



Toxicidade e efeitos anti-inflamatórios do extrato etanólico de *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb, em zebrafish (*Danio rerio*)

Dionisia P. Ferreira^{1,2}; Irlon M. Ferreira^{1,2}; Fabrício H. Holanda²; Swanny F. Borges²; Ryan da S. Ramos^{1,2}; Victoria Mae. T. Shinkai³; José Luiz M. do Nascimento³; Gisele C. de Souza⁴; José Carlos T. Carvalho⁴; Raphael S. Pimenta⁵

1 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Macapá, Amapá, Brasil;

2 Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Macapá, Amapá, Brasil;

3 Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil;

4 Laboratório de Pesquisa em Fármacos, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Macapá, Amapá, Brasil;

5 Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Brasil

dionisiafpelaes@gmail.com

Palavras-Chave: Plantas medicinais, Naftoquinonas, Inflamação.

Introdução

A espécie *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urb., pertencente à família Iridaceae e conhecida popularmente como marupazinho, é encontrada principalmente na região Norte do Brasil e amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, como diabetes, câncer de mama, derrame, hipertensão, hipercolesterolemia, úlceras, constipação, distúrbios menstruais e nefrolitíase (Lorenzi; Matos, 2008; K; Nair, 2022). Entre seus principais metabólitos bioativos destacam-se as naftoquinonas, compostos responsáveis por diversas atividades farmacológicas (Almeida, 2016; Damasceno; Gil, 2016).

Estudos químicos e farmacológicos demonstraram que o extrato bruto e compostos isolados de *E. bulbosa* apresentam atividade contra patógenos bacterianos e fúngicos, favorecem a cicatrização de feridas (Villegas *et al.*, 1997) e exibem atividade anticâncer em modelos de câncer de cólon, mama e leucemia (Amelia *et al.*, 2015; Lestari *et al.*, 2019). Entretanto, as evidências sobre seu potencial anti-inflamatório ainda são escassas, evidenciando a necessidade de estudos que ampliem o conhecimento sobre seus mecanismos de ação e aplicações terapêuticas (Thi Bich Hanh *et al.*, 2018).

O potencial biológico das naftoquinonas do gênero *Eleutherine* também foi demonstrado por Shinkai *et al.* (2022), que investigaram o mecanismo de ação da eleuterina, uma naftoquinona isolada de *Eleutherine plicata*, em células de glioma C6 de rato. Os autores observaram redução dose-dependente da proliferação celular, inibição da migração e da invasão, indução de apoptose, diminuição da fosforilação de AKT e redução da expressão da telomerase, resultados que reforçam o potencial farmacológico desses metabólitos e incentivam a investigação de outras atividades biológicas.



A inflamação constitui uma resposta biológica do organismo frente a danos teciduais e agentes nocivos, podendo ser classificada em aguda ou crônica (Almeida, 2016; Etienne *et al.*, 2021). Seus mediadores químicos são provenientes de duas vias principais: componentes celulares sintetizados ou liberados em resposta a estímulos e proteínas plasmáticas produzidas principalmente pelo fígado, incluindo os sistemas do Complemento, das Cininas e da Coagulação/Fibrinólise (Kain *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2010).

Para investigar esse processo, foi empregado o zebrafish (*Danio rerio*), modelo amplamente utilizado em estudos pré-clínicos devido à elevada homologia genética com humanos (cerca de 70%), facilidade de manutenção, baixo custo experimental, elevada fecundidade e rápida obtenção de resultados (Ghenot *et al.*, 2015; Holanda *et al.*, 2023). Como complemento às avaliações experimentais, o acoplamento molecular (*molecular docking*) constitui uma importante ferramenta computacional para prever a interação entre moléculas bioativas e alvos biológicos, contribuindo para a elucidação dos possíveis mecanismos de ação e reduzindo tempo e custos no desenvolvimento de novos fármacos (Ferreira *et al.*, 2015; Keita *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2022).

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda da fração hexânica do extrato etanólico de *Eleutherine bulbosa* (ExtFH) em zebrafish adultos, por meio da determinação da DL50, de avaliações comportamentais e histopatológicas e da investigação do potencial anti-inflamatório no modelo de edema abdominal induzido por carragenina, associado à análise *in silico* por acoplamento molecular para auxiliar na elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos.

Material e Métodos

Análise fitoquímica

Os bulbos de *Eleutherine bulbosa* foram coletados em Palmas (TO) e identificados pelo Complexo de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Tocantins (UNITINS). Após secagem e trituração, o extrato etanólico foi obtido por percolação e submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, obtendo-se a fração hexânica (ExtFH). A caracterização química da fração foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), com identificação dos constituintes por comparação dos espectros de massas com a biblioteca NIST (Malheiros, 2008).

Ensaios *in vivo*

Os ensaios foram conduzidos em zebrafish (*Danio rerio*) adultos, mantidos conforme as normas éticas para experimentação animal, aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá (Protocolo nº 022/2022). A toxicidade aguda da ExtFH foi avaliada por administração oral, seguida da determinação da DL50, monitoramento da mortalidade e observação de alterações comportamentais (Carvalho *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2019).



Dois métodos (M1 e M2) de indução de edema abdominal por carragenina foram usados em zebrafish para avaliar a atividade anti-inflamatória, no método 1 (M1), os grupos receberam os tratamentos 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 (Carvalho *et al.*, 2018; Coelho de Souza *et al.*, 2021).

A atividade anti-inflamatória foi investigada no modelo de edema abdominal induzido por carragenina (20 μ L, i.p), os animais foram distribuídos em grupos, controle negativo, controle positivo (indometacina - 10 mg/kg, v.o) e grupos tratados com diferentes doses da ExtFH (2,5, 5, 10, 20 mg/kg, v.o). A resposta inflamatória foi avaliada pela variação do peso corporal, percentual de inibição do edema e análise histopatológica de fígado, rins e intestino, com cálculo do Índice de Alterações Histopatológicas (IAH) (Borges *et al.*, 2018; Holanda *et al.*, 2023). Os dados foram analisados por análise probit e ANOVA one-way, seguida do teste de Tukey-Kramer, adotando-se nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$) (Souza *et al.*, 2019; Holanda *et al.*, 2023).

Docking molecular

Como abordagem complementar, foi realizado o acoplamento molecular entre as principais naftoquinonas da fração hexânica e as enzimas ciclooxygenases COX-1 e COX-2, utilizando estruturas do Protein Data Bank, para avaliar a afinidade de ligação e os possíveis mecanismos relacionados à atividade anti-inflamatória. Os protocolos foram validados por meio da análise do desvio quadrático médio (RMSD) entre as poses experimental e predita (Cruz *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2022).

Resultados e Discussão

Caracterização da fração hexânica

Na fração hexânica da *Eleutherine bulbosa* foram identificados eleuterina 272 m/z, $C_{16}H_{16}O_4$ e eleuterol 244 m/z, $C_{14}H_{12}O_4$ (Malheiros, 2008; Gallucio *et al.*, 2014). As naftoquinonas são compostos majoritários desta planta e induzem estresse oxidativo (Silva *et al.*, 2003).

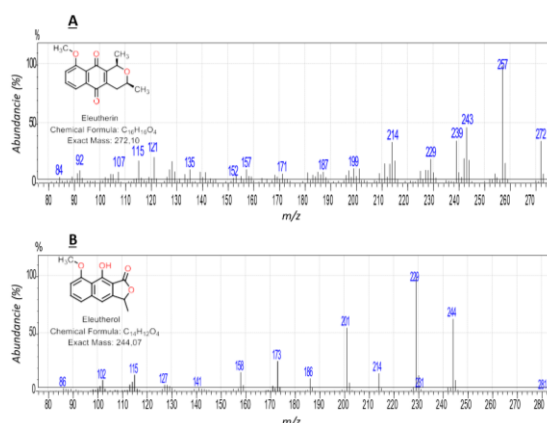


Fig. 1: Espectro de massa de eleuterina (A) e eleuterol (B).

Obtenção da dose letal média (DL50) e Análise comportamental e histopatológica

A ExtFH administrada oralmente teve DL50 de 346,74 mg/kg. Doses entre 250 e 400 mg/kg causaram óbitos nas quatro maiores, induzindo alterações comportamentais iniciais, como hiperatividade, perda de equilíbrio, hipomotilidade e repouso no fundo (Souza *et al.*, 2019).

As mudanças comportamentais demonstram que a ExtFH induziu poucas alterações em relação ao padrão normal quando observado em 48 h. 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 (Holanda *et al.*, 2023).

A histopatologia da toxicidade aguda mostrou poucas alterações no fígado ($< 4.75 \pm 0.95$) e rins ($< 7.50 \pm 2.38$) do zebrafish. O intestino apresentou IAH mais elevado nas doses de 250 mg/kg (17.5 ± 2.51), 350 mg/kg (14.75 ± 1.89) e 360 mg/kg ($12 \pm 1,15$), classificando as alterações como leves a moderadas.

O intestino do zebrafish é o órgão mais afetado em tratamentos orais (Hyacienth *et al.*, 2020; Tomazi *et al.*, 2021). Essas alterações são registradas por ser o primeiro órgão de contato com as substâncias testadas, 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 que separa as vilosidades da camada muscular (Holden, Layfield; Matthews, 2012; Souza *et al.*, 2019).

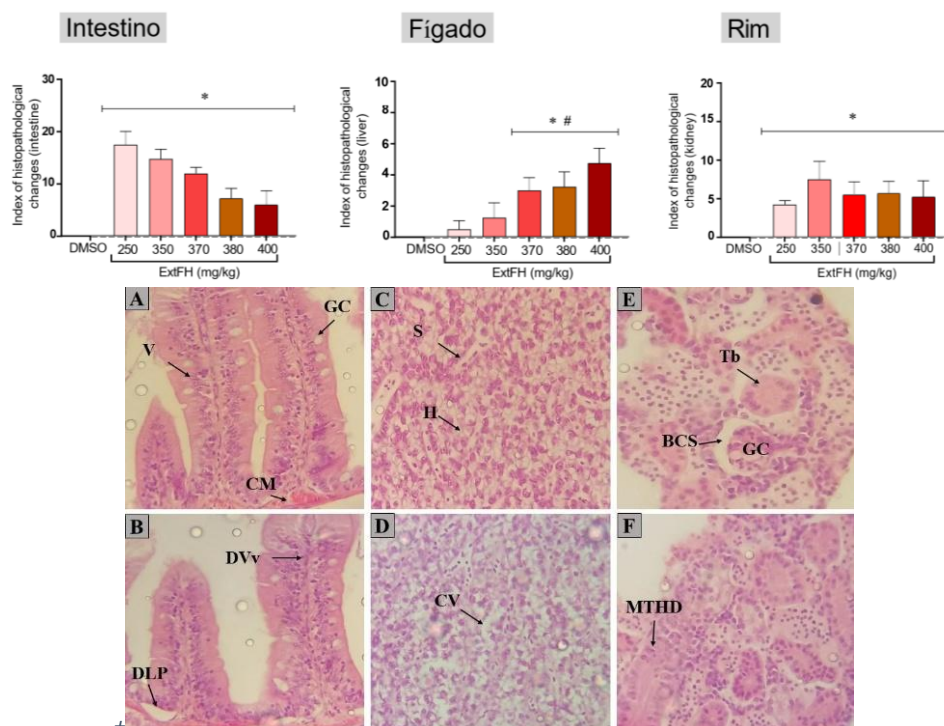


Fig. 2: Índice de alterações histopatológicas no intestino (A, B), fígado (C, D) e rins (E, F) em cada dose de ExtFH. **A:** observa-se as vilosidades (V), camada muscular (CM), células caliciformes (CG), **B:** destacamento da lâmina própria (DLP), dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DVv); **C:** observa-se tecido hepático, com hepatócitos normais (H), sinusóides (S), **D:** vacuolização citoplasmática (CV); em **E:** observa-se tecido renal com túbulos normais (Tb), espaço da capsula de Bowman (BCS), capilares do glomérulo (GC), **F:** degeneração hialina tubular leve (MTHD).

Ensaio de edema abdominal induzido por carragenina

No M1, a ExtFH (2,5, 5, 10 e 20 mg/kg) inibiu significativamente o edema com 66,2%, 57%, 46% e 31,5% no pico máximo, a indometacina (controle positivo) inibiu em 70,4%. A redução do edema abdominal pelo ExtFH ocorre através da inibição dos níveis de TNF- α e iNOS, citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela formação desse tipo de edema induzido por carragenina em zebrafish (Huang *et al.*, 2014).

No M2, a ExtFH também inibiu o edema em 62,4%, 51,6%, 49,1% e 60,3% para as doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg, o controle positivo (indometacina) inibiu em 69,4%. Os resultados foram consistentes com M1, com doses da ExtFH significativamente diferentes do controle negativo (CAR) ($p \leq 0,05$) e sem diferença da indometacina. A variação na dose de 20 mg/kg entre métodos sugere atividade anti-inflamatória da ExtFH via supressão de citocinas pró-inflamatórias (Thi Bich Hanh *et al.*, 2018).

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 eleuterinosídeos. Por outro lado, em ensaios *in vivo*, apresentou atividade anti-inflamatória, reduzindo sinais de artrite em modelo animal camundongo CAIA (Thi Bich Hanh *et al.*, 2018).

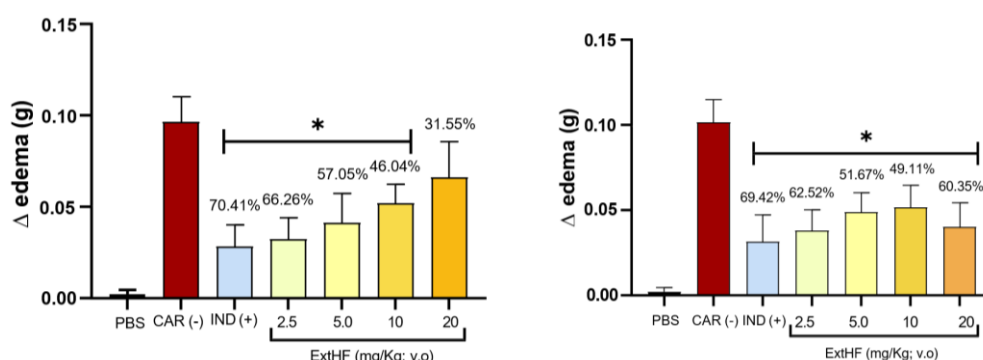


Fig. 3: (A) Efeito do ExtFH na formação de edema abdominal induzido por carragenina (M1); (B) Efeito do ExtFH na reversão do edema abdominal induzido por carragenina (M2).

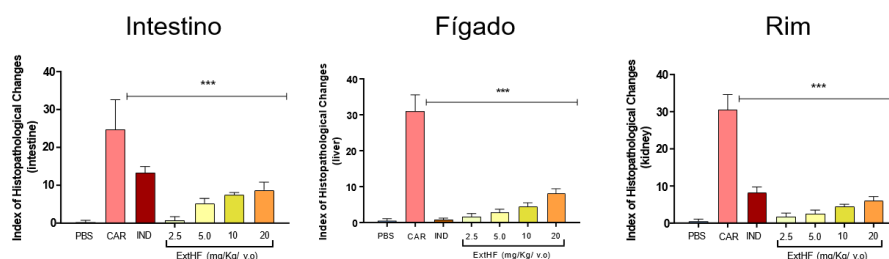
Análise Histopatológica da Inflamação

No intestino (M1), controles positivo e negativo tiveram IAH > 10, com deslocamento da lâmina própria e dilatação dos vasos. Grupos tratados com ExtFH apresentaram IAH < 10, indicando normalidade, com hipertrofia e vacuolização dos enterócitos. No fígado (M1), apenas o controle negativo (CARR+DMSO) teve IAH elevado. No rim (M1), o controle negativo (CARR+DMSO) apresentou o IAH mais alto (30.5 ± 4.12), com alterações moderadas a graves (Borges *et al.*, 2018).

No intestino (M2), controles positivo e negativo tiveram IAH > 10, com infiltração de leucócitos e linfócitos. Grupos tratados com ExtFH apresentaram IAH < 10. No fígado (M2), o controle negativo (CARR+DMSO) teve IAH elevado (31 ± 4.57), com vacuolização, degeneração e hiperemia. No rim (M2), o controle negativo (CARR+DMSO) apresentou o

IAH mais alto (32.5 ± 5.12), com alterações moderadas a graves. Grupos tratados com ExtFH não mostraram alterações funcionais (Carvalho *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2016).

Método 01



Método 02

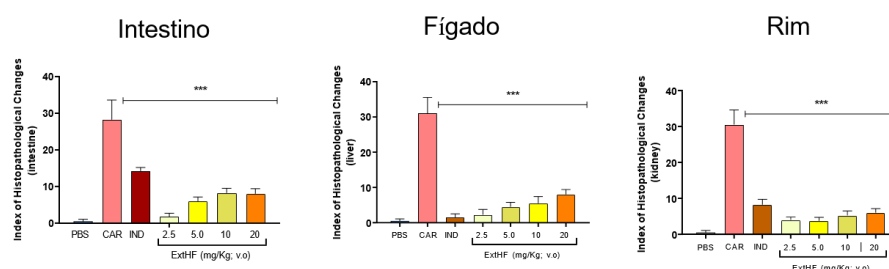


Fig. 4: Efeito da administração oral de solução salina e PBS (SS/PBS, 2 μ L), DMSO (2 μ L), Indometacina (10 mg/kg) e doses de 2,5; 5; 10 e 20 mg/kg de ExtFH sobre o IHA do intestino, fígado e rim em zebrafish com a aplicação de carragenana (20 μ g/animal).

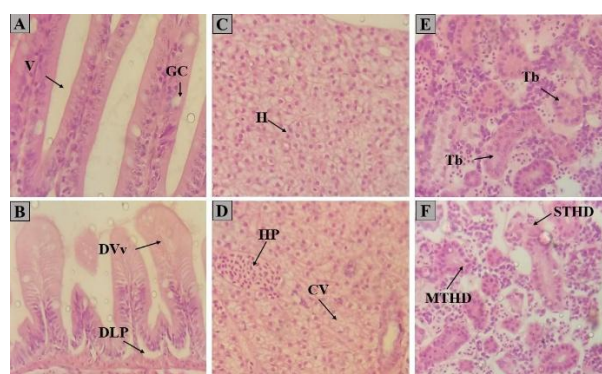


Fig. 5: Seção histológica do intestino (A, B), fígado (C, D) e rins (E, F) com as principais alterações histopatológicas registradas nos ensaios M1 e M2. **A, B:** temos tecido intestinal com vilosidades normais (V), células caliciformes (GC), destacamento da lâmina própria (DLP) e dilatação dos vasos presentes nas vilosidades (DVv). **C, D:** mostram tecido hepático com hepatócitos normais (H), hiperemia (HP) e vacuolização citoplasmática (CV). **E, F:** mostram tecido renal com túbulos normais (Tb), degeneração hialina tubular leve (MTHD) e degeneração hialina tubular severa (STHD).

Avaliação Comportamental do ensaio de inflamação

A ExtFH causou mudanças comportamentais leves (perda de equilíbrio, motilidade, repouso no fundo), mas os animais se recuperaram. Controles (PBS e DMSO) não tiveram alterações significativas, no M1 20% dos animais com 20 mg/kg de ExtFH repousaram no fundo na 5ª hora, no M2 não houve alterações comportamentais aparentes após a 2ª hora

(Huang *et al.*, 2014). Reações possivelmente 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).

Docking molecular de naftoquinonas em alvos inflamatórios

O docking molecular validou a interação de naftoquinonas com COX-1 e COX-2. Protocolos satisfatórios (RMSD de 0.893 e 1.109 Å para NIM e RCX, respectivamente; $\text{RMSD} \leq 2 \text{ Å}$) (Ramos *et al.*, 2022). NIM interage com Arg120, Leu352, Trp387, Ile523, Ala527 (ligações de hidrogênio e hidrofóbicas). RCX interage com Thr88-Tyr91, Val344-Leu352, Leu353-Asp362, Ala516-Gly519 (ligações de hidrogênio e hidrofóbicas) (Pham *et al.*, 2012).

Eleuterol teve a melhor afinidade de ligação, similar ao NIM para COX-1 (Arg120, Leu352, Ile523, Ala527), confirmando potencial anti-inflamatório (Sidhu *et al.*, 2010). A estrutura quinoide das naftoquinonas contribui para reatividade e transporte de elétrons. Eleuterol (-6.5 Kcal/mol para COX-1) e eleuterina (-6.8 Kcal/mol para COX-2) e eleuterol (-7.4 Kcal/mol para COX-2) superaram controles, embora o Celecoxib (CEL) tenha maior afinidade para COX-2, com alertas de toxicidade (Araujo *et al.*, 2020; Borges *et al.*, 2019). Interações do eleuterol com COX-2 incluem hidrofóbicas (Leu352, Val523, Val349). Eleuterina interage com Ala527, Tyr355, Val523, Leu352. Dados de docking molecular alinham-se à literatura sobre resíduos de aminoácidos na ligação proteína-ligante da COX-2 (Krishna *et al.*, 2013).

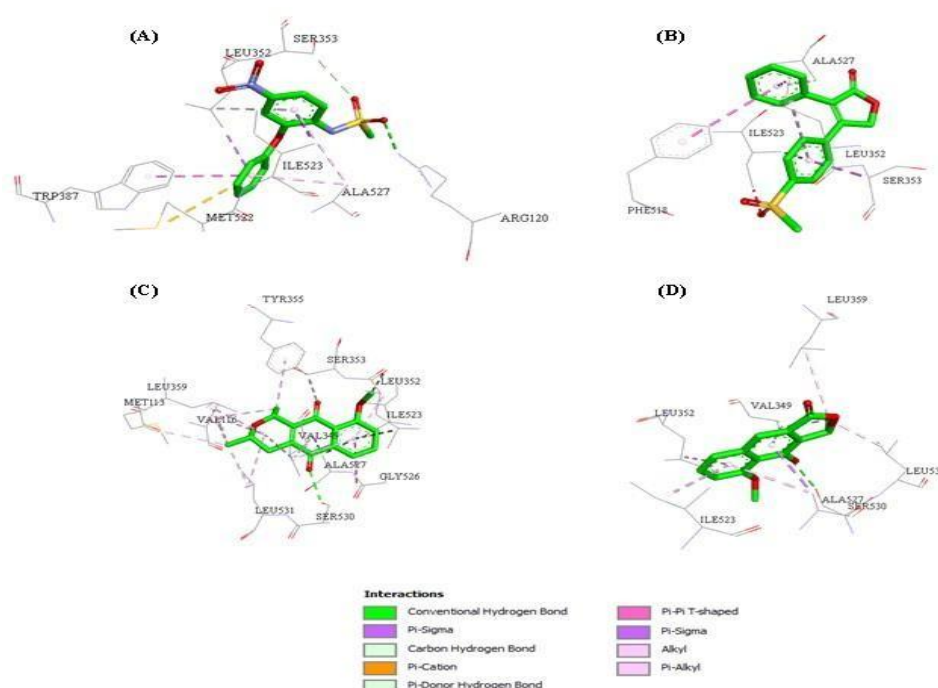


Fig. 6: Interações dos controles NIM (A) e RCX (B) e dos potenciais inibidores eleuterina (C) e eleuterol (D) com o sítio de ligação da COX-1 (ID PDB 3N8X).

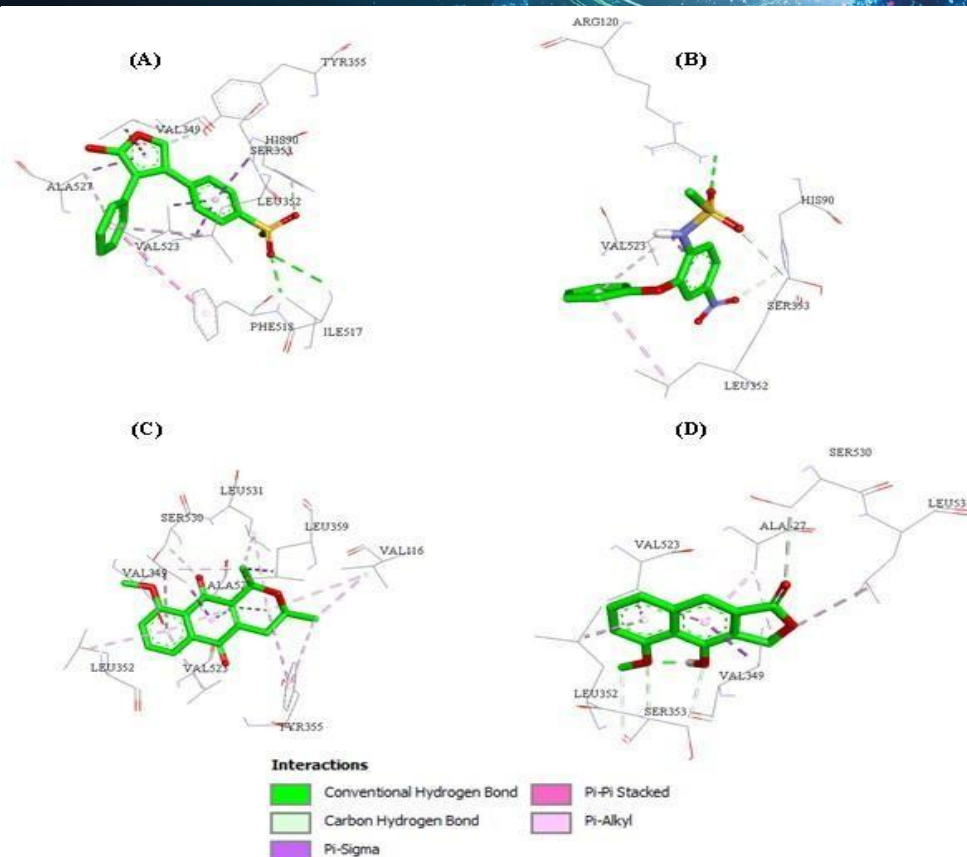


Fig. 7: Interações dos controles RCX (A), NIM (B) e dos potenciais inibidores eleuterina (C) e eleuterol (D) com o sítio de ligação da COX-2 (ID PDB 5KIR).

Conclusões

O estudo demonstrou que o perfil fitoquímico de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb é predominantemente composto por quinonas, classificadas como naftoquinonas. Por meio de cromatografia gasosa (GC-MS), os compostos eleuterol e eleuterina foram caracterizados. Com base na análise de alterações comportamentais e histopatológicas, o ExtFH apresentou um nível de segurança aceitável quanto à toxicidade aguda e os resultados evidenciaram o alto potencial farmacológico da espécie, que exibiu atividade anti-inflamatória significativa em peixes-zebra em todas as doses testadas.

Demonstrou atividade anti-inflamatória significativa em zebrafish, prevenindo (M1) e revertendo (M2) edema. Por meio de ensaios de docking molecular, observou-se que o eleuterol apresentou um perfil de dupla inibição das enzimas ciclooxigenase-1 e 2 (COX-1 e COX-2), com interações no sítio ativo semelhantes às dos grupos controles.

Em suma, estudos farmacocinéticos e toxicológicos adicionais são necessários para avaliar efeitos adversos das moléculas isoladas, considerando os riscos dos controles, assim, a abordagem integrativa envolvendo análises fitoquímicas, *in vivo* e *in silico* nesse estudo



confirmou a promissora atividade anti-inflamatória da planta. Estes dados inéditos estabelecem uma base sólida para futuras investigações nessa linha de pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem à *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá (FAPEAP)*; a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo apoio financeiro.

Referências

- ALMEIDA, O. P. Patologia Oral. Porto Alegre: **Artes Medicas**, 2016.
- AMELIA, T.; PRATIWI, D.; TIAHJONO, D.H. *In silico* study of the component of *Eleutherine americana* MERR. on human estrogen receptor alpha as potential anti-breast cancer. **Int. Conf. Comput. Sci. Technol.**, 2015, 1-9.
- 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.
- BORGES, R.S.; KEITA, H.; ORTIZ, B.L.S.; DOS SANTOS SAMPAIO, T.I.; FERREIRA, I.M.; LIMA, E.S.; DE JESUS AMAZONAS DA SILVA, M.; FERNANDES, C.P.; DE FARIA MOTA OLIVEIRA, A.E.M.; DA CONCEIÇÃO, E.C.; RODRIGUES, A.B.L.; FILHO, A.C.M.P.; CASTRO, A.N.; CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: *in vitro* and in zebrafish studies. **Inflammopharmacology**, 2018, 26(4), 1057-1080.
- 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.
- CARVALHO, J.C.T.; KEITA, H.; SANTANA, G.R.; SOUZA, G.C.; DOS SANTOS, I.V.F.; AMADO, J.R.R.; KOUROUMA, A.; PRADA, A.L.; OLIVEIRA CARVALHO, H.; SILVA, M.L. Effects of *Bothrops alternatus* venom in zebrafish: A histopathological study. **Inflammopharmacology**, 2018, 26(1), 273-284.
- COELHO-DE-SOUZA, A.N.; ALVES-SOARES, R.; OLIVEIRA, H.D.; GOMES-VASCONCELOS, Y.A.; SOUZA, P.J.C.; SANTOS-NASCIMENTO, T.; OLIVEIRA, K.A.; DINIZ, L.R.L.; GUIMARÃES-PEREIRA, J.; LEAL-CARDOSO, J.H. The essential oil of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. presents an antiedematogenic effect in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 2021, 54(3), e9422.
- 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.S.B. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Iridaceae. **Rodriguésia**, 2016, 67(5spe), 1373- 1376.

ETIENNE, R.; PEREIRA, D. V. F.; VIEGAS, C. Pathophysiological aspects of inflammation and drug design: An updated overview. **Revista Virtual de Química**, 2021, 13(1), 167-191.

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 Cheminal Society**, v. 33, pp. 570–581, 2002.

FERREIRA, L.; DOS SANTOS, R.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, 2015, 20(7), 13384-13421.

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.

HOLANDA, F.H.; RIBEIRO, A.N.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B.L.; 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. Anti-inflammatory potential of baicalein combined with silk fibroin protein in a zebrafish model (*Danio rerio*). **Biotechnol. Lett.**, 2023, 45(2), 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.

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.D.; WEN, Z.H. A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. **PLoS One**, 2014, 9(8), e104414.

HYACIENTH, B.M.S.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B.L.; PICANÇO, K.R.T.; PEREIRA, A.C.M.; HYACIENTH, D.C.S.; DE SOUZA, G.C.; RODRIGUES SARQUIS, R.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*). **J. Ethnopharmacol.**, 2020, 250, 112457.

KAIN, V.; PRABHU, S.D.; HALADE, G.V. Inflammation revisited: Inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. **Basic Res. Cardiol.**, 2014, 109(6), 444.



KEITA, H.; DOS SANTOS, C.B.R.; RAMOS, M.M.; PADILHA, E.C.; SERAFIM, R.B.; CASTRO, A.N.; AMADO, J.R.R.; DA SILVA, G.M.; FERREIRA, I.M.; GIULIATTI, S.; CARVALHO, J.C.T. Assessment of the hypoglycemic effect of Bixin in alloxan-induced diabetic rats: *in vivo* and *in silico* studies. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, 2021, 39(3), 1017- 1028.

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.

KRISHNA, P.S.; VANI, K.; PRASAD, M.R.; SAMATHA, B.; BINDU, N.S.V.S.S.; CHARYA, M.A.S.; REDDY SHETTY, P. *In –silico* molecular docking analysis of prodigiosin and cycloprodigiosin as COX-2 inhibitors. **Springerplus**, 2013, 2(1), 172.

K, M.K.; NAIR, B.R. Isolation of isoeleutherol from microwave assisted methanol extract of *Eleutherine bulbosa* bulbs, its crystal structure elucidation and cytotoxicity evaluation. **J. Mol. Struct.**, 2022, 1247, 131376.

LESTARI, D.; KARTIKA, R.; MARLIANA, E. Antioxidant and anticancer activity of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb on leukemia cells L₁₂₁₀. **J. Phys. Conf. Ser.**, 2019, 1277(1), 012022.

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.

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.

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-1*H*-pyrrole-2,5-dione as COX-2 Inhibitor. **Bull. Korean Chem. Soc**, vl. 33, n. 2, pp. 721-724, 2012

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

SHINKAI, V.M.T.; SAMPAIO, I.M.O.; SANTOS, E.G; GALUÉ-PARRA, A.J.; FERREIRA, D.P.; BALIZA, D.D.M.S.; RAMOS, N.F.; PIMENTA, R.S.; BURBANO, R.M.R.; SENA, C.B.C.; MACCHI, B.M.; FERREIRA, I.M.; SILVA, E.O.; DO NASCIMENTO, J.L.M. *In vitro* cytotoxic effects and mechanisms of action of eleutherine isolated from *Eleutherine plicata* bulb in rat glioma C6 cells. **Molecules**, 2022, 27(24), 8850.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V.F.; CECÍLIA, M.; SOUZA, B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados, **Quim. Nova**, 2003.



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**, 2010, 49(33), 7069-7079.

SOUZA, G. C.; SILVA, I. D. R.; VIANA, M. D.; MELO, N. C.; SÁNCHEZ-ORTIZ, B. L.; OLIVEIRA, M. M. R.; BARBOSA, W. R.; FERREIRA, I. M.; CARVALHO, J. C. T. Acute toxicity of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* L. in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and histopathological studies. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 4, 2019.

SOUZA, A.A.; ORTÍZ, B.L.S.; BORGES, S.F.; PINTO, A.V.P.; RAMOS, R.S.; PENA, I.C.; KOGA, R.C.; BATISTA, C.E.; SOUZA, G.C.; FERREIRA, A.M.; JUNIOR, S.; CARVALHO, J.C. Acute toxicity and anti-inflammatory activity of *Trattinnickia rhoifolia* willd (sucuruba) using the zebrafish Model. **Molecules**, 2022, 27(22), 7741.

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.

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 ProjectVietnam Academy of Science and Technology. **Hoang Quoc Viet, Nghia Do**, 2018.

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.

VILLEGAS, L.F.; FERNÁNDEZ, I.D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALA, A.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. **J. Ethnopharmacol.**, 1997, 55(3), 193-200.