A. The Use of *Euterpe oleracea* Mart. As a new perspective for disease treatment and prevention. *Biomolecules*, Basel, v. 10, n. 6, p. 1–33, 2020. Available <https://doi.org/10.3390/biom10060813> Access: 10 ago. 2021

MALONZO, C. A.; GUERRERO, J. J. G.; FULLEROS, M. C.; MADRIDEO, R. E. A. GC-MS Analysis of Metabolites from *Aspergillus tamaritii* and *Trichoderma* sp. Detected Promising Biological Compounds. **Bicol University R & D Journal**, Philippines, v. 21, n. 2, p. 16–4139, 2018. Available: <https://journal.bicol-u.edu.ph/index.php/rnd/article/view/43> Access: 10 ago. 2021

MANNESSE, M. L. M. **Enantioselectivity of cutinase from *Fusarium solani***. PhD Thesis, University of Utrecht, The Netherlands, 1997.

MERLIN, J. N.; CHRISTUDAS, I. V. S. N.; KUMAR, P. P. Optimization of growth and bioactive metabolite production: *Fusarium solani*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, India, n. 6, p. 98–103, 2013.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, Baltimore, v. 43, n. 2):109-42, Jun. 1991. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1852778/> Access: 10 ago. 2021

MONTERO, S. V. **Análise do efeito da ativação dos receptores tipo Toll 2 (TLR-2) sobre a replicação do HIV-1 em células primárias humanas**. Orientador: Bou Dumith Chequer Bou-Habib. 2011. 88 F. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro, 2011.

MOURA, R. S.; FERREIRA, T. S.; LOPES, A. A.; PIRES, K. M.; NESI, R.T.; RESENDE A. C.; SOUZA. P. J.; SILVA, A. J.; BORGES, R. M.; PORTO, L. C.; VALENCA, S.S. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine*. 2012 Feb 15;19(3-4):262-9. Available: doi: 10.1016/j.phymed.2011.11.004. Access: 10 ago. 2021

MUSSULINI, B. H.; LEITE, C. E.; ZENKI, K. C.; MORO, L.; BAGGIO, S.; RICO, E. P.; ROSENBERG, D. B.; DIAS, R. D.; SOUZA, T. M.; CALCAGNOTTO, M. E.; CAMPOS, M. M.; BATTASTINI, A. M.; OLIVEIRA, D. L. Seizures Induced by Pentylene-tetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. **PLoS ONE**, São Fransisco, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013. Available: DOI: 10.1371/journal.pone.0054515 Access: 05 jun 2020

NAKAJIMA, H.; HAMASAKI, T.; TANAKA, K.; KIMURA, Y.; UDAGAWA, S-I.; HORIE, Y. Produção de Ciclosporina por Fungos Pertencente ao Gênero

Neocosmospora. **Química Agrícola e Biológica**, São Paulo, v.53, n. 8, p. 2291-2292, 1989. Disponível em: DOI: 10.1080/00021369.1989.10869637. Acesso: 20 maio 2022.

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 82, p. 50–59, maio 2015. Available: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401015000601> Acesso: 05 jun 2020

NORTH, T.E.; BABU, I. R.; VEDDER, L. M.; LORD, A. M.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R.; ZON, L. I.; GOESSLING, W. PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury. **Proc Natl Acad Sci, USA.**, v. 107, p. 17315–17320, 2010.

NUSSELIN-VOLHARD, C.; DAHM, R. **Zebrafish a practical approach**. Oxford University Press, 2000.

OECD. **Test No. 425**: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2008. Available: <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>. Acesso: 05 jun 2020

OEHLERS, S. H.; FLORES, M. V.; HALL, C. J.; CROSIER, K. E.; CROSIER, P. S. Retinoic acid suppresses intestinal mucus production and exacerbates experimental enterocolitis. **DMM Disease Models and Mechanisms**, Cambridge, v. 5, n. 4, p. 457–467, 2012. Available: DOI: 10.1242/dmm.009365 Acesso: 05 jun 2020

OEHLERS, S. H.; FLORES, M. V.; HALL, C. J.; OKUDA, K. S.; SISON, J. O.; CROSIER, K. E.; CROSIER, P. S. Chemically induced intestinal damage models in zebrafish larvae. **Zebrafish**, Larchmont, NY, v. 10, n. 2, p. 184–193, 2013. Available: doi: 10.1089/zeb.2012.0824. Acesso: 05 jun 2020

OH, Y. C.; JEONG, Y. H.; CHO, W. K.; HA, J. H.; GU, M. J.; MA, J. Y. Antiinflammatory and analgesic effects of Pyeongwisan on LPS-stimulated murine macrophages and mouse models of acetic acid-induced writhing response and xyleneinduced ear edema. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, Switzerland, v. 16, n. 1, p. 1232– 51, jan. 2015. Available: DOI: 10.3390/ijms16011232 Acesso: 05 jun 2020

OKOKON, J. E.; NWAFOR, P. A.; CHARLES, U.; DAR, A.; CHOUDHARY, M. I. Antioxidative burst and hepatoprotective effects of ethanol root extract of Hippocratea africana against paracetamol-induced liver injury. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 51, n. 7, p. 872–880, 2013. Available: DOI: 10.3109/13880209.2013.768273 Acesso: 05 jun 2020

OKUSE, K. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. The International. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 39, p. 490, p. 496, 2007. Available: DOI: 10.1016/j.biocel.2006.11.016 Acesso: 05 jun 2020

OLIVEIRA, B. R. F. **Efeitos do herbicida 2,4 ? Diclorofenoxiacético (2,4-D) sobre a morfologia de brânquias e parâmetros comportamentais em peixe-zebra Danio rerio adultos**, 2020. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2020.

OLIVEIRA, M. T. P. **Efeito anti-inflamatório do MHTP, uma nova molécula do tipo alcaloide tetrahidroisoquilínico**. Orientador: Marcia Regina Piuvezam, 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

ONAH, A. I.; KENECHUKWU, C. F.; BEREBO, P. D.; AGBOKE, A. A.; IBEZIM, E. C.; ATTAMA, A. A. Acute Oral Toxicity Studies of the Crude Extract of Endophytic Fungi Isolated from *Annona senegalensis* Pers. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, India, v. 10, n. 3, p. 207–216, 2020. Available: <http://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/4052> Access: 10 ago 2021

ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G. Substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by fenamic acid derivatives is dependent on peroxide tone. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 291, n. 29, p. 15069–15081, 2016. Available: DOI: 10.1074/jbc.M116.725713 Access: 05 jun 2020

PAL, P. P.; SHAIK, A. B.; BEGUM, A. S. Prospective leads from endophytic fungi for anti-inflammatory drug discovery. **Planta Medica**, Stuttgart, NY, v. 86, n. 13–14, p. 941–959, 2020. Available: DOI: 10.1055/a-1140-8388 Access: 10 ago 2021

PARNG, C.; SENG, W. L.; SEMINO, C.; MCGRATH, P. Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. **ASSAY and Drug Development Technologies**, Larchmont, NY, v. 1, n. 1, p. 41–48, 2002. Available: DOI: 10.1089/154065802761001293 Access: 05 jun 2020

PATIL, K. R.; MAHAJAN, U. B.; UNGER, B.S.; GOYAL, S. N.; BELEMKAR, S.; SURANA, S. J.; OJHA, S.; PATIL, C. R. Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs: Implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. International. **Journal of Molecular Sciences**, Basel, Switzerland, v. 20, n. 18, 2019. Available: DOI: 10.3390/ijms20184367 Access: 10 ago 2021

PEREIRA, J. O. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. Orientador: João Lucio de Azevedo. 1993. 119 F. Tese (Doutor em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade de São Paulo, 1993.

PERIANAYAGAM, J. B.; SHARMA, S. K.; PILLAI, K. K. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. **J Ethnopharmacol**, Limerick : v. 104, n. 3, p. 410-4, 2006. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.077> Access: 05 jun 2020

POLEKSIC, V.; KARAN, V. Effects of trifluralin on carp: Biochemical and Histological Evaluation. **Ecotox Environ Safe**, San Diego, v. 43, n. 2, p. 213-221, 1999.

POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Fishing News Books, Cambridge. p.339-352, 1994.

PROENÇA BARROS, F. A.; RODRIGUES-FILHO, E. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, NY, v. 33, n. 3, p. 257–268, 2005. Available:

<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-63b728fb-c99e-31da-a287-01024c907503> Access: 05 jun 2020

PURI, S. C.; HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, GN. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 494–510, 2006. Available: DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.10.015 Access: 05 jun 2020

QUITIAN-USECHE, Y. F.; QUITIAN-USECHE, Y. F.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; BORGES, S.F.; RAMOS, B.; DE SOUZA, G. C.; BATISTA, M. A.; DA SILVA HAGE MELIM, L. I. S. H.; FERREIRA, I. M.; CARVALHO, J. C. T.; BORGES, R. S. Fatty ethanolamide of *Bertholletia excelsa* triglycerides (Brazil nuts): anti-inflammatory action and acute toxicity evaluation in Zebrafish (*Danio rerio*).

Inflammopharmacology, Basel, Boston, v. 29, n. 5, p. 1519–1537, 2021. Available: Access: 15 nov 2021

RABELO, A. F. L. **Estudo da toxicidade hepática da Trans-desidrocrotonina, um diterpeno obtido de Croton cajucara Benth, e de estratégias farmacológicas preventivas em modelos animais**. 2008. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)– Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2008.

RAIANA, S. G.; RODRIGUES, J. G. C.; MATIAS, R. R.; BATISTA, B. N.; OLIVEIRA, R. L.; ALBUQUERQUE, P. M. Biological activity and production of metabolites from Amazon endophytic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, Nigeria, v. 14, n. 2, p. 85–93, 2020. Available: DOI: 10.5897/AJMR2019.9207 Access: 15 nov 2021

RAMOS, A. G. B., DE MENEZES, I. R. A., DA SILVA, M. S. A., TORRES PESSOA, R., DE LACERDA NETO, L. J., ROCHA SANTOS PASSOS, F. QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and Its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models. **Foods**, Basel, v. 9, n. 5, p. 630, 2020. Available: a doi: 10.3390/foods9050630 Access: 15 nov 2021

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Tradução de Patricia Josephine Voeux. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001.

RATHNA, J.; YAZHINI, K. B. AJILDA, A. A.; PRABU, H. G.; PANDIAN, S. K. Production of naphthoquinones and phenolics by a novel isolate *Fusarium solani* PSC-R of Palk Bay and their industrial applications. **Bioresour Technol.** Amsterdam, n. 213, p. 289-298, 2016. Available: doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.050. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27156595. Access: 20 maio 2022.

REIS, C. M. F. CARVALHO, J. C. T.; CAPUTO, L. R. G.; PATRICIO, K. C. M.; BARBOSA, M. V. J.; CHIEFF, A. L.; BASTOS, J. K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 9/10. n. 1. p. 43-52, 2000. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-534794> Acesso em: 05 jun 2020

REN, S.; HE, K.; GIRSHICK, R.; ; SUN, J. Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks. **IEEE Transactions on Pattern**

Analysis and Machine Intelligence, New York, v. 39, n. 6, p. 1137-1149, Jun. 2017. Available: 10.1109/TPAMI.2016.2577031 Access: 05 jun 2020

RIBEIRO, L. C. Investigação do efeito ictiotóxico do extrato etanolico da raiz de *Spilanthes Acmella* (jambu) em zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental. Orientador: Fernando Allan de Farias Rocha. 2013. 61 F. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

RIGOLIN-SÁ, O. Toxicidade do herbicida Roundup (glifosato) e do acaricida Omite (propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, *Rhandia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes). 1998. 307 f. Tese (Doutorado em Recursos Naturais) Curso de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil, 1998.

RODRIGUES, F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, London, v. 86, p. 376-385. 1994. Available: DOI: 10.1080/00275514.1994.12026423 Access: 05 jun 2020

RODRIGUES, K. F. Fungos endofíticos em *Euterpe oleracea* Mart., com ênfase em Xylariaceae. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Belém, PA, v. 2, n. 7, p. 429-39, 1991.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Oxford, v. 21, p. 61-65, 2010. Available: DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.006 Access: 05 jun 2020

ROOME, T.; DAR, A.; ALI, S.; NAQVI, S.; CHOUDHARY, M. I. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v. 118, n. 3, p. 514–521, Aug. 2008. Available: DOI: 10.1016/j.jep.2008.05.021 Access: 05 jun 2020

ROTTMANN, R.W., FRANCIS-FLOYD, R.; DURBOROW, R. The role of stress in fish disease. **Southern Regional Aquaculture Center – SRAC**, Kentuck, n. 474, p. 1-4, 1992. Available: <https://www.ncrac.org/files/biblio/SRAC0474.pdf> Access: 05 jun 2020

ROY, S.; BANERJEE, D. **Recent advancement in white biotechnology through fungi**. 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-14846-1> Acesso em: 05 jun 2020

ROY, S.; BANERJEE, D. Volatile Organic Compounds from Endophytic Fungi. In: NATH, A.; SANGRAM, Y.; SHASHANK, S.; GUPTA, M. A. (Ed.) **Recent advancement in white biotechnology through fungi perspective for value-added products and environments**, Alemanha: Springer, 2019. v. 2. Available: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-14846-1> Access: 15 nov 2021

SAGNIA. B.; FEDELI, D.; CASETTI, R.; MONTESANO, C.; FALCIONI, G.; COLIZZI, V. Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Cassia alata*, *Eleusine indica*, *Eremomastax speciosa*, *Carica papaya* and *Polyscias fulva* medicinal plants collected in Cameroon. **PloS one**, São Francisco, v. 9, n. 8, p. e103999, jan. 2014. Available: DOI: 10.1371/journal.pone.0103999 Access: 10 ago. 2021

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees., **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, Jul 1987. Available: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454> Access: 10 ago. 2021

SANDOVAL-DENIS, M.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. **Persoonia**, Netherlands, n. 43, p. 90–185, 2019. Available: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.04>. Access: 20 maio 2022.

SANTAMARINA, A. B.; JAMAR, G.; MENNITTI, L. V.; DE ROSSO, V. V.; CESAR, H. C.; OYAMA, L. M.; PISANI, L. P. The use of Juçara (*Euterpe edulis* Mart.) supplementation for suppression of NF-κB pathway in the hypothalamus after high-fat diet in Wistar rats. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 7, p. 1–13, 2018. Available: DOI: 10.3390/molecules23071814 Access: 05 jun 2020

SANTOS, B. L. G.; GAMA, J. R. V.; RIBEIRO, R. B. S.; ANJOS, R. K. F.; GOMES, K. M. A.; XIMENES, L. C.; MELO, L. O. Estrutura e valoração de *Euterpe oleracea* em uma floresta de várzea na Amazônia. *Advances in Forestry Science*. ISSN: 2357-8181 **Adv. For. Sci.**, Cuiabá, v.5, n.3, p.391-396, 2018.

SANTOS, I. V. F. **Estudo da toxicidade da fitopreparação popular a base de leite de janaguba (*Himatanthus drasticus*, Plumel 1990) em modelo de Zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822)**. Orientador, José Carlos Tavares Carvalho 2016. 1145 F. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amapá-UNIFAP, Macapá, 2016.

SANTOS, S. B. **Toxicidade aguda do pesticida clorpirifós de formulação comercial em tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818)**. Orientador: Prof. Dr. Ruy Bessa Lopes. 2019. 89 F. Dissertação (Mestre em Biociências) – Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2019.

SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, M., HONNEN, W., & TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, German, v. 6, n. 1, p. 75-86. 1997. Available: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008212000208> Access: 05 jun 2020

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents and Actions**, Basel, v. 18, n.3-4, p. 439–446, 1986. Available <https://doi.org/10.1007/BF01965009> Access: 10 ago. 2021.

SEO, Y. H.; DAMODAR, K.; KIM, J.K.; JUN, J.G. Synthesis and biological evaluation of 2-arylbenzofurans, rugchalcones A, B and their derivatives as potent antiinflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 1521–4, 15 mar. 2016. Available: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.023> Access: 10 ago. 2021.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol.**, Palo Alto, California, v. 25, p. 101-37, 2007. Available: OI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647 Access: 10 ago. 2021.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. **British journal of pharmacology**, London, v. 153 Suppl 1, p. S200–S215, 2008. Available: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707489> Access: 10 ago. 2021.

SIDHU, R. S.; LEE, J. Y.; YUAN, C.; SMITH, W. L. Comparison of cyclooxygenase-1 crystal structures: Cross-talk between monomers comprising cyclooxygenase-1 homodimers. **Biochemistry**, Washington, v. 49, n. 33, p. 7069–7079, 2010. Available: <https://doi.org/10.1021/bi1003298> Access: 10 ago. 2021.

SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores de contaminação aquática**. 2004. 74 F. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2004.

SIQUEIRA, A. C. A.; BRITO, E. S.; SILVA JR., ; I. J.; SANTANA, H. B. Partição de Antocianinas da Polpa de Açaí (*Euterpe oleracea* M.) em Sistema Aquoso Bifásico Etanol/Sulfato de Amônio. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. 21., Fortaleza, 2016. **[Anais...]**. Fortaleza: CBEQ, 2016. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/34462> Acesso em: 10 ago. 2021

SIVAMANI, S.; JOSEPH, B.; KAR, B. Anti-inflammatory activity of *Withania somnifera* leaf extract in stainless steel implant induced inflammation in adult zebrafish. **J Genet Eng Biotechnol**, Netherlands, v.12, p. 1–6, 2014.

SMITH, C. W.; ROTHELEIN, R.; HUGHES, B.; MARISCALCO, M.M.; SCHMALSTIEGE, F.C.; ANDERSON, D.C. Recognition of endothelium determinat for CD 18-dependent neutrophil adherence and tranendothelial migration. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 82, p. 1746, 1988. Available: doi: 10.1172/JCI113788 Access: 10 ago. 2021

SMITH, C.W.; KISHIMOTO, T.K.; ABBASS, O.; HUGHES, B.; ROTHELEIN, R.; MCINTERE, L.V.; BUTCHER, E.; ANDERSON, D.C. Chemotatic factors regulated lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 87, p. 609, 1991. Available: DOI: 10.1172/JCI115037 Access: 10 ago. 2021

SOLOMON, L. M.; JUHLIN, L.; KIRSCHENBAUM, M. B. Prostaglandina na vasculatura cutânea. **J Invest Dermatol.**, Baltimore, v. 51, n. 4, p. 280-2, Out. 1968.

SOUZA, B. S. F.; CARVALHO, H. O.; FERREIRA, I. M.; DA CUNHA, E. L.; BARROS A. S.; TAGLIALEGNA, T.; CARVALHO, J. C. T. Effect of the treatment with *Euterpe oleracea* Mart. oil in rats with Triton-induced dyslipidemia. **Biomed Pharmacother.**, New York, v. 90, p. 542-547, Jun. 2017. Available: doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.005 Access: 10 ago. 2021.

SOUZA, C. G.; SILVA, I. D. R.; VIANA, M. D.; M, MELO, N. C.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; OLIVEIRA, M. N. R.; BARBOSA W. R.; FERREIRA I. M.; CARVALHO J. C. T. Acute Toxicity of the Hydroethanolic Extract of the Flowers of *Acmella oleracea* L. in Zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and Histopathological Studies. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 12, n. 4, .p. 173, 2019. Available: doi: 10.3390/ph12040173 Access: 10 ago. 2021.

SOUZA, G. C. **Estudo da toxicidade da nanoemulsão de álcool perílico (npoh) sobre zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**. Orientador: José Carlos Tavares

Carvalho. 2015. 87 F. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, 2015.

SOUZA, G. C.; DUARTE, J. L.; FERNANDES, C. P.; MOYADO, J. A. V.; NAVARRETE, A.; CARVALHO, J. C. T. Obtainment and Study of the Toxicity of Perillyl Alcohol Nanoemulsion on Zebrafish (*Danio rerio*). **J Nanomed Res**, Budapest, v. 4, n. 4, p. 00093, 2016. Available DOI: 10.15406/jnmr.2016.04.00093 Access: 10 ago. 2021

STOYKE, G.; EGGER, K. N.; CURRAH, R. S. Characterization of sterile endophytic fungi from the mycorrhizae of subalpine plants. **Canadian Journal of Botany**, Canadá, v. 70, n. 10, p. 2009-2016, 1992.

SUGIURA, Y.; BARR, J. R.; BARR, D. B.; BROCK, J. W.; ELIE, C. M.; UENO, Y.; PATTERSON, G. D.; POTTER, M. P.; REISS, E. Physiological characteristics and mycotoxins of human clinical isolates of *Fusarium* species, **Mycological Research**, v. 103, n. 11, p. 1462-1468, 1999. Available: <https://doi.org/10.1017/S095375629900862X>. Access: 20 maio 2022.

TAKASHIMA F, HIBIYA T (ed.). An atlas of fish histology. *In: Normal and pathological features*. 2nd ed. California: Tokyo Kodansha Ltd, 1995. p 195.

TAKASHIMA F, HIBIYA T. An atlas of fish histology. *In: Normal and pathological features*. California: Tokyo Kodansha Ltd, 1984. p 69(3):406.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol.**, Palo Alto, California, v. 21, p. 335-76, 2003. Available: Doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126 Access: 10 ago. 2021

TAKEMOTO, K.; KAMISUKI, S.; CHIA, P. T.; KURIYAMA, I.; MIZUSHINA, Y.; SUGAWARA, F. Bioactive dihydronaphthoquinone derivatives from *Fusarium solani*. **J Nat Prod.**, United Arab Emirates, v. 77, n. 9, p. 1992-6. 2014. Available: doi: 10.1021/np500175j. Epub 2014 Aug 28. PMID: 25163667. Access: 20 maio 2022.

TAMADDONFARD, E.; FARSHID, A. A.; HOSSEINI, L. Crocin alleviates the local paw edema induced by histamine in rats. **Avicenna J Phytomed. Spring**, Mashhad, Iran, v. 2, n. 2, p. 97-104, 2012. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25050237/> Access: 10 ago. 2021

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.**, Oxford: The Society for Molecular Biology and Evolution, Oxford University, 2013.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, London, v. 18, p. 448-459, 2001. Available: DOI: 10.1039/b100918o Access: 10 ago. 2021

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-82, 1997. Available: doi: 10.1093/nar/25.24.4876. Access: 10 ago. 2021

THURMOND, R. L.; GELFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature**

Reviews Drug Discovery, London, v. 7, n. 1, p. 41–53, jan. 2008. Available: <https://www.nature.com/articles/nrd2465> Access: 10 ago. 2021

VEJA-TEIJIDO, M.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofurán-and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. (2006). **J. Mol. Graph Model.**, New York, v. 24, p. 349-355. 2006. Available: DOI: 10.1016/j.jmglm.2005.09.008 Access: 10 ago. 2021

VENTURINI, F. P. **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposto a concentração subletal de triclorfon e recuperação**. Orientador: Gilberto Moraes. 2010. 78 F. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2010.

VIDYALAKSHMI, R.; PARANTHAMAN, R.; MURUGESH, S.; SINGARAVADIVEL, K. Microbial Bioconversion of Rice Broken to Food Grade Pigments. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**, Tamil Nadu, India, v. 4, n. 2, p. 84–87, 2009.

VLIEGENTHART, A. D.; TUCKER, C. S.; DEL POZO, J.; QUERIDO, J. W. Zebrafish como organismos modelo para estudar lesões hepáticas induzidas por drogas. **Frei J. Clin. O Pharmacol**, London, 78, 1217-1227, 2014.

WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANCY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a new anti-inflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 57, n. 9, p. 559-63, Sep. 2004. Available: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.57.559> Access: 10 ago. 2021

WILLIAMS, K.I., HIGGS, G. A. Eicosanoids and inflammation. **J. Pathol.**, London, v. 156, n. 2, p. 101-110, 1988. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3058912/> Access: 10 ago. 2021

WOLFF, L. L.; DONATTI, L. Estudo do comportamento do peixe de água doce *Phalloceros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) submetido à alteração artificial do pH. **Luminária**, União da Vitória, v. 18, n. 1, p. 10-21, 2016. Disponível em <http://periodicos.unespar.edu.br/index.php/luminaria/article/view/1026> Acesso em: 10 ago. 2021

WU, Y. R.; NIAN, D.L. Production optimization and molecular structure characterization of a newly isolated novel laccase from *Fusarium solani* MAS2, an anthracene-degrading fungus. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 382–389, 2014. Available <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.ibiod.2013.10.015>. Access: 20 maio 2022.

XIE, Y.; MEIJER, A. H.; SCHAAF, M. J. M. Modeling Inflammation in Zebrafish for the Development of Anti-inflammatory Drugs. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 8, p. 620984, Jan, 2021. Available: doi: 10.3389/fcell.2020.620984 Access: 10 ago. 2021

YASUKAWA, K.; AOKI, T.; TAKIDO, M.; IKEKAWA, T.; SAITO, H.; MATSUZAWA, T. Inhibitory effects of ergosterol isolated from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus* on TPA-induced inflammatory ear oedema and tumour promotion in mice. **Phytother. Res.** London, v. 8, p. 10–13, 1994.

YING, Y. M.; ZHANG, L. W.; SHAN, W. G.; ZHAN, Z. J. Secondary metabolites of *Peyronellaea* sp. XW-12, an endophytic fungus of *Huperzia serrata*. **Chemistry of Natural Compounds**, London, v. 50, n. 4, p. 723–725, 2014. Available: <https://doi.org/10.1007/s10600-014-1063-0> Access: 10 ago. 2021

YUSUF, D.; DAVIS, A. M.; KLEYWEGT, G. J.; SCHMITT, S. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **J Chem Inf Model**, v. 48, n. 7, p. 1411–22, 2008. Available: Access: 10 ago. 2021

ZANANDREA, R.; BONAN, C. D.; CAMPOS, M. M. Zebrafish as a model for inflammation and drug discovery. **Drug Discovery Today**, Amsterdam, v. 25, n. 12, p. 2201–2211, 2020. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644620303962?via%3Dihub> Access: 10 ago. 2021

ZEBRAFISH INTERNATIONAL RESOURCE CENTER. **Zebrafish**. Oregon: ZIRC, 2006. Available: <https://www.zebrafish.org/home/guide.php> Access: 10 ago. 2021

ZHANG, M.; ZHAO, J-L.; LIU, J-M.; CHEN, R-D.; XIE, K-B.; CHEN, D-W.; FENG, K-P.; ZHANG, D.; DAI, J-G. Neural anti-inflammatory sesquiterpenoids from the endophytic fungus *Trichoderma* sp. Xy24. **Journal of Asian Natural Products Research**, London, v. 19, n. 7, p. 651–658, 3 jul. 2017. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27835936/> Access: 10 ago. 2021

ZHANG, Q.; LUAN, R.; LI, H.; LIU, Y.; LIU, P.; WANG, L.; LI, D.; WANG, M.; ZOU, Q.; LIU, H.; MATSUZAKI, K.; ZHAO, F. Anti-inflammatory action of ambuic acid, a natural product isolated from the solid culture of *pestalotiopsis neglecta*, through blocking erk/jnk mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, Athens, v. 16, n. 2, p. 1538–1546, 2018. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30116402/> Access: 10 ago. 2021

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ 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 19 de agosto de 2019, o parecer referente ao protocolo no. **022/2019** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EXTRAÍDOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DOS FRUTOS DE *Euterpe oleracea* L. EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**" coordenado por **SWANNY FERREIRA 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 19 August 2019, the final decision about the Protocol **022/2019** and certify that the research project entitled "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EXTRAÍDOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DOS FRUTOS DE *Euterpe oleracea* L. EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**" coordinated by **SWANNY FERREIRA BORGES**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 03 de setembro de 2019

JOSE CARLOS TAVARES Assinado de forma digital por JOSE
CARVALHO:208760252 CARLOS TAVARES
CARVALHO:20876025220
20 Dados: 2019.09.03 11:22:12 -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 Kubitschek, km 02 – Campus Marco Zero,
Macapá - AP. 68903-419 email: farmacos@unifap.br
Fone (96)4009-2907

ANEXO 2 – Comprovante de submissão do artigo

14/04/2022 14:09

Gmail - IPHM-D-22-00191 - Submission Confirmation



José Carlos Tavares <jctcarvalho@gmail.com>

IPHM-D-22-00191 - Submission Confirmation

1 mensagem

Inflammopharmacology (IPHM) <em@editorialmanager.com>

14 de abril de 2022 13:44

Responder a: "Inflammopharmacology (IPHM)" <sharmila.prathaban@springer.com>

Para: Jose Carlos Tavares Carvalho <jctcarvalho@gmail.com>

Dear Professor Carvalho,

Thank you for submitting your manuscript, Anti-inflammatory activity of Acremonium sp extract: an endophytic fungi isolated from Euterpe oleracea Mart. in a zebrafish model (Danio rerio), to Inflammopharmacology.

The submission id is: IPHM-D-22-00191

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's Editorial Manager site.

Your username is: jctcarvalho

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at

<https://www.editorialmanager.com/iphm/>

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Inflammopharmacology

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/iphm/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.