



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

DIONISIA PELAES FERREIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA
FRAÇÃO HEXÂNICA DA *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb EM ZEBRAFISH (*Danio
rerio*)**

Macapá-AP
2024

DIONISIA PELAES FERREIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA
FRAÇÃO HEXÂNICA DA *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb 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. Dr. Irlon Maciel Ferreira
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Lienne Silveira de Moraes

Macapá
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Cristina Fernandes – CRB-2 / 1569

F383e Ferreira, Dionisia Pelaes.
ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO
HEXÂNICA DA Eleutherine bulbosa (Miller) Urb EM ZEBRAFISH (Danio rerio) / Dionisia
Pelaes Ferreira. - Macapá, 2024.
1 recurso eletrônico. 64 folhas.

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

Orientador: Irlon Maciel Ferreira.

Coorientadora: Lienne Silveira de Moraes.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Plantas medicinais. 2. Naftoquinonas. 3. Inflamação. I. Irlon Maciel Ferreira, orientador. II.
Moraes, Lienne Silveira de, coorientadora. III. Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

CDD 23. ed. – 581.634

FERREIRA, Dionisia Pelaes. ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO
HEXÂNICA DA Eleutherine bulbosa (Miller) Urb EM ZEBRAFISH (Danio rerio). Orientador: Irlon Maciel Ferreira.
Coorientadora: Lienne Silveira de Moraes. 2024. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá. Macapá, 2024.

DIONISIA PELAES FERREIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO HEXÂNICA DA *Eleutherine bulbosa*
(Miller) Urb 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.

APROVADO EM: 22/02/2024

Orientador: Profº. Dr. IRLON MACIEL FERREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ - UNIFAP

Co-orientadora: Profº. Drª. LIENNE SILVEIRA DE MORAES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA

Examinador 1: Profº. Drª. INANA FAURO DE ARAÚJO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ - UNIFAP

Examinador 2: Profº. Dr. JOSÉ LUIZ DO NASCIMENTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA

CONCEITO FINAL: 9,0

**Dedico este trabalho, a Deus, e minha maior riqueza “minha família”,
Aos meus pais, meus irmãos, meus sobrinhos e meu querido tio.**

AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus, meu melhor amigo, por me preparar para enfrentar as batalhas da vida; por me abençoar todos os dias; por ter me dado saúde, força e capacidade.

A minha família, minha mais completa gratidão. Meus pais, Manoel e Cleonice, que com a sabedoria de Deus, vocês me ensinaram a ser quem eu sou hoje. Agradeço pelas orações, pelo amor que têm me dado e por todo apoio incondicional; meu querido tio Wilson, pelo apoio e consideração comigo; meus irmãos, Silas, Miquéias, Ester, Felipe, Daniel; meus sobrinhos Marcos, David, e Sthepanie pelo carinho e incentivo, e por compreenderem meus momentos de estudos.

Ao meu orientador, Professor Dr. Irlon Maciel Ferreira, pela oportunidade em realizar este trabalho, que tem o dom de nos orientar perfeitamente para escolher o que será trabalhado e nos acompanhar em todo o processo; agradeço por todo conhecimento compartilhado; pelas mensagens de incentivo, por todas as vezes que me cobrou e ensinou. Por ser um ótimo professor e amigo, dedicado a todos os seus orientandos, é admirável a forma como consegue lidar com tantas pessoas diferentes. Sou grata por você contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu amigo, Professor Dr. Fabrício Holanda, por me orientar e auxiliar em parte do meu trabalho, por toda paciência e parceria. Sou grata por tudo me que ensinou e pelo tempo que passou me ajudando.

A minha amiga, Professora Beatriz Ferreira, pelo incentivo, companheirismo e amizade, sou grata por tê-la em minha vida e compartilhar mais uma conquista junto com você.

Ao Prof. Dr. José Luíz N. Martins (UFPA) e a Prof^a. Me. Lienne Moraes (UFPA) pela orientação e colaboração.

Ao Grupo de Pesquisa do Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica e Aplicada, especialmente aos doutores Victor Marinho, David Gimenez, e à querida Swanny Borges pela disponibilidade sempre.

Ao Laboratório de Pesquisa em Fármacos pela disponibilidade do espaço para realizar os ensaios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela experiência e oportunidade.

A CAPES pelo incentivo financeiro através da bolsa.

A Universidade Federal do Amapá, pelo acolhimento, é uma honra fazer parte desta instituição de ensino.

Introdução: Vegetais e microrganismos são fontes importantes na busca de novas substâncias químicas com potencial farmacológico, assim, nota-se a necessidade de conhecer melhor os princípios ativos das mais variadas espécies presentes na região Amazônica e analisar seus efeitos terapêuticos. Neste contexto, foi escolhida para este estudo a espécie *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb conhecida popularmente como marupazinho, amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de muitas doenças, como hipertensão, úlceras, constipação e infecção intestinal. **Objetivo:** Avaliar a toxicidade aguda da fração hexânica do extrato etanólico de *Eleutherine bulbosa* (ExtFH) em *zebrafish* adultos, com determinação da DL50, avaliações comportamentais e histopatológicas, além do potencial anti-inflamatório do ExtFH no edema abdominal induzido por carragenina. **Metodologia:** O material vegetal foi coletado, identificado e depois foi preparado o extrato etanólico a partir dos bulbos da planta, sendo realizado um fracionamento através de uma partição líquido-líquido utilizando hexano como solvente, assim, a fração hexânica foi rotaevaporada e caracterizada por Cromatografia Gasosa – espectrometria de Massas (CG-EM). Com isso, a fração hexânica do extrato etanólico (ExtFH) foi testada para avaliar a toxicidade aguda em *zebrafish* adultos, determinada a dose letal (DL50), alterações comportamentais, mortalidade e alterações histopatológicas (intestino, fígados e rins) dos animais. A atividade anti-inflamatória da ExtFH foi avaliada por indução de edema por carragenina na região abdominal do *zebrafish* em diferentes doses. Em seguida, foi realizado o docking molecular com COX 1 e COX 2, como alvos, com estruturas cristalinas complexadas com Nimesulida (NIM) e Rofecoxib (RCX), tendo como ligante de controle NIM, RCX, Celecoxib (CEL) e Indometacina (INM). **Resultados e discussão:** O estudo de toxicidade aguda e a análise histopatológica em *zebrafish* mostraram que o ExtFH tem alto potencial tóxico, com DL50 de 346,74 mg/kg. O ExtFH apresentou efeito anti-inflamatório ao inibir edema abdominal em todas as doses usadas nos dois métodos testados, com destaque para a dose 2,5 mg/kg que alcançou 66,2% e 62,4% de inibição do edema abdominal, respectivamente. Portanto, o ExtFH possui um grau aceitável de segurança para toxicidade aguda, definido na análise de alterações comportamentais, mortalidade e histopatologia, com ação anti-inflamatória significativa em *zebrafish* em todas as doses. O estudo *in silico* mostrou que a molécula de eleuterol da composição química de *E. bulbosa* apresentou um perfil de dupla inibição da ciclooxigenase 1 e 2. **Conclusão:** Assim, este estudo mostrou que a ExtFH foi eficiente para prevenir a formação de edema, além disso, foi demonstrado que a ExtFH tem potencial efeito em reverter o edema já instalado. Com isso, o estudo *in silico* confirmou a atividade anti-inflamatória através de um perfil de dupla inibição da ciclooxigenase 1 e 2.

Palavras-Chave: Plantas medicinais. Naftoquinonas. Inflamação. Ensaio *in vivo*.

Agradecimentos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Introduction: Plants and microorganisms are important sources in the search for new chemical substances with pharmacological potential, so there is a need to know the active principles of the most varied species present in the Amazon region and analyze their therapeutic effects. In this context, the species *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb, popularly known as marupazinho, was chosen for this study. It is widely used in traditional medicine to treat many diseases, such as hypertension, ulcers, constipation and intestinal infection. **Objective:** To evaluate the acute toxicity of the hexanic fraction of the ethanolic extract of *Eleutherine bulbosa* (ExtFH) in adult *zebrafish*, with determination of the LD50, behavioral and histopathological evaluations, as well as the anti-inflammatory potential of ExtFH in abdominal edema induced by carrageenan. **Methodology:** The plant material was collected, identified and then the ethanolic extract was prepared from the bulbs of the plant. Fractionation was carried out through a liquid-liquid partition using hexane as a solvent, so the hexane fraction was rotaevaporated and characterized by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS). The hexane fraction of the ethanolic extract (ExtFH) was then tested for acute toxicity in adult *zebrafish*, determining the lethal dose (LD50), behavioral changes, mortality and histopathological changes (intestine, livers and kidneys) in the animals. The anti-inflammatory activity of ExtFH was evaluated by inducing edema with carrageenan in the abdominal region of *zebrafish* at different doses. Molecular docking was then carried out for COX 1 and COX 2 with crystal structures complexed with Nimesulide (NIM) and Rofecoxib (RCX), with NIM, RCX, Celecoxib (CEL) and Indomethacin (INM) as control ligands. **Results and discussion:** The acute toxicity study and histopathological analysis in *zebrafish* showed that ExtFH has a high toxic potential, with an LD50 of 346.74 mg/kg. ExtFH showed an anti-inflammatory effect by inhibiting abdominal edema at all doses used in the two methods tested, with the 2.5 mg/kg dose standing out, achieving 66.2% and 62.4% inhibition of abdominal edema, respectively. Therefore, ExtFH has an acceptable degree of safety for acute toxicity, defined in the analysis of behavioral alterations, mortality and histopathology, with significant anti-inflammatory action in *zebrafish* at all doses. The *in silico* study showed that the eleutherol molecule from the chemical composition of *E. bulbosa* presented a dual inhibition profile of cyclooxygenase 1 and 2. **Conclusion:** Thus, this study showed that ExtFH was effective in preventing the formation of edema, and furthermore, it was demonstrated that ExtFH has the potential to reverse edema that has already set in. With this, the *in silico* study confirmed the anti-inflammatory activity through a profile of dual inhibition of cyclooxygenase 1 and 2.

Keywords: Medicinal plants. Naphthoquinones. Inflammation. *In vivo* test.

Acknowledgements: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eleutherine bulbosa (Miller) Urb (marupazinho).....	16
Figura 2: Classificação das quinonas.....	17
Figura 3: Constituintes químicos isolados de <i>E. plicata</i> Herb.	18
Figura 4: Componentes da resposta inflamatória aguda e crônica.....	20
Figura 5: Sinais cardinais da inflamação.	21
Figura 6: Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).	27
Figura 7: Análise cromatográfica por CG-EM da Fração Hexânica do extato etanólico de <i>E. bulbosa</i>	35
Figura 8: Índice de alterações histopatológicas no intestino (A), fígado (B) e rim (C) em cada dose de ExtFH. Os dados são apresentados como média $\pm$ SD (n = 3/grupos); * p < 0,05 para o DMSO, # p < 0,05 para o 250 mg/kg. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey.	38
Figura 9: Secção histológica de intestino, fígado e rins de zebrafish, mostrando as principais alterações histopatológicas registradas no teste de toxicidade aguda. Em A: observa-se as vilosidades (V), camada muscular (CM), células caliciformes (CG), e B: destacamento da lamina própria (DLP), dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DVv); em C: observa-se tecido hepático, com hepatócitos normais (H), sinusóides (S), e D: vacuolização citoplasmática (CV); em E: observa-se tecido renal com túbulos normais (Tb), espaço da capsula de Bowman (BCS), capilares do glomérulo (GC), e F: degeneração hialina tubular leve (MTHD). H&E.	39
Figura 10: Efeito da ExtFH na formação do edema abdominal induzido por carragenina (M1).....	44
Figura 11: Efeito da ExtFH na reversão do edema abdominal induzido por carragenina (M2).	44
Figura 12: Efeito da administração oral de solução salina e PBS (SS/PBS, 2 μ l), DMSO 2 μ l, Indometacina (10 mg/kg) e as doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg do ExtFH no Índice de Alterações Histopatológicas do intestino (A), fígado (B) e rim (C) em zebrafish com a aplicação de carragenina (20 ug/animal). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP (n = 12/grupos); *** p < 0,05 para DMSO. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey. (M1).....	47
Figura 13: Efeito da administração oral de solução salina e PBS (SS/PBS, 2 μ l), DMSO 2 μ l, Indometacina (10 mg/kg) e as doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg do ExtFH no Índice de Alterações Histopatológicas do intestino (A), fígado (B) e rim (C) em zebrafish com a aplicação de carragenina (20 ug/animal). Os dados são apresentados como média $\pm$ DP (n = 12/grupos); *** p < 0,05 para DMSO. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey. (M2).....	49
Figura 14: Secção histológica de intestino, fígado e rins de zebrafish, mostrando as principais alterações histopatológicas registradas nos testes da atividade anti-inflamatória M1 e M2. Em A: observa-se tecido intestinal com vilosidades normais (V), células caliciformes (CG), e B: destacamento da lâmina própria (DLP), dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DVv); em C: observa-se tecido hepático, com hepatócitos normais (H), e D: hiperemia (HP) e vacuolização citoplasmática (CV); em E: observa-se tecido renal com túbulos normais (Tb), e F: degeneração hialina tubular leve (MTHD) e degeneração hialina tubular severa (STHD). H&E.	50
Figura 15: Sobreposição de poses de ligantes cristalográficos (verde) com poses de acoplamento (roxo): (A) NIM para <i>Ovis Aries</i> organismo (PDB 3N8X) e (B) RCX para <i>Homo sapiens</i> organismo (PDB 5KIR).....	50
Figura 16: Interações de controles NIM (A) e RCX (B) e potenciais inibidores Eleuterina (C) e Eleuterol (D) com o sítio de ligação COX-1 (PDB ID 3N8X).	53
Figura 17: Interações de controles RCX (A), IMN (B) e potenciais inibidores Eleuterina (C) e Eleuterol (D) com sítio de ligação COX-2 (PDB ID 5KIR).	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise Comportamental (M1).....	40
Tabela 2: Análise Comportamental (M2).....	41
Tabela 3: Valores de afinidade de ligação de moléculas em COX-1 e COX-2.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido Araquidônico
°C: grau Celsius
CAR - Cg: Carragenina
COX-1: Ciclooxygenase-1
COX-2: Ciclooxygenase-2
CG-EM: Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
cm: centímetros
DA: Diverticulite aguda
DL50: Dose letal média
DMSO: Dimetilsulfóxido
EE: extrato etanólico
E. bulbosa: *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio
ExtFH: Fração hexânica do extrato etanólico
GL: grau gay Lussac
IAH: Índice de Alterações Histopatológicas
IL-1 β : Interleucina 1-beta
IL-6: Interleucina-6
IL-12: Interleucina-12
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
i.p: Via intraperitoneal
kPa: Kilopascal
L: Litro
LTB4: Leucotrieno B4
M1: Método 1
M2: Método 2
m: metro
mg: miligrama
mg/kg: miligrama/quilograma
mm: milímetro
m/z: taxa de massa/carga
NO: Óxido Nítrico
PAF: Fator Ativação Plaquetária
PBS: Tampão fosfato-salino
PGs: Prostaglandinas
pH: Potencial hidrogeniônico
SS: Solução salina
TNF - α : Fator de necrose tumoral
 μ L: microlitro
 μ m: micrômetro
v.o: Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3. 1 ASPECTOS BOTÂNICOS	16
3. 1. 1 Família Iridaceae	16
3. 1. 2 Gênero <i>Eleutherine</i>	16
3. 2 ASPECTOS QUÍMICOS	17
3. 3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	19
3. 4 INFLAMAÇÃO	20
3. 5 MEDIADORES QUÍMICOS INFLAMATÓRIOS	22
3. 5. 1 Mediadores derivados de células	22
3. 5. 1. 1 Aminas vasoativas	22
3. 5. 1. 2 Metabólitos do Ácido Araquidônico (AA)	22
3. 5. 1. 3 Fator Ativação Plaquetária (PAF)	23
3. 5. 1. 4 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	23
3. 5. 1. 5 Óxido Nítrico (NO)	24
3. 5. 1. 6 Citocinas e Quimiocinas	24
3. 5. 1. 7 Neuropeptídeos	24
3. 5. 2 Mediadores derivados do plasma	25
3. 5. 2. 1 Sistema Complemento	25
3. 5. 2. 2 Sistemas da Coagulação e das Cininas	25
3. 5. 3 Doenças Inflamatórias	25
3. 6 MODELO EXPERIMENTAL	27
3. 6. 1 Taxonomia <i>Zebrafish</i>	27
3. 6. 2 <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>)	27
3. 6. 3 <i>Zebrafish</i> como modelo animal para pesquisas	28
3. 6. 4 <i>Zebrafish</i> como Modelo de Estudo da Inflamação	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4. 1 REAGENTES	30
4. 2 ANÁLISE FITOQUÍMICA	30
4. 2. 1 Identificação do material vegetal	30
4. 2. 2 Preparação do extrato etanólico	30
4. 2. 3 Fracionamento do extrato etanólico	30
4. 2. 4 Análise por Cromatografia Gasosa – Espectrometria De Massas (CG-EM)	30
4. 3 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELO ANIMAL ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>)	31

4. 3. 1 Animais Experimentais	31
4. 3. 2 Determinação de DL50	31
4. 3. 3 Avaliação Comportamental e Mortalidade	31
4. 3. 4 Grupos de tratamento e vias de administração	32
4. 3. 5 Indução da inflamação com carragenina e mensuração do edema	32
4. 3. 6 Análise histopatológica	33
4. 3. 7 Avaliação das alterações histopatológicas	33
4. 3. 8 Análise estatística	33
4. 4 DOCKING MOLECULAR.....	34
4. 4. 1 Seleção de enzimas e estrutura inibitória	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5. 1 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO HEXÂNICA.....	35
5. 2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	36
5. 2. 1 Estudo de Toxicidade Aguda - Obtenção da dose letal média (DL50) e Avaliação dos Parâmetros Comportamentais	36
5. 2. 1. 1 Avaliação de alterações histopatológicas da Toxicidade Aguda	37
5. 2. 2 Análise comportamental e Ensaio de edema abdominal induzido por Carragenina..	39
5. 2. 2. 1 Análise comportamental do ensaio de inflamação	39
5. 2. 2. 2 Avaliação da formação de edema	41
5. 2. 2. 3 Análise histopatológica da formação de edema	45
5. 3 DOCKING MOLECULAR DAS NAFTOQUINONAS EM ALVOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS AO PROCESSO INFLAMATÓRIO	50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS E APÊNDICES	64
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética	64
Anexo 2 – Artigo submetido	65

O uso de plantas medicinais, desde os primórdios, mostra que elas fazem parte da evolução humana sendo os primeiros recursos terapêuticos utilizados pela sociedade. Diversos estudos sobre substâncias biologicamente ativas a partir de plantas medicinais já foram realizadas, todavia observa-se que ainda há lacunas sobre o estudo terapêutico bem como toxicológico de certas espécies, justamente devido os efeitos fitoterápicos que exercem.

As variedades de espécies vegetais, ainda são responsáveis pela maior parte de substâncias estudadas para fins terapêuticos, assim contribuem de forma expressiva para o fornecimento de novas substâncias, através de seus metabólitos secundários, especialmente. Na Amazônia, encontram-se diversas espécies nativas com propriedades medicinais, tal como a *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb, uma planta da família Iridaceae, conhecida popularmente como marupazinho, encontrada principalmente na região Norte do Brasil, sendo amplamente utilizada na medicina caseira na Amazônia para o tratamento de hipertensão, úlceras, constipação e infecção intestinal.

Estudos relatam que os principais componentes biologicamente ativos nesta planta são as naftoquinonas, compostos derivados de quinonas. Nesse sentido, a presente pesquisa tem como problema o seguinte questionamento: Os compostos químicos a partir na fração hexânica do extrato etanólico da *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb decorrentes de quinonas, exercem atividade anti-inflamatória em zebrafish (*Danio rerio*) e qual grau de toxicidade?

A realização desta pesquisa tem como justificativa o fato de estudos com produtos naturais estarem em constante notoriedade no meio científico, dado ao seu uso contínuo na medicina popular, como alternativa nos tratamentos clínicos e no fornecimento de novas substâncias, um caminho inesgotável para os pesquisadores. No entanto, para identificar substâncias com efeito terapêutico, faz-se necessário que sejam realizados estudos fitoquímicos objetivando identificar os constituintes químicos das plantas medicinais, bem como estudos *in vivo* e *in silico* para avaliar a atividade farmacológica desses compostos.

Portanto, a presente pesquisa aborda a composição química da fração hexânica do extrato etanólico da *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb, demonstra o estudo da toxicidade aguda e atividade anti-inflamatória em modelo animal zebrafish (*Danio rerio*), aliado ao estudo *in silico* através do docking molecular.

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a toxicidade aguda e a atividade anti-inflamatória da fração hexânica do extrato etanólico de *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb em zebrafish (*Danio rerio*) por indução de edema peritoneal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificar e caracterizar por Cromatografia Gasosa – espectrometria de Massas (CG-EM) a composição química da fração hexânica do extrato etanólico de *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb.
- II. Analisar a toxicidade aguda da ExtFH com a obtenção da DL50 em zebrafish (*Danio rerio*) adultos;
- III. Identificar as alterações comportamentais de *zebrafish* adultos após a exposição a diferentes doses de ExtFH (fração hexânica do extrato etanólico);
- IV. Avaliar a atividade anti-inflamatória da ExtFH através do ensaio de edema abdominal induzido por carragenina via intraperitoneal em zebrafish (*Danio rerio*);
- V. Realizar o estudo histopatológico das possíveis alterações do fígado, intestino e rins de *zebrafish* após a administração da ExtFH;
- VI. Realizar o docking molecular com alvos COX 1 e COX 2, com estruturas cristalinas complexadas com Nimesulida (NIM) e Rofecoxib (RCX), tendo como ligante de controle NIM, RCX, Celecoxib (CEL) e Indometacina (INM).

3. 1 ASPECTOS BOTÂNICOS

3. 1. 1 Família Iridaceae

A *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb pertence à família Iridaceae, trata-se de uma família relativamente extensa de monocotiledôneas petalóides, que apresenta mais de 1.630 espécies e 77 gêneros. Mesmo sendo de fácil acesso, tem concentração marcante no Sul dos continentes, sendo que seu maior centro de concentração se encontra no sul da África (REEVES *et al.*, 2001). Enquanto, no Brasil ela está representada por 23 gêneros e 190 espécies distribuídas em todos os domínios fitogeográficos, sendo 106 espécies endêmicas do país (DAMASCENO, 2016).

As plantas Iridaceae são facilmente conhecidas entre as monocotiledôneas porque apresentam folhas isobilaterais equivalentes, flores com três estames, com fruto seco, com pericarpo firme e cartilaginoso ou papiráceo rígido e lenhoso (MALHEIROS, 2008). Sementes com abundante endosperma são geralmente marrons, opacas ou brilhantes, tipicamente duras e relativamente grandes, mais ou menos globosas a angulosas por pressão, podendo ser ainda segmentadas por uma crista (SILVA, 2013).

3. 1. 2 Gênero *Eleutherine*

Eleutherine bulbosa (Miller) Urb é uma planta herbácea popularmente conhecida como marupazinho, marupari, palmeirinha, marupá-piranga, identificada como bulbosa, rizomatosa, acaule e em forma de touceira, geralmente de 20-30 cm de altura, encontrada principalmente na região Norte do Brasil (**Figura 1**). Os bulbos desta planta apresentam escamas semelhantes à cebola, e são de coloração vinho e liberam látex branco quando cortados. São caracterizadas como plantas de folhas inteiras, simples e plissadas, apresentando flores brancas e rosadas (LORENZI; MATOS, 2008)

Figura 1: *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb (marupazinho).



Fonte: AUTOR, 2023.

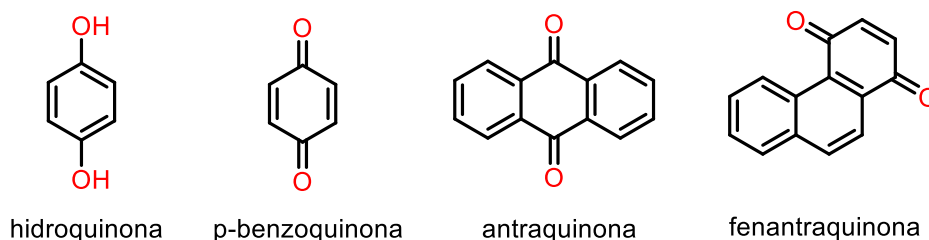
A *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb é amplamente utilizada na medicina tradicional no tratamento de muitas doenças, como diabetes, câncer de mama, derrame, hipertensão, colesterol, úlceras, constipação, hemorróidas, diarreia, distúrbios menstruais e pedras nos rins (MANJULA; BINDU, 2022). As principais substâncias biologicamente ativas relatadas nesta planta são as naftoquinonas, que são compostos derivados de quinonas (ALMEIDA, 2016).

3. 2 ASPECTOS QUÍMICOS

As quinonas representam uma ampla classe de metabólitos secundários de distribuição natural, é um grupo de substâncias orgânicas de coloração intensa e semivoláteis onipresentes na natureza e derivados de compostos aromáticos e heteroaromáticos. Sua estrutura básica é constituída de um anel aromático contendo dois grupamentos carbonilas situados em posições *orto* ou *para* (SOUSA, 2012), (SANTANA, 2016).

Utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que contém o anel, as quinonas são classificadas como benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas (FIGURA 2). São compostos oxigenados que correspondem a oxidação de derivados aromáticos que se caracterizam por um grupamento 1,4- dicetociclohexa-2,5-diênico (para-quinonas), ou ocasionalmente, por um grupamento 1,2-dicetociclohexa-3,5-diênico (orto-quinonas). Os compostos quinônicos naturais podem apresentar-se conjugadas com um núcleo benzênico (benzoquinonas), com sistemas aromáticos policíclicos condensados: naftoquinonas (naftaleno), antraquinonas (antraceno), antracilinas (1,2-benzantraceno) e naftodiantronas (naftodiantreno) (BRUNETON, 2001), (SOUSA, 2012).

Figura 2: Classificação das quinonas.



Fonte: PRÓRIO AUTOR.

Estudos sobre a composição química de várias espécies do gênero *Eleutherine* demonstram a predominância de naftoquinonas, compostos que induzem a apoptose celular, pois inibem as topoisomerasas I e II. Apoptose celular é um tipo específico de morte celular,

uma morte programada para garantir a manutenção de tecidos e órgãos, ocorre durante várias situações fisiológicas patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual, apoptose também ocorre quando o organismo é invadido por patógenos ou o DNA é lesionado (MALHEIROS, 2008).

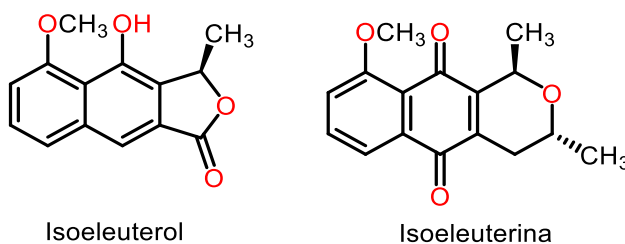
Com relação a ação das naftoquinonas, Silva e colaboradores (2003) afirmam que elas agem por ação enzimática, por reações de oxirredução, quando um substrato quinonoídico reduz-se com um elétron para formar o ânion semiquinona ($Q^{\cdot-}$), por sua vez a semiquinona $Q^{\cdot-}$ age reduzindo o oxigênio molecular ao ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que na presença da enzima superóxido dismutase é transformado em H_2O_2 . Então, o ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gera HO no interior da célula, este processo pode ser por catálise com metais de transição (reação de Fenton), ou por reação com H_2O_2 (reação de Haber-Weiss). Assim, é notável que mesmo o H_2O_2 não sendo um radical livre, é uma substância bastante reativa, podendo promover também a oxidação de algumas biomoléculas.

Assim, na tentativa de eliminar estas espécies oxidantes, as células desencadeiam mecanismos de desintoxicação, através dos agentes antioxidantes intracelulares. Para ocorrer uma boa eliminação ou consequente controle do estresse oxidativo vai depender dos níveis dos agentes intracelulares antioxidantes, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GSH) e glutathione peroxidase (GPX) (SILVA *et al.*, 2003).

Nesse sentido, Alves e colaboradores (2003) a partir do fracionamento do extrato diclorometano dos bulbos de *E. bulbosa* isolaram uma nova naftoquinona nesta planta, denominada de eleuterinona, e três compostos conhecidos eleuterol, eleuterina, e isoleuterina, já isolados anteriormente de *Eleutherine americana* MERR. Et HEYNE.

Em estudos sobre os potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb e atividades microbiológica e antioxidante, Malheiros (2008) isolou e caracterizou dois constituintes químicos, o isoeleuterol e isoeleuterina (**Figura 3**), já isolados de outras espécies do gênero *Eleutherine*, onde o isoeleuterol foi considerado como o composto majoritário.

Figura 3: Constituintes químicos isolados de *E. plicata* Herb.



Além disso, atividade anti-HIV a partir do isoeteuterol e a isoeleuterina também foram demonstradas, onde se observou a inibição da replicação do vírus, além disso a eleuterina inibiu a atividade da topoisomerase II humana (HARA *et al.*, 1997). A isoeleuterina também se mostrou ativa contra bactéria *Bacillus subtilis* (FERNANDES *et al.*, 2008).

3. 3 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

A *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb é amplamente utilizada na medicina popular brasileira, principalmente na região Amazônica, usado como medicação para o tratamento de diarreia e amebíase, hábito este iniciado pelas populações indígenas desta região. Os indígenas da região das Guianas empregam seus bulbos para o preparo de emplastro contra contusões e ferimentos visando acelerar a cicatrização. Já seu suco com sal é usado como medicação interna contra epilepsia e no tratamento da malária (LORENZI; MATOS, 2002), (RIBEIRO, 2008).

Há relatos que a *E. bulbosa* é utilizada no Haiti como abortivo (WENIGER *et al.*, 1982), e em Trinidad Tobago é usada para o tratamento de cólicas menstruais (LANS, 2007). Villegas *et al.*, (1997) abordam o uso de preparações de plantas como agentes de cicatrização de feridas superficiais e internas (úlceras gástricas), e relatam que diversas plantas exercem atividade cicatrizante, dentre elas a *E. bulbosa*.

Na avaliação de plantas medicinais usadas por cuandeiros de etnia Zulu, foi atribuída a ação anti-diarreia ao seu extrato aquoso (LIN *et al.*, 2002). Com isso, Alves *et al.*, (2003) descrevem que compostos quinonóides mostraram forte atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* no ensaio de bioautografia a 100 µg/spot, e apenas o eleuterol se mostrou inativo. Assim como, o extrato etanólico de *E. bulbosa*, preparado a partir das partes superiores da planta, inibiu o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* e apresentou toxicidade sobre larvas de *Artemia salina* (BRASILEIRO, 2006).

Nesse sentido, Amélia e colaboradores (2014) utilizaram métodos computacionais para avaliar a afinidade e interação dos compostos ativos da planta ao receptor de estrogênio do câncer de mama, assim, a naftoquinona com maior afinidade de ligação com o receptor alfa de estrogênio humano foi o eleuterinol, com energia de ligação livre de -6,43 kcal/mol, com duas interações de ligação de hidrogênio com Glu353 e Arg394. Assim, Lestari *et al.*, (2018) relataram a atividade antioxidante e anticancerígena do extrato quando testado em células leucêmicas (L₁₂₁₀).

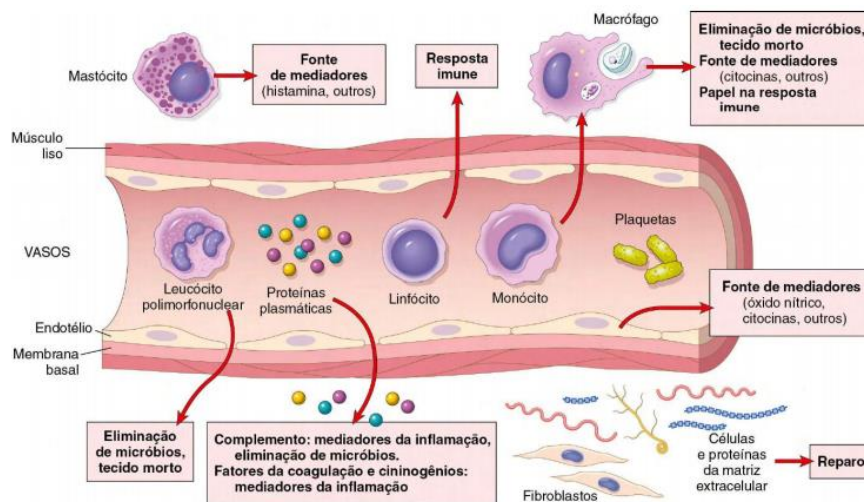
Estudos com a *E. bulbosa* mostraram potenciais efeitos anti-inflamatórios ao suprimir pró-citocinas como IL-6, TNF- α , e IL-12 p40 em ensaios *in vitro*, tendo como principais compostos ativos eleuterina, isoeleuterina e alguns eleuterinosídeos. Por outro lado, em ensaios *in vivo*, o extrato desta planta apresentou atividade anti-inflamatória, reduzindo sinais de artrite em modelo animal camundongo CAIA (HANH *et al.*, 2018).

3. 4 INFLAMAÇÃO

Considerando o processo inflamatório, sabe-se que a inflamação faz parte da resposta biológica natural do organismo a danos teciduais e estímulos prejudiciais, como invasão por patógenos e injúria celular e tecidual, além de ser uma resposta protetora que envolve células imunes, vasos sanguíneos e mediadores moleculares (ETIENNE *et al.*, 2020).

Segundo Almeida (2016), a inflamação é caracterizada pela saída de líquidos, moléculas e células do sangue para o local da infecção ou da lesão tecidual. Logo, esse processo é classificado de acordo com o grau de intensidade da inflamação, sendo agudo ou crônico (Figura 4).

Figura 4: Componentes da resposta inflamatória aguda e crônica.



Fonte: KUMAR *et al.*, 2013.

A inflamação aguda se caracteriza por ter início precoce e curta duração, apresentando exsudação de líquido e proteínas plasmáticas, além de acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos. Por outro lado, a inflamação crônica, que apresenta longa duração é caracterizada pela presença de linfócitos e macrófagos com proliferação vascular associada e fibrose, ocorre no caso de doenças crônicas e complexas, podendo surgir em decorrência da infiltração direta

e abundante de células imunes mononucleares, bem como a produção de citocinas inflamatórias, em um processo redundante (ALMEIDA, 2016), (ETIENNE *et al.*, 2020).

O processo inflamatório é dividido em etapas ou fases definidas na seguinte ordem: i) Agressão, que se manifesta através dos fenômenos irritativos ou de reconhecimento do agente lesivo; ii) Reação vascular, caracterizada pela vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo; iii) Exsudação plasmática e celular, onde ocorre a saída de leucócitos e proteínas do sangue em direção ao local da infecção para remoção do agente agressor; iv) Controle da resposta, caracterizada pela proliferação de tecido vascular local, e v) Reparação/Cicatrização, que trata da resolução do processo, sendo o reparo da área lesada (ALMEIDA, 2016).

As principais fases da inflamação são reação vascular e resposta celular, pois ambas são ativadas por mediadores químicos derivados de proteínas plasmáticas e de várias células. A ocorrência desses eventos provoca as manifestações clínicas da inflamação, que são denominadas de sinais cardinais (**Figura 5**) e incluem: calor, rubor, tumor, dor e perda de função (KUMAR *et al.*, 2013).

Figura 5: Sinais cardinais da inflamação.



Fonte: VIANA, 2016.

O calor (temperatura elevada) e o rubor (eritema) são consequências da vasodilatação, que aumenta a circulação sanguínea na área inflamada, devido à concentração de sangue e ao aumento da temperatura pelo maior fluxo sanguíneo. O tumor (edema) é resultado do aumento da permeabilidade vascular que permite o extravasamento vascular de líquidos e, portanto, a formação do edema. A dor (algia) se manifesta, pela compressão de terminações nervosas pelo edema e pelos mediadores químicos liberados no corpo como resposta à injúria tecidual. Por fim, surge a perda de função, total ou parcial, resultante do edema e da dor, principalmente em articulações e tecidos ou membros relacionados ao movimento, ocasionando limitações e/ou impedimentos nas ações do indivíduo (BARNES *et al.*, 2016).

Sendo os sinais cardinais consequências dos fenômenos vasculares e exsudativos induzidos por diferentes mediadores químicos, é válido destacar os mediadores de origem celular e plasmática, bem como suas funções no processo inflamatório.

3. 5 MEDIADORES QUÍMICOS INFLAMATÓRIOS

Os mediadores derivados de células são pré-formados em grânulos intracelulares e podem ser rapidamente secretados por exocitose do grânulo ou são sintetizados em resposta a estímulos. Os mediadores derivados do plasma são produzidos principalmente no fígado e estão presentes na circulação como precursores inativos que precisam ser ativados, geralmente esse papel de ativação recai sobre uma série de clivagens proteolíticas, assim, esses mediadores adquirem suas propriedades biológicas (KUMAR *et al.*, 2010).

Dessa forma, será abordado alguns dos mediadores mais importantes da inflamação aguda, inicialmente será destacado os derivados de células, em seguida aqueles derivados de proteínas plasmáticas.

3. 5. 1 Mediadores derivados de células

3. 5. 1. 1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação, elas se manifestam na segunda etapa do processo inflamatório, com importantes ações nos vasos sanguíneos, as duas principais são a histamina e a serotonina.

A histamina é liberada dos grânulos dos mastócitos em resposta a vários estímulos como lesão física por trauma ou calor o que causa vasodilatação das arteríolas, aumento da permeabilidade vascular, com isso produz a contração do endotélio venular e das lacunas interendoteliais (ALMEIDA, 2016).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) apresenta ação semelhante à histamina, por sua vez está presente nas plaquetas e em certas células neuroendócrinas. Sua liberação das plaquetas pode ocorrer durante o processo de agregação plaquetária, uma vez que é o componente-chave da coagulação, a serotonina também resulta em permeabilidade vascular aumentada (KUMAR *et al.*, 2010).

3. 5. 1. 2 Metabólitos do Ácido Araquidônico (AA)

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poli-insaturado, ele não se apresenta livre em células, mas normalmente é esterificado nos fosfolipídios da membrana, que acontece quando as células são ativadas por diversos estímulos, assim, o AA da membrana é convertido através de ação enzimática por duas vias metabólicas, produzindo as prostaglandinas e os leucotrienos (KUMAR *et al.*, 2010).

As prostaglandinas (PGs) são produzidas pelos mastócitos, macrófagos, células endoteliais e muitos outros tipos celulares, sendo decorrentes das ações de duas *ciclo-oxygenases*, as enzimas COX-1 e COX-2. A principal função das prostaglandinas está relacionada à geração da resposta inflamatória, cuja produção é exacerbada pela ativação da cascata do AA, oriundo da degradação fosfolipídica (ETIENNE *et al.*, 2020), (KUMAR *et al.*, 2010).

Os leucotrienos são produzidos a partir das enzimas *lipoxigenases*, de todos os leucotrienos conhecidos, o LTB₄ é o mais estudado como alvo terapêutico na inflamação, ele exerce potente atividade quimiotática para leucócitos, eosinófilos e monócitos, pois promove a migração destes tipos celulares para o local afetado. Uma vez no sítio, os leucotrienos ativam as células da série branca, promovendo a desgranulação e a produção de superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação (COTRAN *et al.*, 2000), (COUTINHO *et al.*, 2009), (KUMAR *et al.*, 2010).

3. 5. 1. 3 Fator Ativação Plaquetária (PAF)

O PAF é também é um mediador derivado de fosfolipídio, é assim chamado porque foi descoberto como um fator que causa agregação plaquetária, no entanto, atualmente é conhecido por ter múltiplos efeitos inflamatórios. O PAF exerce papel importante na fisiologia vascular pela estimulação das plaquetas, participando da modulação na vasoconstrição e na broncoconstrição, em concentrações baixíssimas, induz a vasodilatação e o aumento na permeabilidade venular (ETIENNE, R. *et al.*, 2020), (KUMAR *et al.*, 2010).

Dentre outras funções, o PAF causa aumento na adesão dos leucócitos, quimiotaxia, desgranulação e a explosão oxidativa; pode provocar a maioria das reações vasculares e celulares da inflamação; auxilia na síntese de outros mediadores (COTRAN *et al.*, 2000).

3. 5. 1. 4 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

As espécies reativas derivadas do oxigênio podem ser liberadas de forma extracelular dos leucócitos após a exposição a micróbios, quimiocinas e imunocomplexos ou em seguida ao estímulo fagocítico. São compostos instáveis e extremamente reativos, capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. As principais espécies produzidas dentro das células são: ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH⁻) (SILVA; GONÇALVES, 2010), (KUMAR *et al.*, 2010).

Um fator a ser destacado é que a função fisiológica dessas espécies nos leucócitos é destruir os micróbios fagocitados, mas a liberação desses potentes mediadores pode ser danosa ao hospedeiro. Com relação ao processo inflamatório, são responsáveis pelo dano celular

endotelial, ocasionando o aumento na permeabilidade vascular, causa injúria a outros tipos celulares e a inativação de antiproteases (KUMAR *et al.*, 2010).

3. 5. 1. 5 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é uma espécie radicalar, sintetizada em macrófagos, no músculo cardíaco e em células endoteliais por ação da enzima do NO sintase, a partir da biotransformação de *L*-arginina em *L*-citrulina. O NO atua como neurotransmissor e exerce várias outras funções fisiológicas (ETIENNE *et al.*, 2020).

Quanto às suas funções no processo inflamatório, o NO tem ações duplas, pois contribui para a reação vascular quando relaxa o músculo liso vascular, promovendo a vasodilatação, e também pode ser um inibidor do componente celular das respostas inflamatórias. Dentre outras ações, o NO reduz a agregação e adesão plaquetárias, inibe várias características da inflamação induzida pelos mastócitos e o recrutamento de leucócitos (KUMAR *et al.*, 2010).

3. 5. 1. 6 Citocinas e Quimiocinas

As citocinas são proteínas liberadas por células como os monócitos e macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e mastócitos, além de células endoteliais, fibroblastos e adipócitos. Sendo as citocinas pró-inflamatórias TNF (Fator de Necrose Tumoral) e IL-1 (Interleucina-1) as principais envolvidas na inflamação, produzidas particularmente pelos macrófagos (ALMEIDA, 2016), (ETIENNE *et al.*, 2020).

O principal papel das citocinas TNF e IL-1 no processo inflamatório está relacionado com a ativação endotelial, estimulando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o que resulta em aumento do recrutamento, aderência dos leucócitos e aumento da produção de citocinas adicionais (ALMEIDA, 2016).

Dentre as citocinas adicionais produzidas, as quimiocinas têm destaque, uma vez que atraem e ativam as células inflamatórias móveis, ou seja, elas estimulam o recrutamento dos leucócitos na inflamação e controlam a migração normal das células através dos vários tecidos (COUTINHO *et al.*, 2009), (KUMAR *et al.*, 2010).

3. 5. 1. 7 Neuropeptídeos

Os neuropeptídeos são secretados por nervos sensoriais e vários leucócitos, têm determinadas funções na iniciação e propagação de uma resposta inflamatória. Dentre os quais tem-se a substância P, que desempenha muitas funções no processo inflamatório, como a transmissão de sinais de dor, regulação da pressão sanguínea, estimulação da secreção em células endócrinas e aumento na permeabilidade vascular (KUMAR *et al.*, 2010).

Outro mediador dessa classe é a bradicinina que afeta a vasculatura promovendo dilatação de vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade vascular, assim como, desempenha papel importante na dor, visto que possui um potente efeito algésico, diminuindo o limiar da dor nas terminações nervosas (KUMAR *et al.*, 2013).

3. 5. 2 Mediadores derivados do plasma

3. 5. 2. 1 Sistema Complemento

O sistema complemento é formado por várias proteínas derivadas do plasma, sendo que algumas são numeradas de C1 até C9. Este sistema funciona tanto na imunidade inata quanto na adaptativa para a defesa contra patógenos microbianos. No processo de ativação do complemento, vários produtos da quebra das proteínas do complemento são elaborados e causam permeabilidade vascular aumentada, quimiotaxia e opsonização (KUMAR *et al.*, 2010).

Quando se considera a ativação e as funções do sistema complemento, ganha visibilidade as anafilotoxinas ou fragmentos C3a, C4a e principalmente o C5a, pois eles promovem degranulação dos mastócitos, com isso afetam a vasculatura, e também são quimiotáticos, participando na migração dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos) e monócitos durante a inflamação (KUMAR *et al.*, 2013).

3. 5. 2. 2 Sistemas da Coagulação e das Cininas

É necessário entender que a inflamação e a coagulação sanguínea são frequentemente entrelaçadas, sendo que uma promove a outra. O sistema da coagulação é dividido em duas vias que convergem, o que resulta na ativação da trombina e na formação de fibrina. De forma que a inflamação aumenta a produção de vários fatores da coagulação, por outro lado, a trombina (produto da coagulação) promove inflamação pelo engajamento dos receptores ativados por proteases (PARs) (KUMAR *et al.*, 2010).

Os sistemas da coagulação estão conectados aos sistemas das cininas, que por sua vez exercem funções relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular, indução da inflamação, quimiotaxia de neutrófilos, vasodilatação, extravasamento de plasma, dor e ativação do sistema complemento, além de estar envolvido na ativação e liberação de óxido nítrico (NO) e diferentes citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 β (FONSECA; JOVILIANO, 2020).

3. 5. 3 Doenças Inflamatórias

A inflamação é uma reação natural do organismo a danos teciduais e estímulos prejudiciais, como invasão por patógenos, injúria celular e tecidual. Com isso, há uma diversidade de doenças que envolvem o processo inflamatório, tendo em vista estudos com atividade farmacológica da planta em estudo, bem como seu uso tradicional, buscou-se fazer

uma abordagem sobre as doenças inflamatórias intestinais, mas especificamente a diverticulite aguda (DA), relacionando-a ao contexto do mecanismo de ação do agente agressor (carragenina) utilizado nos testes (ETIENNE *et al.*, 2020).

O mecanismo de ação da inflamação induzida por carragenina envolve três etapas distintas, de acordo com os mediadores envolvidos. Na etapa inicial, nos primeiros 90 minutos, ocorre a liberação de histamina e serotonina, responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no início do processo inflamatório. A segunda etapa, que ocorre entre 90 e 150 minutos, é desencadeada por cininas, que tem a capacidade de induzir um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos e a biossíntese de prostaciclina e outros autácóides participantes do processo inflamatório. Já a terceira etapa começa a partir de 150 minutos, através do aumento da síntese de prostaglandinas no tecido inflamado, com um pico máximo na terceira hora, ocorrendo uma infiltração maciça de leucócitos polimorfonucleares (UENO *et al.*, 2000); (CARVALHO, 2011).

Por sua vez, a diverticulite aguda representa quadro de inflamação e infecção de divertículos colônicos, ocorre em 10 a 25% dos pacientes, podendo evoluir para formação de abscesso, fístula, perfuração com peritonite e estenose com obstrução colônica (WARNER *et al.*, 2007). As manifestações clínicas da DA dependem da localização do divertículo acometido, presença de complicações e intensidade do processo inflamatório (TURSI *et al.*, 2020).

A patologia é caracterizada por manifestações, como: dor abdominal com predomínio no quadrante inferior esquerdo, com ou sem febre e associada a mudanças no hábito intestinal, como diarreia ou constipação (CHABOK *et al.*, 2021). Além da dor abdominal, podem estar associados: náuseas, vômitos, flatulência e inchaço. Diante disso, os sintomas da DA podem vir de uma complicação, como perfuração intestinal, formação de fístula ou abscesso colônico (CARR; VELASCO, 2022).

Como a localização mais comum da diverticulite é o cólon sigmoide, 70% dos pacientes relatam dor em cólica localizada na fossa ilíaca esquerda (FIE), de caráter recorrente, progressivo e persistente durante alguns dias. Em torno de 3 a 5 dias após o início da dor pode ocorrer uma agudização do quadro clínico, com queda do estado geral, sinais flogísticos e irritação peritoneal (TOWNSEND *et al.*, 2019).

Considerando a patologia da diverticulite aguda, é notório que o processo inflamatório segue o mecanismo de ação semelhante a carragenina evidenciado pelos sinais cardinais listados em sua patologia, assim, os resultados dos ensaios realizados no decorrer desta pesquisa demonstram que o ExtFH tem certo potencial para tratar a DA e outras doenças inflamatórias.

3. 6 MODELO EXPERIMENTAL

3. 6. 1 Taxonomia *Zebrafish*

O *zebrafish* é um peixe definido como cipríniforme, nativo do sul da Ásia, originário dos rios da Índia, Bangladesh e Nepal (DAMMSKI *et al.*, 2011). É um animal que recebe a seguinte classificação científica: **Reino:** Animalia, **Filo:** Chordata, **Classe:** Actinopterygii, **Ordem:** Cypriniformes, **Família:** Cyprinidae, **Gênero:** *Danio*, **Espécie:** *D. rerio* (SEGNER, 2009; QUITIAN-USEQUE, 2021).

3. 6. 2 *Zebrafish (Danio rerio)*

O pesquisador George Streisinger, foi o pioneiro em estudos com o *zebrafish (Danio rerio)*. É um teleósteo conhecido no Brasil como paulistinha, sendo utilizado por diversos pesquisadores em muitos locais (SANT'ANNA, 2009), (STREISINGER *et al.*, 1981). O seu tamanho é de 4 a 5 cm, logo raramente excede 40 mm de comprimento padrão (SL, da ponta do focinho até a origem da nadadeira caudal). Assim, seu formato corporal é fusiforme e comprimido lateralmente, com boca oblíqua voltada para cima (BARMAN, 1991).

As características marcantes para a espécie são uma linha lateral incompleta que se estende até a base da nadadeira pélvica, dois pares de barbilhos e cinco a sete listras longitudinais azuis escuras que se estendem de trás do opérculo até a nadadeira caudal (**Figura 6**) (BARMAN, 1991). Machos e fêmeas têm coloração semelhante, embora os machos tendam a ter barbatanas anais maiores com coloração mais amarela (SPENCE *et al.*, 2008).

Figura 6: *Zebrafish (Danio rerio)*.



Fonte: AUTOR, 2023.

O *zebrafish* pode alcançar a maturidade sexual em cerca de quatro a cinco meses de vida, semelhante a outros vertebrados, ele reproduz-se sexualmente, sua fertilização é externa e ocorre em meio aquático (SPENCE *et al.*, 2008), (QUITIAN-USEQUE *et al.*, 2021). É uma espécie em que suas informações hereditárias se encontram decodificadas, logo apresentam um elevado grau de homologia (aproximadamente 70%) aos genes do ser humano, ou seja, apresentam grandes semelhanças biológicas (GHENO *et al.*, 2015) (HOWE *et al.*, 2013).

3. 6. 3 Zebrafish como modelo animal para pesquisas

Nos últimos anos, foi compreendido como o *zebrafish* se compara aos humanos em termos de alvos, fisiologia, metabolismo de drogas e farmacologia, em particular durante os primeiros dias de vida, quando é possível abrigá-los em placas de poços múltiplos adequadas para triagem. No entanto, questões sobre a relevância para os seres humanos permanecem de importância central para seu uso na descoberta de drogas (MACRAE; PETERSON, 2015).

O *Danio rerio* tem se tornado um dos animais mais utilizado como modelo *in vivo* nos laboratórios, na realização de experimentos e pesquisas científicas em diversas áreas, principalmente ambiental e farmacológica, assim, grande parte dos resultados das pesquisas é reunido na comunidade ZFIN – Zebrafish Information Network (SPENCE *et al.*, 2008).

Estudos revelam que o *zebrafish* é um modelo eficaz para testar a atividade *in vivo* de muitos compostos químicos. Quando comparado a roedores, a toxicologia do *Danio rerio* é bem mais barata e pode ser realizada rapidamente em grande número de compostos. Além disso, pode ser inserido precocemente no desenvolvimento *pré-clínico*, o que justifica a aceitação de estudos com esta espécie animal, por parte das agências reguladoras de medicamentos (MACRAE; PETERSON, 2015) (SÁ HYACIENTH *et al.*, 2020).

Portanto, as características do *zebrafish* fazem que ele seja um modelo seguro na pesquisa *in vivo*, pois apresenta as vantagens do pequeno tamanho, rápida taxa de reprodução, facilidade de manuseio e manutenção, uma vez que necessita de pouco espaço, podendo ser facilmente mantido e distribuído nos aquários (SANT'ANNA, 2009).

Além disso, o *Danio rerio* tem um genoma totalmente caracterizado com domínios funcionais de muitas proteínas-chave quase idênticas aos seus homólogos humanos (FERREIRA *et al.*, 2023). Ademais, estudos que envolvem alterações teciduais em órgãos como brânquias, rins, fígado e intestinos, causadas por efeitos tóxicos de substâncias, podem ser avaliados com o *zebrafish* (CARVALHO *et al.*, 2018).

3. 6. 4 Zebrafish como Modelo de Estudo da Inflamação

Há diferentes estudos em que o *zebrafish* tem sido utilizado como modelo animal experimental para avaliação da atividade anti-inflamatória. Borges e colaboradores (2018) no estudo para avaliar a ação anti-inflamatória de nanoemulsões obtidas a partir do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L, a inflamação foi induzida com carragenina administrada por via intraperitoneal em *zebrafish*. O edema abdominal e as alterações teciduais foram parâmetros para avaliar a capacidade das nanoemulsões de potencializar a atividade anti-inflamatória deste óleo em *zebrafish*.

Por outro lado, Quitian-Useque e colaboradores (2021) em estudo sobre a ação anti-inflamatória de etanolaminas graxas (AGBe) isoladas da *Bertholletia excelsa* utilizaram o *Danio rerio* como modelo animal. Os resultados obtidos no teste de edema com carragenina mostraram atividade anti-inflamatória, inclusive desencadeando um efeito dose-resposta.

Nesse contexto, Holanda *et al.*, (2022) estudaram o potencial anti-inflamatório de baicaleína combinada com proteína de fibroína de seda (BASF) em *zebrafish* como modelo animal. A inibição do edema inflamatório induzido pela carragenina nos grupos tratados com BASF demonstrou resultados satisfatórios em todas as doses utilizadas. As análises histopatológicas e comportamentais com *zebrafish* para ensaios anti-inflamatórios confirmaram a proposta do estudo, a criação de uma formulação simples, estável e segura.

Recentemente, Souza e colaboradores (2022) em estudo sobre a atividade anti-inflamatória de *Trattinnickia rhoifolia* Willd (Sucuruba) utilizaram o modelo *zebrafish*. O extrato desta planta apresentou ação anti-inflamatória significativa em todas as doses testadas, e essa atividade foi confirmada por estudos de docking molecular, nos quais as moléculas identificadas por GC/MS, apresentaram bons perfis para inibição enzimática da COX-2.

4. 1 REAGENTES

Acetato de etila (99%), dimetilsufóxido (97%), hexano (98%), etanol (98%) e metanol (98,8) foram adquiridos pela Synth[®] (São Paulo, Brasil) e sulfato de magnésio anidro ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot \text{XH}_2\text{O}$) pela Regen (São Paulo, Brasil). Carragenina foi adquirida pela Sigma – Aldrich Brazil (iota tipo II, Lote 65H1096) e indometacina (Sigma Co. Sumao Paulo, Brasil).

4. 2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4. 2. 1 Identificação do material vegetal

O material vegetal foi coletado na cidade de Palmas (Tocantins-Brasil), em uma horta cultivada na Região Urbana de Palmas, com as coordenadas geográficas 10°18 '05" S, 48°34'69 '26" W. A identificação botânica foi realizada pelo Complexo de Ciências Agrárias - CCA (UNITINS AGRO).

4. 2. 2 Preparação do extrato etanólico

Os bulbos da planta foram lavados com água destilada e selecionados, em seguida foram secos em temperatura ambiente por 2 dias. Transferidos para estufa de secagem e esterilização a 40 °C por 4 dias. Após a secagem, o material vegetal foi triturado em liquidificador de baixa rotação (Modelo: LQI-04). Assim, o extrato etanólico (EE) foi obtido por percolação no período de 10 dias, utilizando aproximadamente 200 g do material moído e etanol 92° GL, como líquido extrator. Após a percolação, o material foi filtrado, descartando a parte sólida, e a parte líquida foi levada para retirada do excesso de solvente no evaporador rotativo.

4. 2. 3 Fracionamento do extrato etanólico

O fracionamento do EE seguiu a metodologia descrita por Malheiros (2008), com algumas modificações. Ressuspendendo 20 g do extrato etanólico em 150 mL de uma solução de metanol/água (1:1) por 24 horas, em seguida, o material foi filtrado, a parte líquida foi usada para uma partição líquido/líquido com hexano. A extração foi realizada com 2 (duas) alíquotas de 50 mL do solvente, depois foi adicionado sulfato de magnésio ao meio e realizado a filtração com papel filtro, posteriormente as amostras foram rotaevaporadas.

4. 2. 4 Análise por Cromatografia Gasosa – Espectrometria De Massas (CG-EM)

A fração hexânica foi submetida a análise por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), em um aparelho Shimadzu/GC 2010 acoplado a um autoinjeter Shimadzu/AOC-5000 e um impacto de feixe de elétrons detector (Shimadzu MS2010 Plus) (70 eV), equipado com DB-5MS coluna de sílica fundida (Agilent J &

WAdvanced 30 m x 0,25 mm x 0,25mm) (65 kPa). Os parâmetros foram: proporção de divisão 1:20, Hélio como gás de arraste, volume de injeção de 1,0 mL, temperatura do injetor: 250 °C, temperatura do detector: 250 °C, temperatura inicial da coluna: 50 °C, permanecendo por 1 min, Taxa de aquecimento de 5 C/min a 250 °C. O tempo total de análise foi de 45 minutos. A identificação das naftoquinonas foi feita por comparação do espectro de fragmentação com aqueles contidos na biblioteca CG-MS (banco de dados MS, NIST 5.0).

4. 3 ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELO ANIMAL ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

4. 3. 1 Animais Experimentais

Foram utilizados aproximadamente 200 zebrafish adultos machos e fêmeas, pesando entre 300-1000 mg, adquiridos da Acqua New Aquarium and Fish LTDA, ME (Itagassu-PE, Brasil), os quais foram mantidos em quarentena na Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisas Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP-Brasil). Após o período de quarentena, os animais foram aclimatados em condições controladas de pH (6,0-8,0), temperatura (24-28° C), alcalinidade (50-100 mg/L), salinidade (0,5-2,0 g/L) e oxigênio dissolvido (acima de 4 mg/L), com fotoperíodo claro/escuro (12/12h), conforme descrito por Carvalho *et al.*, (2018). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas para o cuidado de animais, e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA - UNIFAP, da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP-Brasil), com protocolo número 022/2022.

4. 3. 2 Determinação de DL50

Os animais utilizados foram coletados aleatoriamente do sistema de manutenção, mantidos em jejum por 24 horas antes do tratamento oral com ExtFH nas doses de 250, 350, 360, 370 e 400 mg/kg. Os animais foram pesados e imobilizados em uma esponja e, com auxílio de uma pipeta volumétrica (HTL Lab Solutions), foi administrado o tratamento oral, no volume máximo de 1,5µL/animal. Após o tratamento, os animais foram observados por 48 horas para avaliação comportamental e mortalidade, assim, a DL 50 foi determinada usando o método probit (SOUZA *et al.*, 2019), (BORGES *et al.*, 2018).

4. 3. 3 Avaliação Comportamental e Mortalidade

As reações comportamentais foram avaliadas em três estágios: (I) aumento da atividade natatória, espasmos e tremores no eixo da cauda; (II) movimento circular e perda de postura; (III) clônus, perda de motilidade, deposição do animal no fundo do aquário e morte. Os animais foram avaliados individualmente, assim, na ausência de resposta à estimulação

mecânica e não detecção de movimento do opérculo, o animal foi considerado morto (SOUZA *et al.*, 2016). Ao final das observações, os animais foram eutanasiados sob resfriamento anestésico, de acordo com as Diretrizes Americanas para Eutanásia Animal da Veterinary Medical Association.

4. 3. 4 Grupos de tratamento e vias de administração

Os tratamentos foram realizados por métodos diferentes utilizando os mesmos grupos para nível de comparação, e as substâncias de teste foram codificadas. Indometacina, DMSO, Tampão fosfato-salino (PBS) e ExtFH foram administrados via oral pelo método de gavagem, conforme descrito por Carvalho *et al.*, (2018) e Borges *et al.*, (2018).

Os animais foram separados em cinco grupos principais (n=12 / grupo): **grupo A** – controle (PBS + SS): tratados com solução salina (2 µL, v.o) e PBS (diluyente da carragenina - 20 µL i.p); **grupo B** – controle negativo (CAR): animais tratados apenas com Cg (20 µL, i.p); **grupo C** – controle (DMSO + CAR): tratados com DMSO (2 µL, v.o) e Cg (20 µL, i.p); **grupo D** – controle positivo (Indometacina + CAR): animais que receberam indometacina (10 mg/kg, v.o - po, Sigma Co. Sumao Paulo, Brasil) e Cg (20 µL, i.p); **grupo E** – tratamentos (ExtFH + CAR): animais que receberam a ExtFH, com subgrupos de acordo com as doses (2,5, 5, 10, 20 mg/kg, v.o) e Cg (20 µL, i.p), de acordo com Borges *et al.*, (2018).

4. 3. 5 Indução da inflamação com carragenina e mensuração do edema

Primeiramente os animais foram anestesiados em água (8-10° C). Logo, o ensaio foi dividido em dois métodos. No método 1 (M1), os grupos receberam os tratamentos administrado por via oral 1 hora antes da aplicação de carragenina via intraperitoneal. No método 2 (M2), os grupos receberam a aplicação de carragenina via intraperitoneal 1 hora antes da administração dos tratamentos via oral. A carragenina (iota tipo II, Sigma Co, Lote 65H1096) foi administrada em um volume de 20 µL solubilizada em PBS (BORGES *et al.*, 2018).

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, ou seja, no pico máximo do edema (PF= peso corporal final) após 6 horas de administração da carragenina. A diferença do peso corporal ($\neq$ PC= PF - PI) dos animais e o percentual de inibição da inflamação (% II) foram calculados, de acordo com: % II = 100% - [Média (tratamento ExtFH) 100%/ média (controle negativo)]. Então, os animais foram eutanasiados, fotografados com uma câmera fotográfica (Samsung WB150F, Brasil) e, imediatamente armazenados em solução de Bouin para para estudo histopatológico, com base

em estudos anteriores (CARVALHO *et al.*, 2018), (BORGES *et al.*, 2018), (HOLANDA *et al.*, 2022).

4. 3. 6 Análise histopatológica

Para análise histopatológica do fígado, intestino e rins, os animais foram fixados em solução de Bouin por 24 horas, descalcificados em solução de EDTA (Ácido etilenodiamina tetracético, Sigma Co., São Paulo, Brasil) por 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e posteriormente, diafanizadas por impregnação com xilol e incluídas na parafina. As amostras foram seccionadas a 5 µm usando um micrótomo (Brand Rotary Microtome Cut 6062, SLEE Medical, Alemanha), as seções de tecido passaram pelo processo de coloração com hematoxilina e eosina, por fim foi realizada a análise histopatológica. As imagens foram analisadas em Microscópio Olympus BX41-Micronal e fotografadas com câmera MDCE-5C USB 2.0 (digital), conforme descrito por Souza *et al.*, (2016), Carvalho *et al.*, (2018), Borges *et al.*, (2018).

4. 3. 7 Avaliação das alterações histopatológicas

O Índice de Alterações Histopatológicas (IAH) foi calculado a partir dos níveis de alterações teciduais observadas nos órgãos analisados. Essas alterações foram classificadas em níveis I, II e III, com o valor de IHA indicando se o órgão estava saudável (0 a 10), com alterações de leves a moderadas (11 a 20), com alterações moderadas a graves (21 e 50), ou com lesões irreversíveis (> 100) (SOUZA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2018), (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC., 1994).

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

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

Onde: **a**: alterações do primeiro estágio; **b**: alterações do segundo estágio; **c**: alterações do terceiro estágio; **na**: número de alterações consideradas como primeira etapa; **nb**: número de alterações consideradas como segunda etapa; **nc**: número de alterações consideradas como terceira etapa; **N**: número de peixes analisados por tratamento.

4. 3. 8 Análise estatística

Para determinar a dose letal mediana (LD50), a análise probit foi realizada usando o software GraphPad Prism versão 6.0. Os resultados do estudo histopatológico foram expressos como média ± erro padrão da média (SD). Foi aplicada a ANOVA (análise de variância) one-way, seguida do teste post hoc de Tukey-Kramer para análise estatística. Valores de $P \leq 0,05$

foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos foram registrados pelo programa Graph Pad Prisma® (versão 9.0).

4. 4 DOCKING MOLECULAR

4. 4. 1 Seleção de enzimas e estrutura inibitória

A estrutura cristalográfica da COX-1 (PDB ID 3N8X) de *Ovis aries* e COX-2 (PDB ID 5KIR) de *Homo sapiens* foram baixados do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Simulações de docking molecular foram realizadas com estruturas cristalinas complexadas com Nimesulida (NIM) e Rofecoxib (RCX) com resoluções de 2,75 e 2,70 Å, respectivamente (SIDHU *et al.*, 2010; KURUMBAIL *et al.*, 1996; ORLANDO; MALKOWSKI, 2016). NIM, RCX, Celecoxib (CEL) e Indometacina (INM) foram utilizados como ligantes de controle em estudos de docking molecular com base em um protocolo padrão estabelecido (CRUZ *et al.*, 2018; LEÃO *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2020).

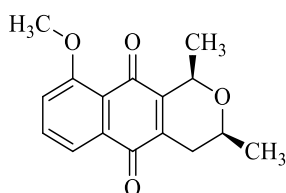
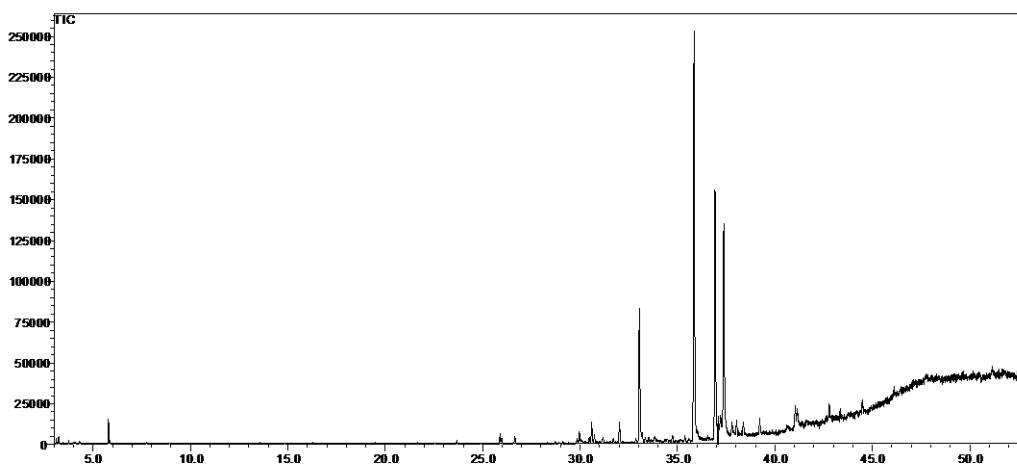
A atribuição da protonação e dos estados tautoméricos dos ligantes foi realizada com o programa Discovery Studio® 2.0 (2008), enquanto os átomos de hidrogênio da proteína foram adicionados com PROPKA usando pH fisiológico 7,4. Simulações de acoplamento COX-1 e 2 foram realizadas em AutoDock 4.2/Vina 1.1.2 e PyRx 0.8.30 (<https://pyrx.sourceforge.io/>). A validação dos protocolos de docking molecular foi realizada através da sobreposição do ligante cristalográfico (pose experimental) e da melhor conformação obtida (pose de docking) com base no valor do desvio quadrático médio (RMSD) (RAMOS *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2022; ARAUJO *et al.*, 2022).

5. 1 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO HEXÂNICA

Na análise cromatográfica da fração hexânica foram identificados constituintes químicos majoritários derivados de quinonas. O perfil cromatográfico apresentou quatro picos (substâncias) que correspondem aos compostos quinônicos, classificados como naftoquinonas, dentre as quais dois já foram relatados na literatura, encontrados na *E. bulbosa* (Miller) Urb e demais espécies.

O cromatograma de Íons Totais (**Figura 6**) demonstra a Eleuterina (Pico 1), com íon molecular 272 m/z e fórmula molecular $C_{16}H_{16}O_4$; o Eleuterol (Pico 2), correspondente ao íon molecular 244 m/z e fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_4$; duas substâncias ainda não identificadas, com íon molecular 270 m/z (Pico 3), com íon molecular de 284 m/z (Pico 4), que foram eluídas entre 32 a 38 minutos.

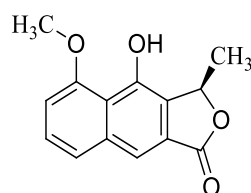
Figura 7: Análise cromatográfica por CG-EM da Fração Hexânica do extato etanólico de *E. bulbosa*.



Pico 1: Eleuterina

T. retenção: 33.5 min

Íon molecular: 272 m/z



Pico 2: Eleuterol

T. retenção: 35.8 min

Íon molecular: 244 m/z

O perfil espectral traçado a partir desta fração proporcionou a identificação dos compostos e elucidação de suas estruturas químicas, tais como Eleuterina e Eleuterol, ambos já encontrados nas espécies *Eleutherine americana* MERR. et HEYNE, *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb e *Eleutherine plicata* Herb relacionado ao efeito das atividades microbiológicas e antioxidantes do referido extrato, logo a caracterização inicial confirma a presença de naftoquinonas na composição da planta (MALHEIROS, 2008), (RIBEIRO, 2008), (GALLUCIO, 2014).

As naftoquinonas estão majoritariamente presentes em plantas deste gênero, elas podem danificar alguns componentes celulares importantes tanto de células normais como de células malignas. Esses compostos induzem o estresse oxidativo no organismo através do ciclo de oxidação e redução das quinonas, assim, os radicais livres são absorvidos com mais rapidez. Esse mecanismo de ação é importante pois, alguns microrganismos patogênicos são muito mais sensíveis ao estresse oxidativo que os hospedeiros humanos, podendo ser combatido e eliminado SILVA *et al.*, 2003).

5. 2 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

5. 2. 1 Estudo de Toxicidade Aguda - Obtenção da dose letal média (DL50) e Avaliação dos Parâmetros Comportamentais

Após a administração oral da ExtFH nas doses de 250, 350, 360, 370 e 400 mg/kg, os grupos foram observados por 48 h, havendo óbito nas quatro maiores doses, o que possibilitou calcular a dose letal média (DL50) de 346,74 mg/kg. Nas primeiras horas, observou-se que a ExtFH desencadeou mudanças comportamentais significativas nos animais, pois, sinais de estresse como aumento da atividade natatória, perda de equilíbrio e motilidade, permanência no fundo e morte foram registrados (SOUZA *et al.*, 2019).

Dessa forma, os animais do **grupo 1** (250 mg/kg) apresentaram perda de equilíbrio, aumento da atividade de natação e deposição do animal no fundo nas primeiras horas, depois se recuperaram e voltaram a nadar normalmente até o tempo final do experimento. Os animais do **grupo 2** (350 mg/kg) apresentaram apenas perda de equilíbrio e aumento da atividade natatória na primeira hora e depois se recuperaram. Por outro lado, os animais do **grupo 3** (360 mg/kg) apresentaram aumento da atividade natatória, perda de equilíbrio, perda da motilidade e deposição no fundo na primeira hora, sendo que houve duas mortes após 3 horas de observação.

No **grupo 4** (370 mg/kg), os animais apresentaram aumento da atividade natatória, perda da motilidade e perda de equilíbrio, essa última alteração permaneceu por 6 horas em

um animal, e ocorreu duas mortes, sendo uma após 3 h e outra após 24 horas. Por fim, no **grupo 5** (400 mg/kg), os animais apresentaram aumento da atividade natatória, perda de equilíbrio, perda da motilidade e deposição no fundo nas primeiras horas, após isso a maioria dos animais morreram, ficando apenas um com deposição no fundo, e morreu após 24 horas.

Nesse sentido, as mudanças comportamentais durante a obtenção da dose letal média (DL50), demonstram que a ExtFH induziu poucas alterações em relação ao padrão normal quando observado em 48 h. De acordo com Holanda e colaboradores (2022), essas alterações podem indicar a ação tóxica do extrato testado, pois quando em contato com a mesma, tendem a desencadear alterações fisiológicas, teciduais e comportamentais.

Diversos autores afirmam que o *zebrafish* ao entrar em contato com substâncias xenobióticas adotam padrões de comportamento de estresse, semelhantes aos que foram apresentados neste estudo. Assim como, ressaltam que o uso desse modelo animal é confiável e reprodutivo para testar a toxicidade aguda de substâncias (SOUZA *et al.*, 2019); (QUITIAN-USECHE *et al.*, 2021).

5. 2. 1. 1 Avaliação de alterações histopatológicas da Toxicidade Aguda

O estudo histopatológico mostrou que os animais tratados com a ExtFH apresentaram poucas alterações histopatológicas no fígado ($< 4.75 \pm 0.95$) e rins ($< 7.50 \pm 2.38$). Já no intestino, as alterações apresentaram um IAH mais elevado nas doses de 250 mg/kg (17.5 ± 2.51), 350 mg/kg (14.75 ± 1.89) e 360 mg/kg ($12 \pm 1,15$), como mostra a figura os índices classificam esse órgão com alterações de leves a moderadas (**Figura 8**).

Diversos estudos relatam que o intestino do *zebrafish* é o órgão mais afetado em tratamentos orais (CARVALHO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019; SÁ HYACIENTH *et al.*, 2020; TOMAZI *et al.*, 2021). Em geral, essas alterações são registradas por ser o primeiro órgão de contato com as substâncias testadas (SOUZA *et al.*, 2019). No entanto, alguns autores afirmam que as alterações intestinais são mecanismos de defesa, isso pode ser observado pela presença de alterações como o deslocamento da lâmina própria (**Figura 9**) que separa as vilosidades da camada muscular (HOLDEN *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019).

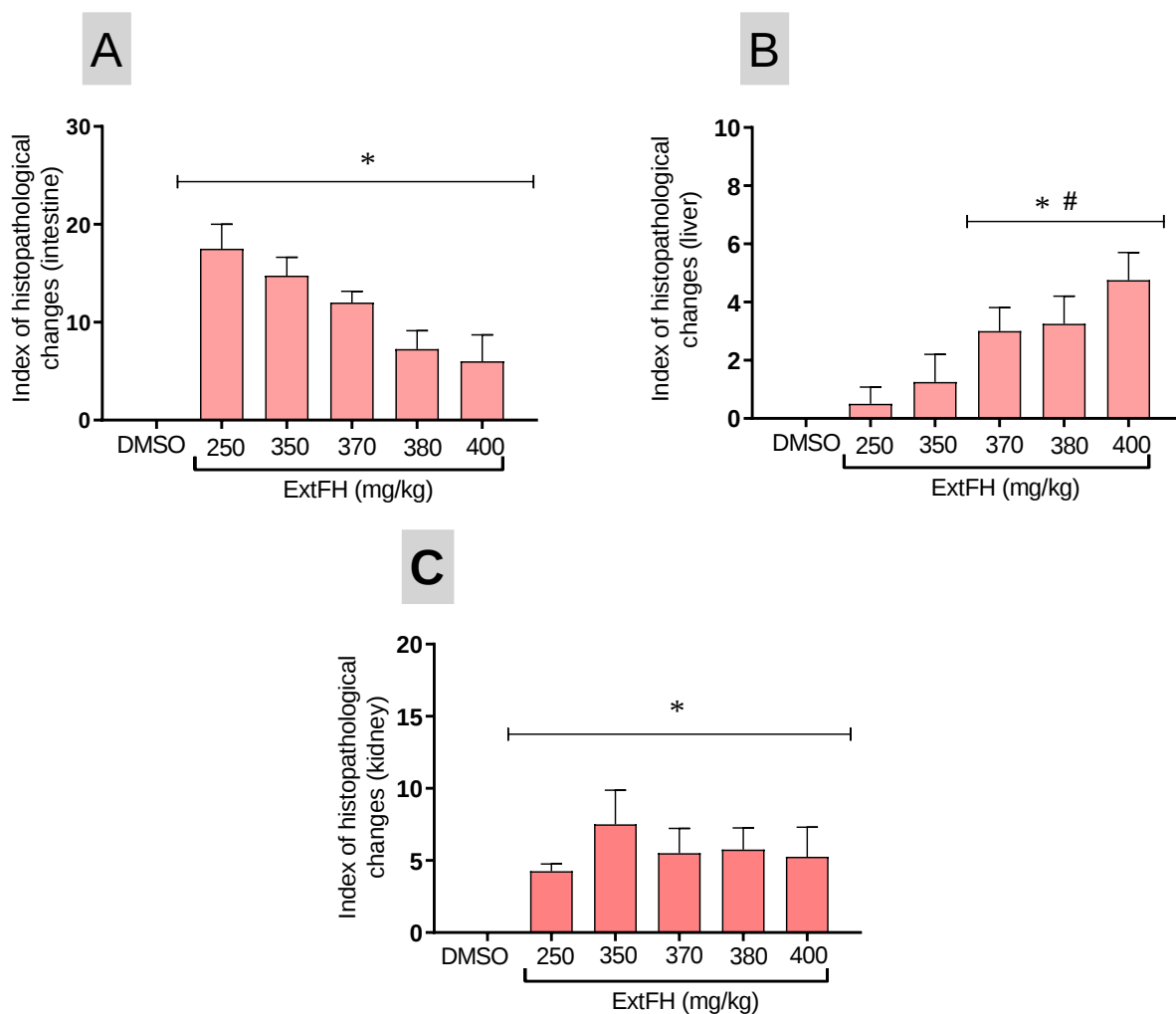


Figura 8: Índice de alterações histopatológicas no intestino (A), fígado (B) e rim (C) em cada dose de ExtFH. Os dados são apresentados como média $\pm$ SD ($n = 3/\text{grupos}$); * $p < 0,05$ para o DMSO, # $p < 0,05$ para o 250 mg/kg. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA one-way seguida do teste post-hoc de Tukey.

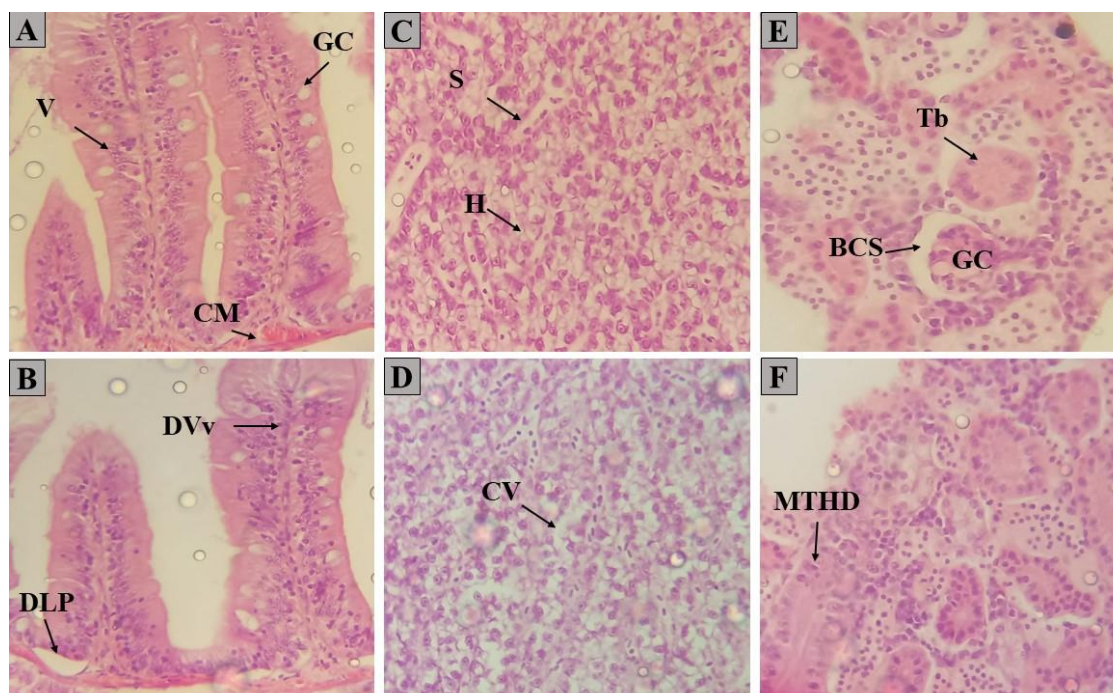


Figura 9: Secção histológica de intestino, fígado e rins de zebrafish, mostrando as principais alterações histopatológicas registradas no teste de toxicidade aguda. Em **A**: observa-se as vilosidades (V), camada muscular (CM), células caliciformes (CG), e **B**: destacamento da lamina própria (DLP), dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DVv); em **C**: observa-se tecido hepático, com hepatócitos normais (H), sinusóides (S), e **D**: vacuolização citoplasmática (CV); em **E**: observa-se tecido renal com túbulos normais (Tb), espaço da capsula de Bowman (BCS), capilares do glomérulo (GC), e **F**: degeneração hialina tubular leve (MTHD). H&E.

5. 2. 2 Análise comportamental e Ensaio de edema abdominal induzido por Carragenina

5. 2. 2. 1 Análise comportamental do ensaio de inflamação

Em relação as alterações de comportamento, observou-se que as doses de tratamento desencadearam mudanças comportamentais leves nos animais e foram registrados sinais de estresse, como perda de equilíbrio, perda da motilidade e deposição do animal no fundo. Porém, os animais se recuperaram e voltaram a nadar normalmente.

O comportamento dos animais na primeira hora após a administração da Carragenina (M1), foi descrito de acordo com os grupos e os tratamentos recebidos (Tabela 1), sendo **grupo A** (controle PBS), **grupo C** (controle DMSO), **grupo D** (controle positivo – tratados com Indometacina), **grupo E** (tratados com ExtFH 2,5 mg/kg), **grupo E** (tratados com ExtFH 5 mg/kg), **grupo E** (tratados com ExtFH 10 mg/kg), **grupo E** (tratados com ExtFH 20 mg/kg).

Tabela 1: Análise Comportamental (M1).

Avaliação Comportamental após 1h da indução por carragenina (M1)			
	Repouso no fundo	Perda da motilidade	Perda de equilíbrio
Grupo D	10%	10%	-
Grupo E (2,5 mg/kg)	20%	10%	-
Grupo E (5 mg/kg)	-	-	20%
Grupo E (10 mg/kg)	-	30%	30%
Grupo E (20 mg/kg)	40%	10%	-

Animais dos grupos **grupo A** (controle PBS) e **grupo C** (controle DMSO) não apresentaram alterações dentro dos critérios analisados na primeira hora. Na segunda, terceira e quarta hora após a administração da carragenina os animais se recuperaram e mantiveram padrão de normalidade. Na quinta hora após a injeção da Carragenina, apenas 20% dos animais do **grupo E** (tratados com ExtFH 20 mg/kg) apresentaram repouso no fundo, nos demais grupos não houve alterações.

No segundo método (M2), o comportamento dos animais na primeira e segunda hora após a administração da Carragenina foram descritos (Tabela 2) para os mesmos grupos analisados no M1.

Tabela 2: Análise Comportamental (M2).

Avaliação Comportamental após 1h e 2h da indução por carragenina (M2)				
	Repouso no fundo		Perda da motilidade	
	1 h	2 h	1 h	2 h
Grupo A	-	-	-	-
Grupo C	-	20%	-	-
Grupo D	20%	-	10%	-
Grupo E (2,5 mg/kg)	20%	20%	-	-
Grupo E (5 mg/kg)	30%	40%	-	20%
Grupo E (10 mg/kg)	40%	40%	-	20%
Grupo E (20 mg/kg)	10%	10%	-	30%

Animais dos grupos **grupo A** (controle PBS) não apresentaram alterações consideráveis nas primeiras horas, assim como, animais **grupo C** (controle DMSO) não apresentaram alterações dentro dos critérios analisados na primeira hora, e animais do **grupo D** (tratados com Indometacina) não apresentaram alterações comportamentais na segunda. Na terceira e quarta hora após a administração da Carragenina, os animais mantiveram padrão de normalidade, pois nenhum grupo apresentou alterações comportamentais aparentes.

As reações observadas nos animais possivelmente foram causadas pelas ações sinérgicas dos compostos presentes na ExtFH, que são semelhantes às encontradas em outros estudos que utilizaram os mesmos parâmetros aqui descritos (Souza *et al.*, 2022). Na avaliação das doses de tratamento do ExtFH sobre o processo inflamatório induzido por carragenina, foram utilizados os protocolos de Huang *et al.*, (2014), Carvalho *et al.*, (2018), Borges *et al.*, (2018) utilizando a carragenina via intraperitoneal para induzir a formação de edema abdominal em *zebrafish*, com adaptações.

5. 2. 2. 2 Avaliação da formação de edema

Para avaliar a formação de edema abdominal induzido com carragenina via intraperitoneal em *zebrafish*, quatro grupo de animais foram tratados em diferentes doses com

a ExtFH via oral, nas doses de 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg. Para comparar os resultados, outro grupo foi tratado com Indometacina na dose de 30 mg/kg.

No decorrer dos testes, foram utilizados os protocolos de (HUANG *et al.*, 2014), (CARVALHO *et al.*, 2018), (BORGES *et al.*, 2018) e Coelho de Souza *et al.*, (2021) com algumas adaptações. No método 1 (M1), os grupos receberam os tratamentos (ExtFH, DMSO, PBS e Indometacina, v.o), 1 hora antes da aplicação de carragenina via intraperitoneal. No método 2 (M2), a adaptação consistiu em mudar a ordem de tratamento e indução do edema, assim, os grupos receberam a aplicação de carragenina (i.p) 1 hora antes da administração dos tratamentos (ExtFH, DMSO, PBS e Indometacina, v.o).

Dessa forma, a indução do edema se deu através da administração de carragenina, um bioproduto derivado de algas marinhas, que além da formação de edema, leva ao aumento do estímulo do sistema imunológico, sendo caracterizado pela migração celular e, consequentemente, um processo inflamatório contínuo (PRATA *et al.*, 2020).

O *zebrafish* vem substituindo o uso de roedores devido a várias características favoráveis, como seu pequeno tamanho, isso faz com que a dose do princípio ativo que pode induzir o efeito farmacológico, seja administrada em microlitros (µL) ou quantidades menores. Sendo bastante favorável para testes com produtos naturais, pois na maioria das vezes substâncias dessa natureza são de difícil extração (SOUZA *et al.*, 2016); (QUITIAN-USECHE *et al.*, 2021).

No primeiro método (M1), a ExtFH apresentou efeito inibitório sobre o edema abdominal induzido por carragenina para todas as doses de ExtFH (2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg), incluindo o controle positivo (indometacina 30 mg/kg). No pico máximo do edema (5ª hora) (**Figura 10**), a redução correspondeu a 66,2%, 57%, 46%, 31,5% para as doses de 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente. A indometacina 30 mg/kg (controle positivo) apresentou inibição de 70,4% no pico máximo do edema.

Observou-se que todos os tratamentos com a ExtFH reduziram significativamente o edema abdominal em proporções semelhantes, sem diferença estatisticamente significativa entre as doses testadas. Por outro lado, todas as doses de ExtFH apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (CAR) ($p \leq 0,05$). Em relação ao grupo controle positivo (indometacina 30 mg/kg), todas as doses da ExtFH não apresentaram diferença estatística.

O edema é um sinal cardinal comum de inflamação aguda, devido aos efeitos de mediadores inflamatórios, sua formação é causada pela vasodilatação e aumento da

permeabilidade vascular, que possibilitam aumento do fluxo plasmático, extravasamento de proteínas e formação de edema por acúmulo de exsudato na matriz extracelular (SOUZA *et al.*, 2022). A redução do edema abdominal pelo ExtFH provavelmente ocorre através da inibição dos níveis de TNF- α e iNOS (óxido nítrico sintase induzida), pois essas são citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela formação desse tipo de edema induzido por carragenina em *zebrafish* (HUANG *et al.*, 2014).

Portanto, com a perspectiva de propor o uso de modelos experimentais mais viáveis, pesquisas validaram o uso da carragenina como indutor inflamatório no peritônio de *zebrafish*, no estudo desenvolvido por Huang e colaboradores (2014) foi observado que, a injeção intraperitoneal da carragenina produziu sintomas típicos da inflamação, como inchaço e MPO regulada positivamente, assim como as proteínas pró-inflamatórias TNF- α e iNOS. Ademais, os resultados demonstraram que o local da injeção nos tecidos do animal induz inflamação aguda e que as respostas inflamatórias do *zebrafish* adulto podem ser moduladas por compostos conhecidos com propriedades anti-inflamatórias.

A carragenina foi adotada para induzir o processo inflamatório, por ser uma substância capaz de produzir efeito edematogênico através de um mecanismo bifásico, evidenciado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios específicos em diferentes períodos. Na fase inicial, após a injeção de carragenina (0–1 h), há liberação de histamina e/ou serotonina, responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no início do processo. A segunda fase (1–6 h), é mediada principalmente pela liberação de prostaglandinas, sendo caracterizada pela presença de infiltrado celular, composto por macrófagos, eosinófilos e, principalmente, linfócitos. Assim, ambas as fases podem ser mediadas pela liberação de cininas (FAVACHO *et al.*, 2011), (SOUZA *et al.*, 2022).

No segundo método (M2), a ExtFH também apresentou efeito inibitório sobre o edema abdominal induzido por carragenina para todas as doses da ExtFH, incluindo o controle positivo. No pico máximo do edema (5ª hora) (**Figura 11**), a redução correspondeu a 62,4%, 51,6%, 49,1%, 60,3% para as doses de 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente. A indometacina 30 mg/kg (controle positivo) apresentou inibição de 69,4% no pico máximo do edema.

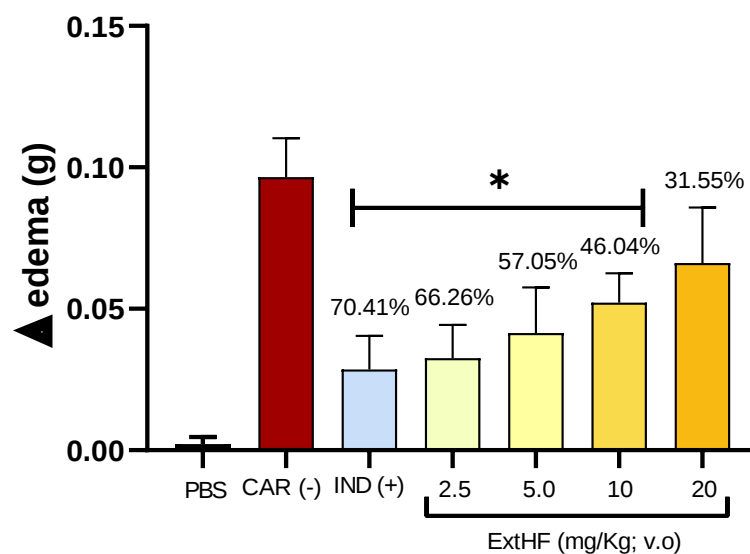


Figura 10: Efeito da ExtFH na formação do edema abdominal induzido por carragenina (M1).

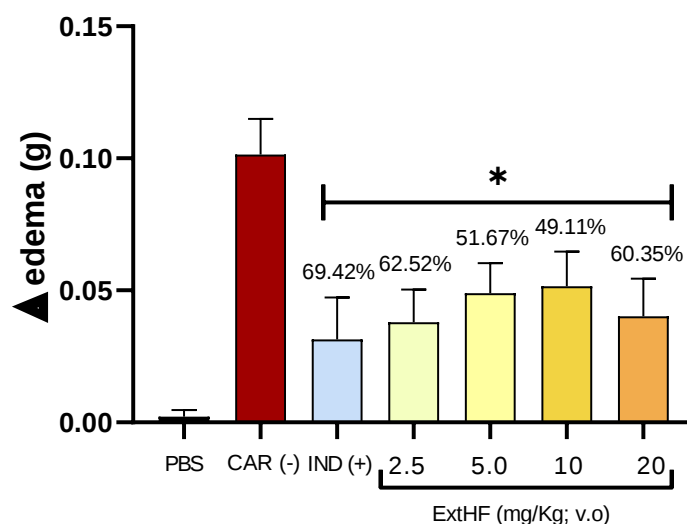


Figura 11: Efeito da ExtFH na reversão do edema abdominal induzido por carragenina (M2).

Dessa forma, observou-se que todos os tratamentos com a ExtFH reduziram significativamente o edema abdominal em proporções semelhantes, sem diferença estatisticamente significativa entre as doses testadas. Por outro lado, todas as doses da ExtFH apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (CAR) ($p \leq 0,05$). Em relação ao grupo controle positivo (indometacina 30 mg/kg), as doses da ExtFH não apresentaram diferença estatística. Nesse sentido, nos dois métodos a inibição

seguuiu uma porcentagem de proporções semelhantes para as doses da ExtFH (2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg) e para o controle positivo (indometacina 30 mg/kg), com exceção da dose 20 mg/kg da ExtFH, que no primeiro método apresentou 31,5% de inibição, e no segundo evoluiu para 60,3%.

Considerando os resultados obtidos, pode-se sugerir que a ExtFH possui atividade anti-inflamatória, e a mudança em relação a dose 20 mg/kg de ExtFH provavelmente ocorreu devido a diferença do método empregado e o aumento da concentração, pois a atividade desse extrato vegetal foi relacionada à supressão de citocinas pró-inflamatórias em estudos utilizando outro modelo animal (THI BICH HANH *et al.*, 2018).

Thi Bich Hanh *et al.* mostraram potenciais efeitos anti-inflamatórios do extrato de *E. bulbosa* ao suprimir pró-citocinas como IL-6, TNF- α , e IL-12 p40 em ensaios *in vitro*. Em ensaios *in vivo*, o extrato apresentou atividade anti-inflamatória, reduzindo sinais de artrite em modelo animal camundongo CAIA (THI BICH HANH *et al.*, 2018).

Os métodos experimentais avaliados neste trabalho permitiram ampliar a discussão sobre o efeito anti-inflamatório da ExtHF a partir dos bulbos de *E. bulbosa*. No primeiro método (M1), foi mostrado que a ExtFH foi muito eficiente para prevenir a formação de edema. Além disso, no segundo método (M2) foi revelado que a ExtFH tem grande efeito em reverter o edema já instalado.

Vale ressaltar que, o M1 é bastante usado em pesquisas com *zebrafish*, no entanto, os estudos que trabalham com o M2 são praticamente raros com esse modelo animal. O M2 foi recentemente utilizado para avaliar o efeito antiedematogênico do óleo essencial de *Hyptis crenata* (EOHc) na inflamação em camundongos albinos, com resultados significativos em prevenir a formação de edema, e em reverter o edema (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2021).

5. 2. 2. 3 Análise histopatológica da formação de edema

Diversos estudos estacam a importância de avaliar a ocorrência de alterações histopatológicas em teste de avaliação da atividade anti-inflamatória (QUITIAN-USECHE *et al.*, 2021). CARVALHO *et al.*, (2018) afirma que a injeção de um agente inflamatório (como a carragenina) na região abdominal do *zebrafish* pode provocar reações em órgãos vitais, principalmente intestino, fígado e rins, dado o pequeno tamanho do animal.

O estudo histopatológico do teste de inflamação M1 mostrou que no intestino, as alterações mais graves foram observadas nos animais do controle positivo (10 mg/kg de indometacina) e controle negativo (CARR+DMSO) com IAH superior a 10 (13.25 ± 1.7 e 24.75 ± 7.84 , respectivamente). As alterações mais frequentes foram o deslocamento da lâmina

própria e dilatação dos vasos presentes nas vilosidades. Já nos grupos controle (PBS intraperitoneal, i.p. e salina v.o.) e todos os grupos de tratamento com ExtFH (2.5, 5, 10 e 20 mg/kg), apresentaram IAH inferior a 10, classificando esse órgão como normal (**Figura 12**). As principais alterações observadas foram a hipertrofia das células epiteliais e vacuolização dos enterócitos (**Figura 14**).

Segundo Carvalho *et al.*, (2018), a vacuolização dos enterócitos, bem como o deslocamento da lâmina própria podem comprometer a capacidade do organismo de absorver nutrientes. Essas alterações podem estar relacionadas à técnica invasiva de injeção intraperitoneal, que pode lesar o intestino (BORGES *et al.*, 2018).

No tecido hepático, os grupos controle (PBS intraperitoneal, i.p. e salina v.o.), controle positivo (10 mg/kg de indometacina) e todos os grupos de tratamento com ExtFH (2.5, 5, 10 e 20 mg/kg), apresentaram IAH inferior a 10, que classifica esse órgão como normal, uma vez que essa alteração não altera o funcionamento normal do órgão. A alteração histopatológica mais frequente foi a vacuolização citoplasmática. Já nos animais do controle negativo (CARR+DMSO) apresentaram IAH igual a 31 ± 4.57 que classifica esse órgão com alterações de moderadas a graves, comprometendo seu funcionamento normal. As alterações mais evidentes foram a degeneração citoplasmática, atrofia nuclear e hiperemia (**Figura 14**).

O metabolismo do *zebrafish* é extremamente ágil e supera o de outras espécies de Teleósteos. Esse fato pode ajudar a explicar a intensa vacuolização do citoplasma dos hepatócitos, que, em alguns casos, indica o início de um processo degenerativo que pode resultar na disfunção dos processos metabólicos após exposição a substâncias tóxicas (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2016). Nesse estudo, apenas o grupo controle negativo (carragenina intraperitoneal e DMSO, p.o.) apresentou IAH com capacidade de alterar o funcionamento normal desse órgão. A hiperemia, alteração muito observada nesse grupo, ocorre na tentativa de aumentar o fluxo sanguíneo geral no fígado e a liberação de nutrientes e oxigênio para as áreas afetadas, prevenindo a hipóxia (Fernandes *et al.*, 2002).

No tecido renal, o grupo controle negativo (CARR+DMSO) apresentou o IAH mais elevado (30.5 ± 4.12), classificando esse órgão com alterações de moderadas a graves. As principais alterações observadas foram dilatação dos capilares do glomérulo, diminuição do espaço da capsula de Bowman, degeneração hialina tubular leve e severa. Os demais grupos controle e de tratamento com ExtFH apresentaram IAH inferior a 10, mantendo esse órgão com funcionamento normal. As alterações mais frequentes foram degeneração hialina tubular leve.

O rim do zebrafish contém néfrons responsáveis por filtrar os resíduos do sangue e capturar sal e água. Inclui as regiões linfóide e hematopoiética, bem como células esteroideogênicas e endócrinas (BORGES *et al.*, 2018); (SOUZA *et al.*, 2016). Segundo Pascke e Lanzenford (2017), o principal papel dos rins em peixes Teleósteos de água doce é eliminar o grande volume de água que entra pela boca, e não armazená-la.

Alterações tubulares no rim do zebrafish podem ocorrer devido a disfunções metabólicas causadas por compostos tóxicos. Essas alterações podem, eventualmente, induzir necrose renal se a toxicidade for suficientemente alta [30]. Neste estudo, as alterações tubulares, a degeneração tubular e a hiperplasia das células tubulares foram leves, sem necrose ou disfunção tecidual.

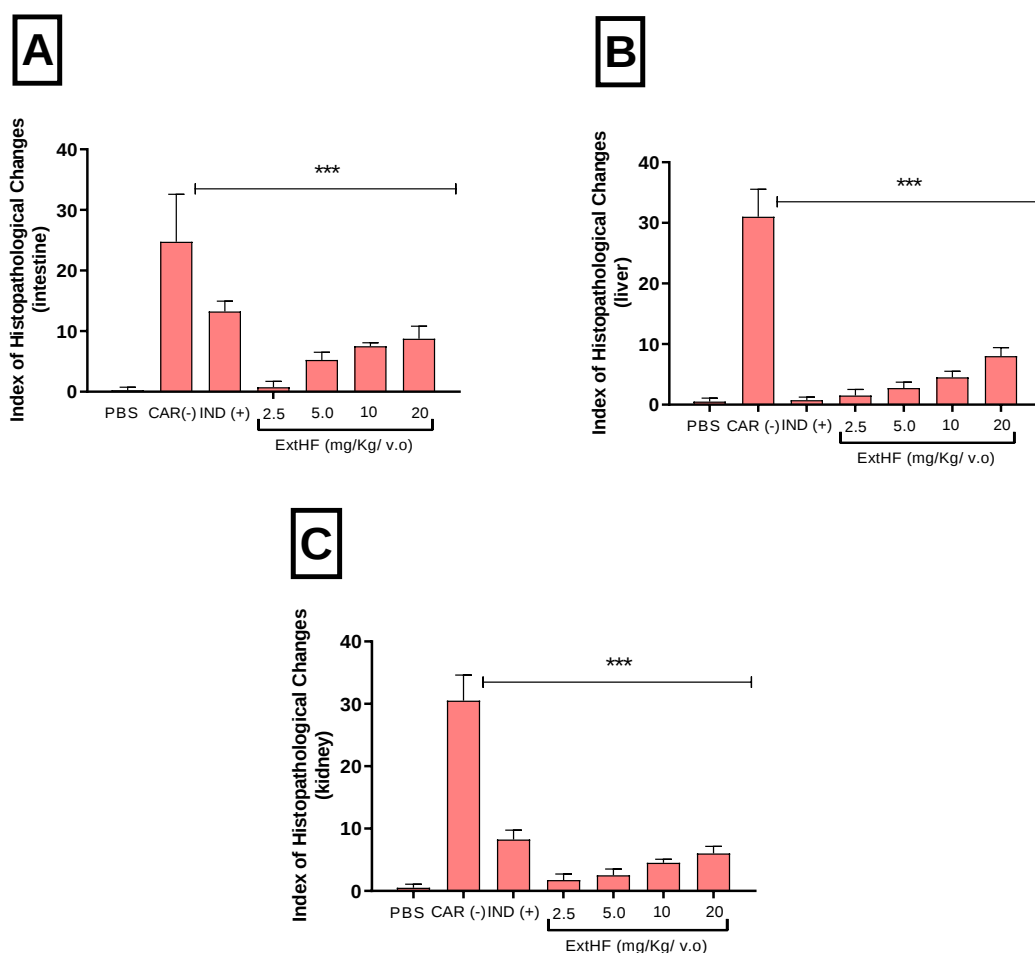


Figura 12: Efeito da administração oral de solução salina e PBS (SS/PBS, 2 µl), DMSO 2 µl, Indometacina (10 mg/kg) e as doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg do Ex tFH no Índice de Alterações Histopatológicas do intestino (A), fígado (B) e rim (C) em zebrafish com a aplicação de carragenina (20 µg/animal). Os dados são apresentados como média ± DP (n = 12/grupos); *** p < 0,05 para DMSO. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey. (M1).

O estudo histopatológico do teste de inflamação M2 mostrou-se similar ao teste M1. Verifica-se que no intestino, as alterações mais graves foram observadas nos animais do controle positivo (10 mg/kg de indometacina) e controle negativo (CARR+DMSO) com IAH superior a 10 (14.25 ± 0.9 e 28.25 ± 5.37 , respectivamente), pouco mais elevado que no teste M1. As alterações mais frequentes foram o deslocamento da lâmina própria e dilatação dos vasos presentes nas vilosidades e a infiltração de leucócitos e linfócitos. Nos grupos controle (PBS intraperitoneal, i.p. e salina v.o.) e todos os grupos de tratamento com ExtFH (2.5, 5, 10 e 20 mg/kg), apresentaram IAH inferior a 10, classificando esse órgão como normal (**Figura 13**). As principais alterações observadas foram a hipertrofia das células epiteliais e vacuolização dos enterócitos.

De acordo com (BORGES *et al.*, 2018), procedimentos invasivos como a injeção abdominal de carragenina no zebrafish podem gerar inflamação na lâmina própria intestinal e causar infiltração de leucócitos no tecido epitelial do intestino, além de causar aumento no número de células de defesa.

Assim como no fígado dos animais do teste M1, em M2 o grupo controle negativo (CARR+DMSO) apresentou IAH igual a 31 ± 4.57 que classifica esse órgão com alterações de moderadas a graves. As alterações mais evidentes foram a vacuolização citoplasmática, degeneração citoplasmática, atrofia nuclear e hiperemia. Isso mostra que em ambos os testes houve a necessidade de aumentar o fluxo sanguíneo no fígado, afim de reparar os danos teciduais (Fernandes *et al.*, 2002).

Da mesma forma que no teste M1, o tecido renal, no teste M2 o grupo controle negativo (CARR+DMSO) apresentou o IAH mais elevado (32.5 ± 5.12), classificando esse órgão com alterações de moderadas a graves. As principais alterações observadas foram dilatação dos capilares do glomérulo, diminuição do espaço da capsula de Bowman, degeneração hialina tubular leve e severa (**Figura 14**). Os demais grupos controle e de tratamento com ExtFH apresentaram IAH inferior a 10, mantendo esse órgão com funcionamento normal. As alterações mais frequentes foram degeneração hialina tubular leve.

Diversos estudos afirmam que o rim é um órgão bastante afetado quando exposto a substâncias tóxicas (SOUZA *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019; BORGES *et al.*, 2018). Nesse estudo portanto, não foi observado nos grupos tratados com o ExtFH alterações capazes de alterar o funcionamento normal do órgão, mesmo nos testes M1 e M2.

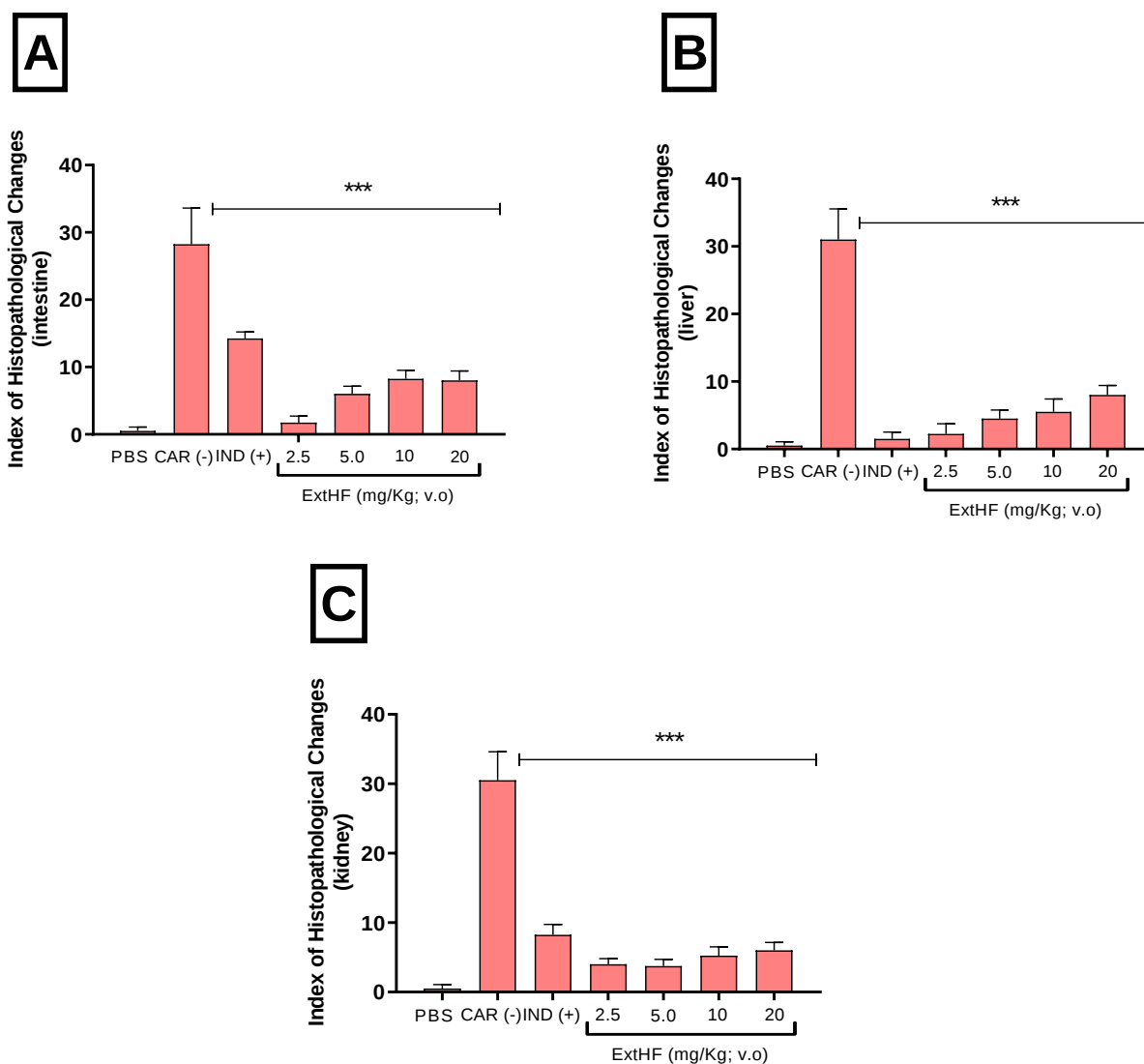


Figura 13: Efeito da administração oral de solução salina e PBS (SS/PBS, 2 µl), DMSO 2 µl, Indometacina (10 mg/kg) e as doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg do ExtFH no Índice de Alterações Histopatológicas do intestino (A), fígado (B) e rim (C) em zebrafish com a aplicação de carragenina (20 ug/animal). Os dados são apresentados como média ± DP (n = 12/grupos); *** p < 0,05 para DMSO. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA unidirecional seguida do teste post hoc de Tukey. (M2).

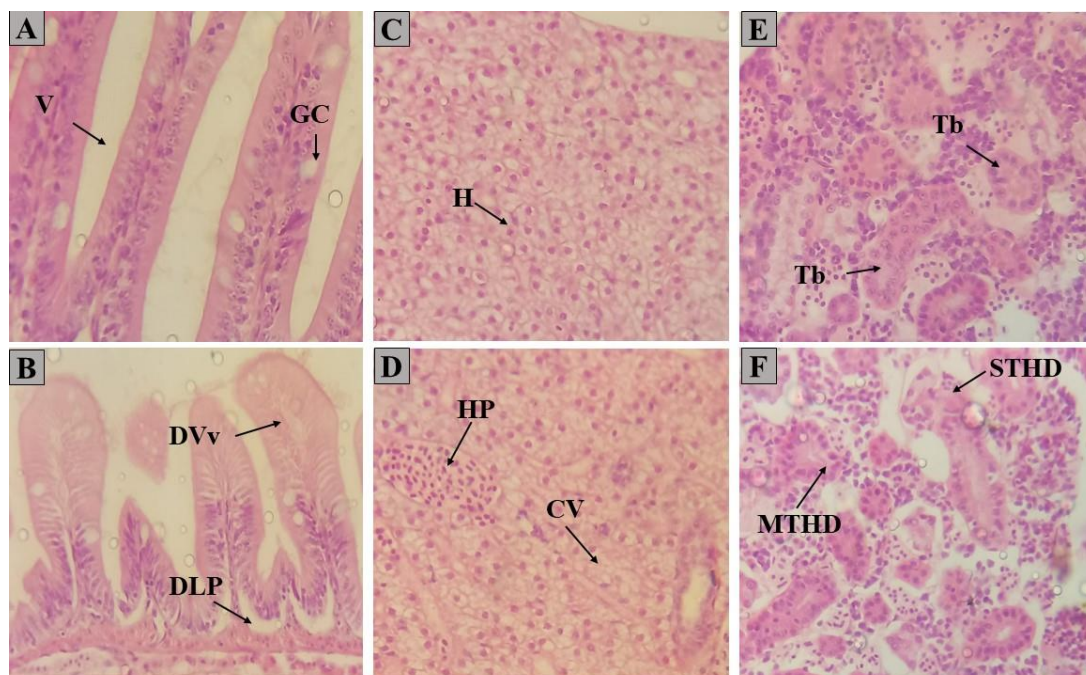


Figura 14: Secção histológica de intestino, fígado e rins de zebrafish, mostrando as principais alterações histopatológicas registradas nos testes da atividade anti-inflamatória M1 e M2. Em **A**: observa-se tecido intestinal com vilosidades normais (V), células caliciformes (CG), e **B**: destacamento da lâmina própria (DLP), dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DVv); em **C**: observa-se tecido hepático, com hepatócitos normais (H), e **D**: hiperemia (HP) e vacuolização citoplasmática (CV); em **E**: observa-se tecido renal com túbulos normais (Tb), e **F**: degeneração hialina tubular leve (MTHD) e degeneração hialina tubular severa (STHD). H&E.

5. 3 DOCKING MOLECULAR DAS NAFTOQUINONAS EM ALVOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS AO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Protocolo de validação o docking molecular foi realizado através da sobreposição das estruturas cristalográficas dos ligantes de referência aos alvos biológicos, nos quais foi pesquisada uma conformação bioativa semelhante ao ligante da estrutura cristalográfica COX-1 e 2 (PDB ID 3N8X e 5KIR) (**Figura 15**).

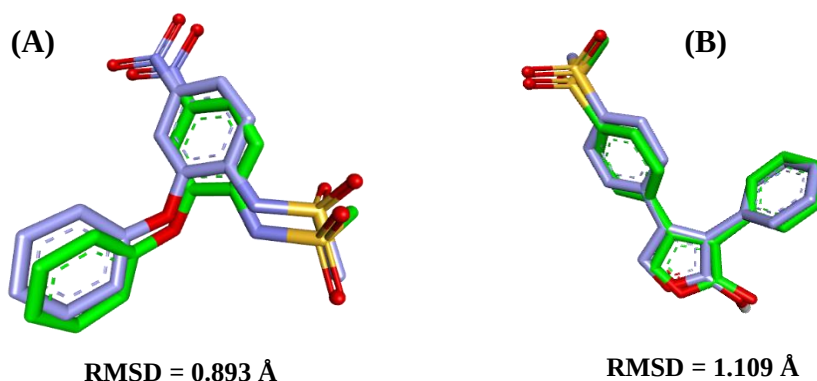


Figura 15: Sobreposição de poses de ligantes cristalográficos (verde) com poses de acoplamento (roxo): (A) NIM para *Ovis Aries* organismo (PDB 3N8X) e (B) RCX para *Homo sapiens* organismo (PDB 5KIR).

Os resultados da validação foram considerados satisfatórios, em que a posição relativa do ligante cristalográfico e o ligante acoplado foram considerados semelhantes (**Figura 15**). Recuperando a pose de cada inibidor de COX-1 e 2 (NIM e RCX) foi possível validar os protocolos de docking molecular, calculando os valores do desvio quadrático médio (RMSD) de 0,893 e 1,109 Å, respectivamente. Assim, a literatura específica afirma que quando os valores de $\text{RMSD} \leq 2 \text{ Å}$, o protocolo de docking é considerado satisfatório por apresentar semelhança com o modelo experimental (RAMOS *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2022).

A recuperação da pose de acoplamento molecular permitiu observar que o NIM interage com os resíduos de aminoácidos , Leu352, Trp387, Ile523 e Ala527. As classificações dos tipos de interação são ligação de hidrogênio (Arg120) e hidrofóbica (-- sigma e --alquil) de Leu352-Ala527. O nitrogênio do grupo nitrofenil é colocado na parte traseira do sítio de ligação da COX próximo à abertura da bolsa lateral, enquanto o anel ciclohexano é estendido até o sítio ativo próximo ao Ser530 (SIDHU *et al.*, 2010).

A pose de acoplamento molecular permitiu que o RCX interagisse com resíduos de aminoácidos no sítio de ligação da COX-2, em comparação com a estrutura cristalográfica. No sítio de ligação, as interações ocorrem em torno da hélice α entre os resíduos de aminoácidos Thr88-Tyr91, Val344-Leu352 e na folha β entre os resíduos de aminoácidos Leu353-Asp362 e Ala516-Gly519. No RCX é possível observar ligações de hidrogênio com os resíduos Ile517 e Phe518; e interações hidrofóbicas planares com Val349 e Leu352 (PHAM *et al.*, 2012).

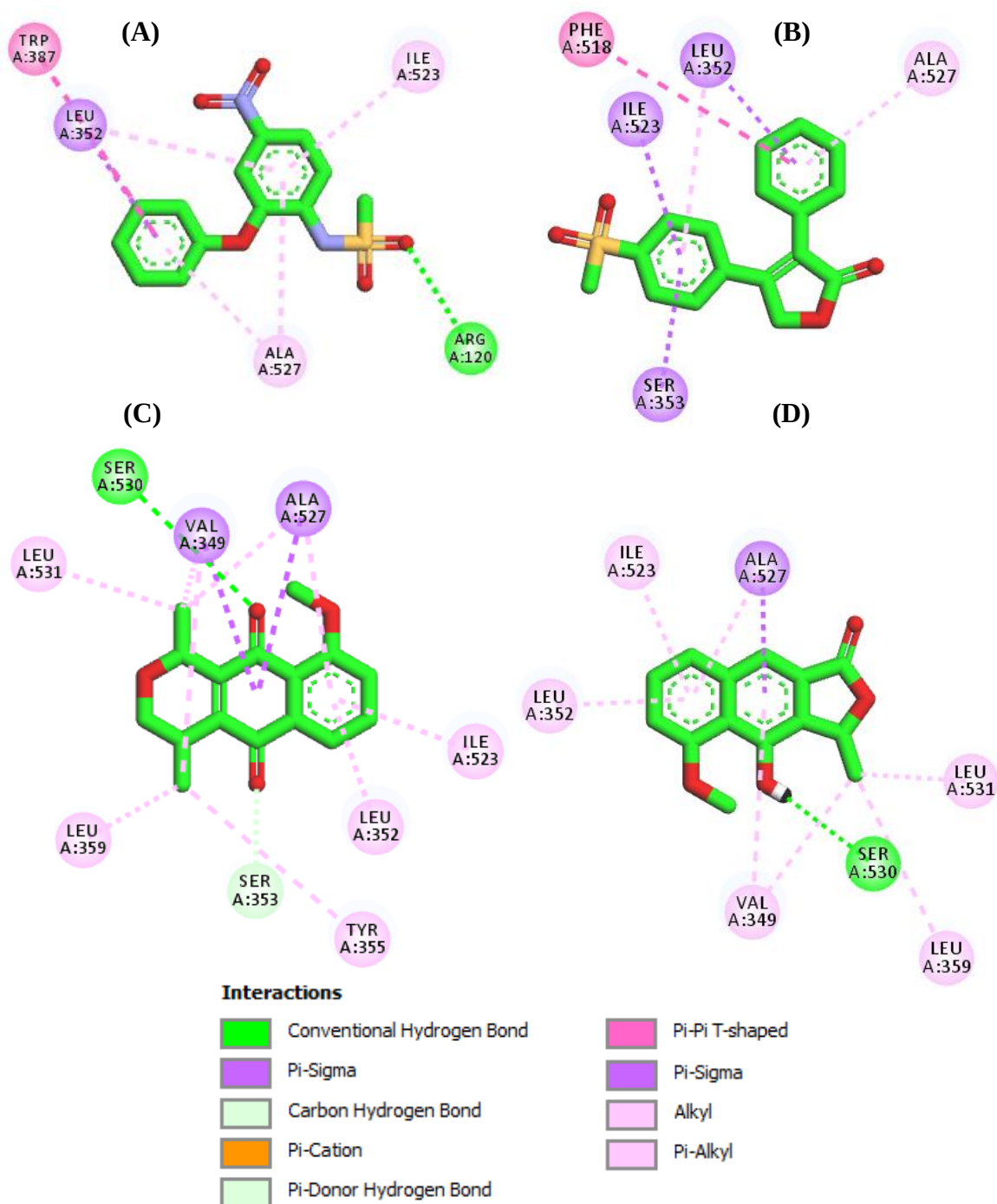
O inibidor mais bem avaliado em termos de afinidade de ligação foi o Eleuterol, no qual as interações foram semelhantes às observadas no controle NIM para os resíduos de aminoácidos de Arg120, Leu352, Ile523 e Ala527, e essas contribuições de interação corroboram os dados do literatura para classificação de potenciais constituintes ativos antiinflamatórios (SIDHU *et al.*, 2010; LEVITA *et al.*, 2017), conforme mostrado em tabela 3.

Tabela 3- Valores de afinidade de ligação de moléculas em COX-1 e COX-2.

Ligantes	Afinidade de ligação (kcal/mol)	
	COX-1	COX-2
RCX	-6.1	-10.00
NIM	-8.0	-8.2
CEL	-8.7	-11.5
IMN	-6.9	-7.0
Eleuterina	-5.9	-6.8
Eleuterol	-6.5	-7.4

Em geral, a estrutura quinóide condiciona uma alta reatividade química, e as quinonas e seus derivados são agentes fortemente oxidantes, nas reações redox são responsáveis e desempenham um papel importante como transportadores de elétrons. Interações com grupos de controle e moléculas de estudo podem ser vistas na **Figura 16**.

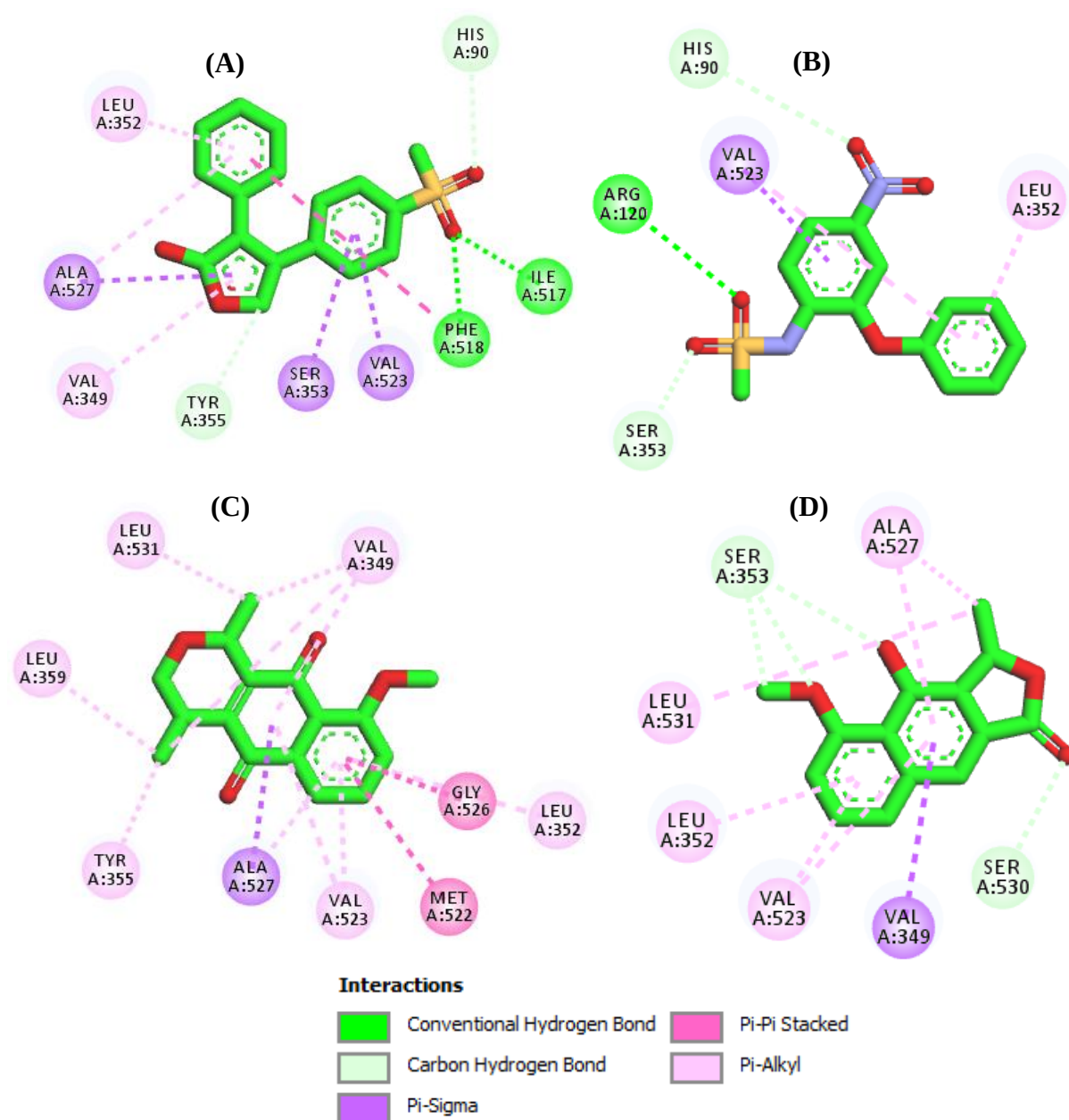
Figura 16: Interações de controles NIM (A) e RCX (B) e potenciais inibidores Eleuterina (C) e Eleuterol (D) com o sítio de ligação COX-1 (PDB ID 3N8X).



O Eleuterol possui afinidade de ligação de -6,5 Kcal/mol, com variação de $\pm 1,5$ Kcal/mol e $\pm 0,4$ Kcal/mol em relação ao NIM e RCX, respectivamente. As interações observadas nos ligantes são principalmente classificadas como hidrofóbicas em Leu352, Val349, Leu359, Ile523, Ala527 e Leu531 e uma ligação de hidrogênio Ser530.

O controle CEL apresentou melhor valor de afinidade de ligação no *Homo sapiens* organismo (5KIR), por já ser um medicamento com atividade anti-inflamatória comprovada e comercializada, porém, estudos alertam para efeitos de toxicidade (alerta de mutagenicidade) e efeitos colaterais adversos quando administrado por via oral como úlcera, efeitos extrapiramidais e cancerígeno (ARAUJO *et al.*, 2020; BORGES *et al.*, 2019). Eleuterol (**Figura 17**) apresentou valor de afinidade de ligação (-7,4 Kcal/mol), seguida da Eleuterina (-6,8 Kcal/mol) entre as moléculas avaliadas na COX-2, com variação de $\pm 2,6$ Kcal/mol e $\pm 0,4$

Figura 17: Interações de controles RCX (A), IMN (B) e potenciais inibidores Eleuterina (C) e Eleuterol (D) com sítio de ligação COX-2 (PDB ID 5KIR).



Eleuterol com energia livre de -7,4 Kcal/mol apresenta interação de categoria hidrofóbica (tipo pi-Alquila) com Leu352 e Val523; e outro hidrofóbico (pi-sigma) com Val349, sendo este último também semelhante no controle RCX. Eleuterina (-6,8 Kcal/mol) exibe uma interação (pi-sigma) com o resíduo de aminoácido Ala527 e interações do tipo hidrofóbica (alquil) com Tyr355, Val523 e Leu352. A conformação dos inibidores no sítio de ligação é influenciada pelas distâncias das interações com os resíduos de aminoácidos.

Esses dados de acoplamento molecular estão de acordo com aqueles relatados por Krishna et al., (2013) e Sidhu et al., (2010), em que resíduos de aminoácidos como His90, Arg120, Gln192, Val349, Leu352, Ser353, Tyr355, Leu359, Tyr385, Trp387, Arg513, Ala516, Phe518, Val523, Gly526, Ala527, Leu531 associados a uma cadeia de proteína COX-2 estão envolvidos na atividade de complementaridade proteína-ligante (KRISHNA *et al*, 2013).

Os estudos *in vivo* com ExtFH em zebrafish adultos tiveram resultados significativos em prevenir a formação de edema e em reverter o edema já instalado, assim, o estudo *in silico* corroborou com esses dados mostrando que o eleuterol, um princípio ativo da planta em estudo, apresentou duplo perfil de inibição da Ciclooxygenase 1 e 2 de forma que o ExtFH se destaca com alto potencial farmacológico, sendo necessários futuros testes para torná-lo um eficiente candidato a fármaco.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Diante do estudo foi possível notar que na composição do perfil fitoquímico de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb, os compostos majoritários são decorrentes de quinonas, especificamente classificados dentro das características das naftoquinonas, os quais foram caracterizados utilizando Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

A ExtrFH tem um grau aceitável de segurança para toxicidade aguda com base nas análises de alteração comportamental, mortalidade e histopatologia. Os resultados atribuem a propriedade de atividade anti-inflamatória à espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb, além disso, foi demonstrado que possui alto potencial farmacológico, pois apresentou ação anti-inflamatória significativa no *zebrafish* em todas as doses testadas. No primeiro método (M1) foi mostrado, pela primeira vez com esse modelo animal, que a ExtFH foi muito eficiente para prevenir a formação de edema. Além disso, no segundo método (M2) foi revelado que a ExtFH tem grande efeito em reverter o edema já instalado.

Com base em estudos de docking molecular, observou-se que a molécula de Eleuterol, derivada do metabolismo secundário de espécies vegetais, apresentou duplo perfil de inibição da Ciclooxygenase-1 e 2. As interações presentes nos sítios ativos são semelhantes aos grupos controle utilizados em simulações de acoplamento molecular. Assim, estudos farmacocinéticos e toxicológicos adicionais *in vitro* e *in vivo* precisam ser realizados para avaliar se as moléculas podem ter efeitos adversos mínimos, uma vez que os controles (RCX, NIM, IMN e CEL) apresentam estabilidade significativa e ação anti-inflamatória comprovada, no entanto, apresentam efeitos adversos quando administrados por via oral.

- ALMEIDA, O. P. Patologia Oral. Porto Alegre: **Artes Medicas**, 2016.
- ALVES, T. M., KLOOS, H., ZANI, C. L. Eleutherinone, a novel fungitoxic naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2003.
- AMELIA, T., PRATIWI, D., TJAHJONO, D.H. *In Silico* Study of The Component of *Eleutherine americana* MERR. on Human Estrogen Reseptor Alpha as Potential Anti-Breast Cancer. **Anais da 3ª Conferência Internacional sobre Computação para Ciência e Tecnologia**, 2015.
- ARAÚJO, P. H. F., RAMOS, R. S., DA CRUZ, J. N., SILVA, S. G., FERREIRA, E. F. B., DE LIMA, L. R., MACÊDO, W. J. C., ESPEJO-ROMÁN, J.M., CAMPOS, J. M., SANTOS, C. B. R. Identification of potential COX-2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases using molecular modeling approaches. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4183, 2020.
- BARMAN, R. P. A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. **Record of the Zoological Survey of India Occasional Papers**, v. 137, pp. 1–91, 1991.
- BARNES, E. C.; KUMAR, R.; DAVIS, R. A. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. **Natural Product Reports**, 2016.
- BORGES, R. S., KEITA, H., ORTIZ, B. L. S. et al. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L: *in vitro* and in zebrafish studies. **Inflammopharmacology**, v.26, p. 1057-1080, 2018.
- BORGES, R. S., PALHETA, I. C., OTA, S. S. B., MORAIS, R. B., BARROS, V. A., RAMOS, R. S., SILVA, R. C., COSTA, J. D. S., SILVA, C. H. T. P., CAMPOS, J. M., SANTOS, C. B. R. Toward of Safer Phenylbutazone Derivatives by Exploration of Toxicity Mechanism. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 143, 2019.
- BRASILEIRO, B. G., PIZZIOLO, V. R., RASLAN, D. S., JAMAL, C. M., SILVEIRA, D. Triagem das atividades antimicrobiana e citotóxica de algumas plantas medicinais brasileiras usadas na cidade de Governador Valadares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, pp. 195-202, 2006.
- BRUNETON, J. Farmacognosia, 2ª ed. Zaragoza: **Acribia**, 2001.
- CARR, S., VELASCO, A. L. Colon Diverticulitis. **StatPearls**, 2022.
- CARVALHO, A.M.R. Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (o-metil-n-2-hidroxibenzoil tiramina) em modelos experimentais 2011. **Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia**, Universidade Federal do Ceará-UFC, 2011.

CARVALHO, J. C. T., KEITA, H., SANTANA, G.R., DE SOUZA, G.C., DOS SANTOS, I.V.F., AMADO, J.R.R., KOUROUMA, A., PRADA, A.L., DE OLIVEIRA CARVALHO, H., SILVA, M.L. Effects of Bothrops alternatus venom in zebrafish: a histopathological study. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 273–284, 1 fev. 2018.

COELHO-DE-SOUZA, N. A., ALVES R. S., OLIVEIRA, H. D., VASCONCELOS, Y. A. G., SOUZA, P. J. C., NASCIMENTO, T. S., OLIVEIRA, K. A., DINIZ, L. R. L., PEREIRA J, G., CARDOSO J. H. L. The essential oil of Hyptis crenata Pohl ex Benth. presents an antiedematogenic effect in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2021.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins – Patologia Estrutural e Funcional, 6^a ed. (Trad. Barbosa, J. B.; De Vasconcelos, M. M.; Voeux, P. J.). Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000.

COUTINHO, M. A. S., MUZITANO, M. F., COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, pp. 241-256, 2009.

CHABOK, A., THORISSON, A., NIKBERG, M., SCHULTZ, J.K., SALLINEN, V. Changing Paradigms in the Management of Acute Uncomplicated Diverticulitis, **Scand J Surg**, 2021.

CRUZ, J. V., NETO, M. F. A., SILVA, L. B, DA S RAMOS R, DA S COSTA J, BRASIL D. S. B, LOBATO, C. C, DA COSTA G. V., BITTENCOURT, J. A. H. M, DA SILVA C. H. T. P., LEITE, F. H. A., SANTOS, C. B. R. Identification of Novel Protein Kinase Receptor Type 2 Inhibitors Using Pharmacophore and Structure-Based Virtual Screening. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 453, 2018.

DAMASCENO, R.G.L., GIL, A.D.S.B. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Iridaceae. **Rodriguesia** 67, 1373–1376, 2016.

DAMMSKI, A., MBR, P., GAYA, C. R. D. Zebrafish Manual de criação em Biotério. 1 ed. Pp. 02-105, 2011.

ETIENNE, R., DIAS VIEGAS, F.P., VIEGAS, C. Pathophysiological aspects of inflammation and drug design: An updated overview. **Revista Virtual de Química**, v.13, pp. 167–191, 2021.

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**, v. 21, n. 1, pp. 105–114, 2011.

FERNANDES, K., SANTOS, E., BATISTA, C., RIBEIRO, O., PIRACELLI, V., SOLCI, M.C., DUVOISIN, S., JR. MARTIN, S., SOUZA, R., MACHADO, C. WSOC and Its Relationship with BC, Levoglucosan and Transition Metals in the PM2.5 of an Urban Area in the Amazon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, pp. 570–581, 2002.

FERNANDES, R. A., CHAVAN, V. P., INGLE, A. B. A short enantioselective synthesis of (+)-eleutherin, (+)-allo-eleutherin and a formal synthesis of (+)-nocardione B. **Tetrahedron**

Letters, v. 49, pp. 6341-6343, 2008.

FERREIRA, A.M.; DE SOUZA, A.A.; KOGA, R.D.C.R.; SENA, I.D.S.; MATOS, M.D.J.S.; TOMAZI, R.; FERREIRA, I.M.; CARVALHO, J.C.T. Anti-Melanogenic Potential of Natural and Synthetic Substances: Application in *Zebrafish* Model. **Molecules**, v. 28, n. 1053, 2023.

FONSECA, P. O., DELLALIBERA-JOVILIANO, R. O Sistema das Cininas e a Resposta Inflamatória. **Revista InterSaúde**, v. 1, n. 3, pp. 112-128, 2020.

GALUCIO, N, C. R. 2014. Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de *Eleutherine plicata* Herb. **Dissertação para obtenção do Título de Mestre** em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará-UFPA, 2014.

GHENO, E. M., ROSEMBERG, D. B., SOUZA, D. O., CALABRÓ, L. Produção e impacto científico da utilização do *Zebrafish* como um modelo alternativo de pesquisa no Brasil. **X Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências (ENPEC)**, 2015.

HANH, P. T. B., THAO, D. T., NGA, N. T., PHUONG, N. T., HUNG, L. N., THIEN, D. T., LE MINH HA. Toxicity and Anti-inflammatory Activities of an Extract of the *Eleutherine bulbosa* Rhizome on Collagen Antibody-induced Arthritis in a Mouse Model. **Sage Journals**, v. 13, n. 7, pp. 883 – 886, 2018.

HARA, H., MARUYAMA, N., YAMASHITA, S., HAYASHI, Y., LEE, K. H., BASTOW, K. F., CHAIRUL, R. M., IMAKURA, Y. Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulb of *Eleutherine americana*. **Chemical Pharmacology Bulletin**, v. 45, pp. 1714-1716, 1997.

HOLANDA, F.H., RIBEIRO, A.N., SÁNCHEZ-ORTIZ, B.L., DE SOUZA, G.C., BORGES, S.F., FERREIRA, A.M., FLORENTINO, A.C., YOSHIOKA, S.A., MORAES, L.S., CARVALHO, J.C.T., FERREIRA, I.M., 2023. Anti-inflammatory potential of baicalein combined with silk fibroin protein in a zebrafish model (*Danio rerio*). **Biotechnology Letters**, v. 45, 235–253.

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

HOWE, K., CLARK, M., TORROJA, C. et al. The *zebrafish* reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, n. 496, pp. 498-503, 2013.

HUANG, S. Y., FENG, C.W., HUNG, H.C., CHAKRABORTY, C., CHEN, C.H., CHEN, W.F., JEAN, Y.H., WANG, H.M.D., SUNG, C.S., SUN, Y.M., WU, C.Y., LIU, W., HSIAO, C. DER, WEN, Z.H. A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., ASTER, J. C. Robbins e Cotran Patologia – Bases Patológicas das Doenças, 8ª ed. (Trad. Fernandes, P. D.). Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.

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

KRISHNA, P.S., VANI, K., PRASAD, M.R., SAMATHA, B., BINDU, N. S. V. S. S. L. H., CHARYA, M. A. S., SHETTY, P. R. Análise de acoplamento molecular *in silico* de prodigiosina e cicloprodigiosina como inibidores de COX-2. **SpringerPlus**, v. 2 , n. 172, 2013.

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. N 3, 2007.

LEÃO, R. P., CRUZ, J. V., DA COSTA, G. V., CRUZ, J. N., FERREIRA, E. F. B., SILVA, R. C., DE LIMA, L. R., BORGES, R. S., DOS SANTOS, G. B., SANTOS, C. B. R. Identification of New Rofecoxib-Based Cyclooxygenase-2 Inhibitors: A Bioinformatics Approach. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 209, 2020.

LEVITA, J., ROSITAMA, M. R., ALIAS, N., KHALIDA, N., SAPTARINI, N. M., MEGANTARA, S. Discovering COX-2 inhibitors from flavonoids and diterpenoids. **J Appl Pharm Sci** 7, 103–110, 2017.

LIN, J., PUCKREE, T., MVELASE, T. P. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. **Journal of Ethnopharmacology**, 2002.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil - Nativas e exóticas. 2 ed. São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudo da Flora LTDA**, 2008.

MACRAE, C., PETERSON, R. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, pp. 721–731, 2015.

MALHEIROS, L. C. S. Isoeleuterol e Isoeleuterina: Potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) e atividades microbiológica e antioxidante. **Dissertação para obtenção do Título de Mestre** em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará-UFPA, 2008.

MANJULA, K. K., BINDU R. NAIR. Isolation of isoeleutherol from microwave assisted methanol extract of *Eleutherine bulbosa* bulbs, its crystal structure elucidation and cytotoxicity evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1247, 2022.

OLIVEIRA, E. F., PAULA, H. C. B., PAULA, R. C. M. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. **Colloids Surf B Biointerfaces** 113:146–151, 2014.

PASCHE, M. S., LANZENDORF, F. N. Diferença entre peixes de água salgada e peixes de água doce. **Revista Maiêutica**, v. 5, n. 1, pp. 57-68, 2017.

PHAM, V. C., SHIN, J. S., CHOI, M. J., KIM, T. W., LEE, K., KIM, K. J., HUH, G., KIM, J., CHOO, D. J., LEE, K. T., YEOL LEE, J. Biological Evaluation and Molecular Docking Study of 3-(4-Sulfamoylphenyl)-4-phenyl-1H-pyrrole-2,5-dione as COX-2 Inhibitor. **Bull. Korean Chem. Soc**, vl. 33, n. 2, pp. 721-724, 2012.

PRATA, M. N. L., CHARLIE-SILVA, I., GOMES, J.M.M., BARRA, A., BERG, B.B., PAIVA, I.R., MELO, D.C., KLEIN, A., ROMERO, M.G.M.C., OLIVEIRA, C.C., PIMENTA, L.P.S., JÚNIOR, J.D.C., PEREZ, A.C. Anti-inflammatory and immune properties of the

peltatoside, isolated from the leaves of *Annona crassiflora* Mart., in a new experimental model zebrafish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 101, p. 234–243, 2020.

POLEKSIC, V., MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. pp. 339-352, 1994.

QUITIAN-USECHE, Y. F. Etanolamidas graxas de triglicerídeos de *Bertholletia excelsa* (Castanha do Brasil): avaliação da ação anti-inflamatória e toxicidade aguda em zebrafish (*Danio rerio*). **Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal do Amapá-UNIFAP, 2021.

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., 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**, v. 29, n. 5, p. 1519–1537, 2021.

RAMOS, R. DA S., COSTA, J. DA S., SILVA, R. C., DA COSTA, G. V., RODRIGUES, A. B. L., RABELO, É. DE M., SOUTO, R. N. P., TAFT, C. A., DA SILVA, C. H. T. DE P., ROSA, J. M. C., DOS SANTOS, C. B. R., MACÊDO, W. J. DA C. Identification of potential inhibitors from pyriproxyfen with insecticidal activity by virtual screening. **Pharmaceuticals**, 12, 2019.

RAMOS, R. S., MACÊDO, W. J. C., COSTA, J. S., DA SILVA, C. H. T. P., ROSA, J. M. C., DA CRUZ, J. N., DE OLIVEIRA, M. S., DE AGUIAR ANDRADE, E. H., E SILVA, R. B. L., SOUTO, R. N. P., SANTOS, C. B. R. Potential inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase and juvenile hormone with insecticidal activity: study of the binding mode via docking and molecular dynamics simulations. **J Biomol Estrutura Dyn** 38, 4687–4709, 2020.

RAMOS, R. S., BORGES, R. S., DE SOUZA, J. S. N., ARAUJO, I. F., CHAVES, M. H., SANTOS, C. B. R. Identification of Potential Antiviral Inhibitors from Hydroxychloroquine and 1, 2, 4, 5-Tetraoxanes Analogues and Investigation of the Mechanism of Action in SARS-CoV-2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1781, 2022.

REEVES, G., CHASE, M. W., GOLDBLATT, P., RUDALL, P., FAY, M. F., COX, A. V., LEJEUNE, B., SOUZA-CHIES, T. Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. **American Journal of Botany**, 88 (11), pp. 2074-2087, 2001.

RIBEIRO, C. M. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. **Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas**, Universidade Federal do Pará-UFPA, 2008.

SANT'ANNA, M. C. B. Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro. **Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular**, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS, 2009.

SANTANA, S. S. Síntese, caracterização, estudo eletroquímico e biológico de compostos contendo o esqueleto 1,4-naftoquinona. **Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial)**, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 2016.

SANTOS, K.L.B., CRUZ, J. N., SILVA, L. B., RAMOS, R. S., NETO, M. F. A., LOBATO, C. C., OTA, S. S. B., LEITE, F. H. A., BORGES, R. S., SILVA, C. H. T. P., CAMPOS, J. M., SANTOS, C. B. R. Identification of Novel Chemical Entities for Adenosine Receptor Type 2A Using Molecular Modeling Approaches. **Molecules**, v. 25, n. 5, 2020.

SÁ HYACIENTH, B. M., SÁNCHEZ-ORTIZ, B.L., PICANÇO, K.R.T., PEREIRA, A.C.M., DE SÁ HYACIENTH, D.C., DE SOUZA, G.C., RODRIGUES SARQUIS, R. DO S.F., ADUANGA, G.M.G., NAVARRETE, A., CARVALHO, J.C.T. Endopleura uchi (Huber) Cuatrec.: A medicinal plant for gynecological treatments – A reproductive toxicity assessment in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, 2020.

SEGNER, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, pp. 187-195, 2009.

SOUSA, E. T. Quinonas no ar atmosférico: Determinação, concentrações e correlações entre as fases vapor e particulada. **Tese para obtenção do Título de Doutor** em Química, Universidade Federal da Bahia-UFBA, 2012.

SOUZA, A. A., ORTÍZ, B.L.S., BORGES, S.F., PINTO, A.V.P., RAMOS, R. DA S., PENA, I.C., ROCHA KOGA, R. DE C., BATISTA, C.E., DE SOUZA, G.C., FERREIRA, A.M., DUVOISIN JUNIOR, S., CARVALHO, J.C.T. Acute Toxicity and Anti-Inflammatory Activity of *Trattinnickia rhoifolia* Willd (Scuruba) Using the Zebrafish Model. **Molecules**, v. 27, n. 22, 2022.

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*). **Journal of Nanomedicine Research**, v. 4, n. 4, 2016.

SOUZA, G. C., PEREIRA, A. C. M., VIANA, M. D., FERREIRA, A. M., SILVA, I. D. R., OLIVEIRA, M. M. R., BARBOSA, W. L. R., SILVA, L. B., FERREIRA, I. M., SANTOS, C. B. R., CARVALHO, J. C. T. *Acmella oleracea* (L) R. K. Jansen Reproductive Toxicity in Zebrafish: an *in vivo* and *in silico* assessment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, 2019.

SOUZA, G. C., SILVA, I. D. R. DA, VIANA, M. D., MELO, N. C. DE, SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L., OLIVEIRA, M. M. R. DE, 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**, v. 12, n. 4, 2019.

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** 49, 7069–7079, 2010.

SILVA, A. A., GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, pp. 994-1002, 2010.

SILVA, J. A. Obtenção e caracterização do extrato seco por aspersão de *Eleutherine plicata* Herb. **Dissertação para obtenção do Título de Mestre** em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará-UFPA, 2013.

SILVA, M. N., Ferreira, V.F., Cecília, M., De Souza, B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados, **Quim. Nova**, 2003.

SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews** 83(1):13-34, 2008.

STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D., SINGER, F. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, 1981.

TOMAZI, R., FIGUEIRA, Â. C., FERREIRA A. M., FERREIRA, D. Q., DE SOUZA G. C., DE SOUZA PINHEIRO, W. B., PINHEIRO NETO, J. R., DA SILVA, G. A., DE LIMA, H. B., DA SILVA HAGE-MELIM, L. I., PEREIRA, A. C. M., CARVALHO, J. C. T., DA SILVA DE ALMEIDA, S. S. M. Hypoglycemic Activity of Aqueous Extract of Latex from *Hancornia speciosa* Gomes: A Study in Zebrafish and *In Silico*. **Pharmaceuticals** (Basel), 2021.

TOWNSEND, C. M. Tratado de Cirurgia - A Base Biológica da Prática Cirúrgica Moderna. 20^a ed. Rio de Janeiro: **Grupo GEN**; 2019.

THI BICH HANH, P., THI THAO, D., THI NGA, N., THI PHUONG, N., NGOC HUNG, L., TRUONG THIEN, D., MINH HA, L. 18-Hoang Quoc Viet, Nghia Do, Cau Giay, Hanoi, Viet Nam d Pharmaceutical Chemistry Lab Project Vietnam Academy of Science and Technology. **Hoang Quoc Viet**, Nghia Do, 2018.

TURSI, A., SCARPIGNATO, C., STRATE, L. L., LANAS, A., KRUIS, W., LAHAT, A., DANESE, S. Colonic diverticular disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, 2020.

UENO, A. et al. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in ip-receptor-deficient mice. **Life Science**, v. 66, n. 12, pp.155-160, 2000.

VILLEGAS, L.F., FERNFINDEZ, I.D., MALDONADO, H., TORRES, R., ZAVALITA, A., VAISBERG, A.J., HAMMOND, G.B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peril. **Journal of Ethnopharmacology**, 1997.

WARNER, E., CRIGHTON, E. J., MOINEDDIN, R., MAMDANI, M., UPSHUR, R. Fourteen-year study of hospital admissions for diverticular disease in Ontario. **Can J Gastroenterol**, v. 21, pp. 97-99, 2007.

WENIGER, B., BERRURIER, H. M., ANTON, R. Plants of Haiti used as antifertility agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, pp. 67-84, 1982.

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 26 de dezembro de 2022, o parecer referente ao protocolo no. **022/2022** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA in vivo E CITOTOXICIDADE in vitro DO EXTRATO E COMPOSTOS ISOLADOS DO EXTRATO ETANÓLICO DA Eleutherine plicata Herb.**" coordenado por **Dionisia Pelaes Ferreira**, 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 on 26 December 2022, the final decision about the Protocol **022/2022** and certify that the research project entitled "**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA in vivo E CITOTOXICIDADE in vitro DO EXTRATO E COMPOSTOS ISOLADOS DO EXTRATO ETANÓLICO DA Eleutherine plicata Herb.**" coordinated by **Dionisia Pelaes Ferreira**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 26 de dezembro de 2022



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 – Artigo submetido

De: South African Journal of Botany <em@editorialmanager.com>
Date: jue, 28 sept 2023 a las 1:38
Subject: Confirming submission to South African Journal of Botany
To: Irlon Ferreira <irlon.ferreira@gmail.com>

This is an automated message.

Acute toxicity and anti-inflammatory activity of the ethanolic extract of *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb in zebrafish (*Danio rerio*)

Dear Professor Ferreira,

We have received the above referenced manuscript you submitted to South African Journal of Botany.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/sajb/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
South African Journal of Botany