



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM E SAÚDE

JOSÉ CALADO QUILENDIA

TAXIFOLINA, UM FLAVONÓIDE DE PLANTAS MEDICINAIS, COM POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELOS *in vivo* e *in silico*

JEQUIÉ-BA

2026

JOSÉ CALADO QUILENDÁ

**TAXIFOLINA, UM FLAVONÓIDE DE PLANTAS MEDICINAIS, COM POTENCIAL
ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELOS *in vivo* e *in silico***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem e Saúde da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, área de concentração em Saúde Pública, para apreciação e julgamento da Banca Examinadora.

Linha de pesquisa: Cuidado Humano e Educação em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Wagner Rodrigues de A. Soares

JEQUIÉ-BA

2026

“Aos meus pais, *José Quilenda e Maria Emília de Almeida Calado Quilenda*, por serem minha base, minha inspiração e minha força. Esta conquista é tão minha quanto de vocês”

Agradecimentos

A Deus, pela dádiva da vida, pela força nos momentos desafiadores e pela luz que sempre me guiou no caminho.

Aos meus pais, José Quilenda e Maria Emília de Almeida Calado Quilenda, pelo amor incondicional, pelos valores transmitidos e pelo apoio constante ao longo desta caminhada.

Às minhas irmãs, Mirian Calado Quilenda, Edna Calado Quilenda e Maria Inês Calado Quilenda, por cada gesto de carinho, pelas palavras de incentivo e pela presença firme em minha vida.

À minha noiva, Maria Alice Bernardo Simão, meu alicerce emocional, por acreditar nos meus sonhos, caminhar ao meu lado e oferecer sempre amor e paciência.

Ao meu melhor amigo, Edwine Luís Coco dos Santos, pela amizade leal, pelas palavras certeiras nos momentos necessários e pela companhia, mesmo à distância.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wagner Rodrigues de Assis Soares, pela orientação competente, pelos ensinamentos compartilhados e pela dedicação à minha formação acadêmica.

Aos colegas do mestrado, pela parceria, pela troca de conhecimentos e pelo apoio mútuo que tornaram a trajetória mais leve e enriquecedora.

Aos professores, pela inspiração, pelo compromisso com o ensino e pelas contribuições essenciais à minha formação intelectual e profissional.

Ao Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), aos integrantes do Grupo de Pesquisa Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos da UNIFOR e aos membros do Grupo de Estudos NutriFisher (GENFISH), do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde (PPGNS) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), pelo acolhimento e pelas contribuições à pesquisa.

À UNIFOR (Edital FEQ 50/2021) e à FUNCAP (PS1-00186-00240.01.00/21; UNI-0210-00160.01.00/23; FPD-0213-00140.01.00/23), pelo apoio financeiro concedido à Profa. Dra. Adriana Rolim Campos (UNIFOR) e ao Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães (UECE-BIOREN-CECITEC/GENFISH-PPGNS), fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos vocês, registro minha mais sincera e profunda gratidão.

A ciência é feita de dados, como uma casa é feita de tijolos; mas um amontoado de dados não é ciência, assim como um monte de tijolos não é uma casa.

Henri Poincaré

RESUMO

A dor e a inflamação constituem processos biológicos centrais para a homeostase, porém, quando persistentes, podem se associar a limitação funcional e impacto clínico relevante. Nesse contexto, a taxifolina (di-hidroquercetina), um flavanonol de ocorrência natural, tem sido investigada como candidata com potencial farmacológico *multitarget*. O estudo teve como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da taxifolina por meio de estratégias *in silico* zebrafish (*Danio rerio*) adulto e *in silico* (triagem virtual/*docking* e predição ADMET). No eixo *in silico*, foram conduzidos triagem virtual e *docking* com o AutoDock Vina, utilizando alvos moleculares associados à nocicepção e inflamação (TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, receptor NMDA e COX-2), com geração de nove poses por complexo, seleção por energia/posicionamento e análise estrutural em PyMOL e Discovery Studio; o perfil farmacocinético/toxicológico foi estimado por DataWarrior e pkCSM. Adicionalmente, foi realizada uma triagem comparativa envolvendo AINEs e a taxifolina frente às ciclooxigenases (COX-1/COX-2). No eixo *in vivo*, zebrafish adultos foram pré-tratados por via oral com taxifolina (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) e avaliados em modelos de nocicepção induzida por formalina (TRPA1), salina hipertônica corneal (TRPV1), e mentol (TRPM8), além de modelo com LPS; o envolvimento mecanístico foi testado com antagonistas seletivos (capsazepina, HC-030031, ketamina e AMTB), com quantificação comportamental por atividade locomotora/cruzamentos de linha. A taxifolina apresentou segurança inicial no modelo, sem mortalidade até 1,0 mg/mL e com CL₅₀ estimada acima da faixa testada, além de não alterar a atividade locomotora em condições basais. Observou-se efeito antinociceptivo em diferentes modelos: no teste da formalina, houve inibição na fase neurogênica em todas as concentrações e efeito na fase inflamatória principalmente na maior dose. Na nocicepção corneal por salina hipertônica, o efeito foi compatível com participação de TRPV1, uma vez que a capsazepina preveniu a resposta. No modelo por LPS, verificou-se inibição do comportamento nociceptivo, com prevenção pelo antagonista TRPA1 (HC-030031). A taxifolina também reduziu a nocicepção induzida por glutamato, e a ketamina preveniu seu efeito, sugerindo participação do receptor NMDA. No modelo com mentol, a resposta foi prevenida por AMTB, indicando envolvimento de TRPM8. Na abordagem *in silico* para COX, a taxifolina demonstrou afinidades de ligação competitivas frente a COX-1 e COX-2 em comparação com fármacos de referência, com perfil ADMET descrito como favorável no estudo. Em conjunto, os achados sustentam que a taxifolina apresenta um perfil antinociceptivo e anti-inflamatório em zebrafish adulto, com evidências de ação multimodal envolvendo TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA, além de suporte por análises *in silico* em alvos relacionados à inflamação.

Palavras-chave: Taxifolina; Flavonoides; Dor; Inflamação; Zebrafish; *In silico*; *In vivo*.

ABSTRACT

Pain and inflammation are central biological processes for homeostasis; however, when persistent, they may be associated with functional limitation and clinically significant impact. In this context, taxifolin (dihydroquercetin), a naturally occurring flavanone, has been investigated as a candidate with *multitarget* pharmacological potential. This study aimed to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activity of taxifolin using *in vivo* (adult zebrafish) and *in silico* (virtual screening/molecular docking and ADMET prediction) approaches. In the *in silico* arm, virtual screening and molecular docking were performed with AutoDock Vina, targeting molecular components related to nociception and inflammation (TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, the NMDA receptor, and COX-2). For each complex, nine poses were generated, followed by selection based on binding energy and pose geometry, and structural inspection using PyMOL and Discovery Studio. Pharmacokinetic/toxicological properties were predicted using DataWarrior and pkCSM. In addition, a comparative screening was conducted including NSAIDs and taxifolin against cyclooxygenases (COX-1/COX-2). In the *in vivo* arm, adult zebrafish were orally pretreated with taxifolin (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) and evaluated in nociception models induced by formalin (TRPA1), hypertonic corneal saline (TRPV1), menthol (TRPM8), as well as in an LPS-based model. Mechanistic involvement was assessed using selective antagonists (capsazepine, HC-030031, ketamine, and AMTB), with behavioral quantification based on locomotor activity/line-crossing measures. Taxifolin showed an initial safety profile in this model, with no mortality up to 1.0 mg/mL and an estimated LC₅₀ above the tested range, and it did not alter baseline locomotor activity. Antinociceptive effects were observed across different paradigms: in the formalin test, inhibition occurred in the neurogenic phase at all concentrations, with effects in the inflammatory phase mainly at the highest dose. In hypertonic corneal saline-evoked nociception, the effect was consistent with TRPV1 involvement, as capsazepine prevented the response. In the LPS model, nociceptive behavior was inhibited and this effect was prevented by the TRPA1 antagonist HC-030031. Taxifolin also reduced glutamate-induced nociception, and ketamine prevented its effect, suggesting NMDA receptor involvement. In the menthol model, the response was prevented by AMTB, indicating TRPM8 involvement. In the COX-focused *in silico* assessment, taxifolin exhibited competitive binding affinities toward COX-1 and COX-2 compared with reference drugs, with an ADMET profile described as favorable in this study. Taken together, these findings support that taxifolin displays an antinociceptive and anti-inflammatory profile in adult zebrafish, with evidence of multimodal action involving TRPV1, TRPA1, TRPM8, and NMDA, further supported by *in silico* analyses targeting inflammation-related pathways.

Keywords: Taxifolin; Flavonoids; Pain; Inflammation; Zebrafish; *In silico*; *In vivo*.

Lista de figuras

Figura 1: Os princípios éticos dos 10 Rs para utilizar o zebrafish como um sistema modelo em pesquisa.	22
Figura 2: Estrutura química dos diferentes tipos de flavonoides.	27
Figura 3: Plantas contendo Taxifolina.....	29
Figura 4: Estrutura química da taxifolina.....	30
Figura 5: Fluxograma do protocolo <i>in silico</i>	33

Lista de Abreviaturas

ADMET-Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade.

AINEs- Anti-inflamatórios não esteroides.

ANOVA- Análise de variância.

ASIC- *Acid-sensing ion channel* (canal iônico sensível a ácido).

CL₅₀ - Concentração letal 50%.

COX-1-Ciclooxigenase 1.

COX-2-Ciclooxigenase 2.

DMSO-Dimetilsulfóxido.

E.P.M.- Erro padrão da média.

GENFISH- Grupo de Estudos NutriFisher.

HC-030031 (HC)-Antagonista de TRPA1.

i.m. -Intramuscular.

i.p.-Intraperitoneal.

IL-6 -Interleucina 6.

LPS -Lipopolissacarídeo.

NMDA-*N-methyl-D-aspartate* (receptor NMDA).

NUBEX- Núcleo de Biologia Experimental.

PPGNS-Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde.

TRP-Receptor de Potencial Transitório (*Transient Receptor Potential*).

TRPA1-Receptor de Potencial Transitório Anquirina do tipo 1.

TRPM8-Canal iônico TRPM8.

TRPV1-Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1.

UECE-Universidade Estadual do Ceará.

UNIFOR-Universidade de Fortaleza.

v.o.-Via oral.

ZFa-Zebrafish adulto.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Justificativa.....	14
1.2	Hipóteses	15
1.3	Questão de Pesquisa	15
1.4	OBJETIVOS.....	15
1.4.1	Objetivo Geral	15
1.4.2	Objetivos Específicos	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Dor Inflamatória	18
2.2	Receptores TRPs e enzimas envolvidas	18
2.2.1	Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1 (TRPV1)	19
2.2.2	Receptor de Potencial Transitório Anquirina do tipo 1 (TRPA1).....	20
2.2.3	Cicloxiogenase-1 e Cicloxiogenase-2	21
2.3	Modelos experimentais de dor e inflamação	22
2.4	Zebrafish como modelo experimental	23
2.5	Aplicações farmacológicas e estudos de dor e inflamação.....	24
2.6	Abordagens atuais para o tratamento da dor e inflamação	25
2.7	Produtos naturais com potencial antinociceptivo e anti-inflamatório	26
2.8	Flavonoides e potencial antinociceptivo.....	26
2.9	Flavonoides e potencial anti-inflamatório	27
2.10	Fontes naturais do Taxifolina.....	28
2.11	Taxifolina e seu potencial farmacológico	29
2.12	Triagem virtual de compostos naturais.....	30
2.12.1	Triagem Baseada no Ligante	31
2.12.2	Triagem Baseada no Receptor	31
2.13	Avaliação de propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Experimentos <i>in silico</i>	33
3.1.1	Pesquisa em bases de dados	33
3.1.2	Triagem virtual, acoplamento molecular e ferramentas ADMET	34
3.2	Experimentos <i>in vivo</i>	35
3.2.1	Amostra	35
3.2.2	Zebrafish.....	35

3.2.3	Protocolo geral.....	35
3.2.4	Toxicidade aguda 96h.....	35
3.2.5	Teste de Campo Aberto.....	36
3.2.6	Atividade antinociceptiva comportamental	36
3.2.7	Comportamento nociceptivo induzido por formalina.....	36
3.2.8	Comportamento nociceptivo corneal induzido por salina hipertônica	37
3.2.10	Comportamento nociceptivo induzido por glutamato	38
3.2.11	Comportamento nociceptivo induzido por mentol	38
3.2.12	Atividade anti-inflamatória.....	38
3.2.13	Análise estatística	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Artigo 1	41
4.2	Artigo 2.....	66
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98

1 INTRODUÇÃO

A dor e a inflamação são respostas fisiológicas essenciais que sinalizam danos ao organismo e ativam mecanismos de reparo tecidual. No entanto, quando persistem ou se tornam desreguladas, deixam de exercer papel protetor e passam a gerar sofrimento e limitação funcional. Estima-se que mais de 1,5 bilhão de pessoas em todo o mundo vivam com dor crônica, frequentemente associada a doenças inflamatórias (Mili *et al.*, 2024; Kaur e Kaushik, 2024).

Os tratamentos farmacológicos convencionais, como anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), corticosteroides e opioides, apresentam eficácia comprovada, mas o uso prolongado desses medicamentos pode resultar em efeitos adversos graves, incluindo úlceras gástricas, lesão hepática, tolerância farmacológica e dependência (Prata *et al.*, 2020). Essas limitações têm impulsionado a busca por alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes, destacando-se moléculas de origem natural, especialmente os flavonoides, que demonstram marcada atividade anti-inflamatória e ação antioxidante (Zhang *et al.*, 2022).

A Taxifolina, também conhecida como di-hidroquercetina, é um flavanonol presente em diversas espécies vegetais. Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a taxifolina pode modular processos inflamatórios por meio da inibição da COX-2, da redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, e da diminuição do estresse oxidativo celular, esses efeitos indicam uma dupla atuação, anti-inflamatória e antioxidante, particularmente relevante no contexto da dor crônica, em que múltiplas vias fisiopatológicas estão envolvidas. (Prata *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

A compreensão dos mecanismos moleculares da dor, como a ativação dos canais TRP e a indução da COX-2, é crucial para investigar o potencial terapêutico de compostos como a taxifolina. Canais TRP, como TRPV1 e TRPA1, detectam estímulos nocivos e modulam a transmissão sensorial em níveis periféricos e centrais (Behrendt, 2019; Iftinca, 2020). Simultaneamente, a COX-2 intensifica a nocicepção por meio da produção de prostaglandinas, promovendo sensibilização periférica e central (Shi, Lindholm e Sarna, 2013). A integração desses mecanismos oferece um panorama fisiopatológico que sustenta o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas e seguras.

Modelos experimentais alternativos, como o Zebrafish (*Danio rerio*), têm se consolidado como ferramentas valiosas para o estudo de compostos bioativos com potencial antinociceptivo e anti-inflamatório. Essa espécie apresenta rápido desenvolvimento embrionário, baixo custo de manutenção, corpo transparente que permite a observação celular direta e similaridade genética com humanos (Prata *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022). Estudos demonstraram que o Zebrafish responde a analgésicos clássicos, como morfina e AINEs, de forma dose-dependente, indicando a presença de circuitos nociceptivos funcionais. (Koga *et al.*, 2023). Outrossim, protocolos validados permitem avaliar tanto a eficácia quanto a toxicidade de compostos naturais, tornando o modelo adequado para triagem de flavonóides como a taxifolina, com relevância translacional e respeito aos princípios éticos de redução e substituição de animais (Koga *et al.*, 2023).

Apesar do crescente interesse em flavonóides com potencial anti-inflamatório, há uma lacuna significativa quanto à avaliação integrada da taxifolina com abordagens *in silico* e modelos *in vivo* alternativos. Poucos estudos exploram seu potencial antinociceptivo de forma sistemática, o que justifica novas investigações que combinem simulações computacionais com experimentação em Zebrafish, visando gerar evidências robustas sobre sua eficácia e segurança terapêutica (Kaur e Kaushik, 2024; Paiva, 2021).

1.1 Justificativa

A dor e a inflamação constituem condições clínicas de elevada prevalência e impacto, afetando milhões de pessoas em todo o mundo e comprometendo diretamente a qualidade de vida. Embora os tratamentos farmacológicos convencionais, como anti-inflamatórios não esteroides e opioides apresentem eficácia comprovada, seu uso prolongado está associado a importantes limitações, incluindo toxicidade hepática e gastrointestinal, risco de dependência e eficácia reduzida em terapias de longo prazo (Raja *et al.*, 2020). Nesse contexto, evidencia-se a necessidade de novas alternativas terapêuticas mais seguras e com menor perfil de efeitos adversos.

Diante dessa lacuna, compostos naturais, em especial os flavonoides, têm despertado crescente interesse na pesquisa farmacológica, em razão de suas propriedades antioxidantes, imunomoduladoras, anti-inflamatórias e analgésicas. Entre eles, destaca-se a Taxifolina, um flavanonol encontrado em diversas espécies vegetais. Apesar de estudos preliminares indicarem seu potencial em modular mediadores pró-inflamatórios e vias associadas à nocicepção, a literatura ainda carece de investigações sistemáticas que confirmem sua eficácia e segurança em modelos experimentais relevantes (Ferraz *et al.*, 2020; Al-khayri l *et al.*, 2022)

Para responder a essa demanda científica, o uso do Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental apresenta-se como uma alternativa metodológica de grande valor. Esse organismo reúne vantagens translacionais, como alta homologia genética com humanos, baixo custo, fácil manejo e protocolos comportamentais já validados para avaliação da dor e da inflamação.

Nesse cenário, a integração de análises *in silico* e *in vivo* amplia ainda mais a robustez da investigação, permitindo explorar simultaneamente os mecanismos moleculares da taxifolina, prever propriedades farmacocinéticas e toxicológicas e avaliar de forma experimental sua eficácia e segurança.

Embora o presente estudo busque integrar abordagens *in silico* e *in vivo* para investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da taxifolina, algumas limitações devem ser consideradas. A utilização do modelo experimental em zebrafish, apesar de amplamente validada e reconhecida por sua relevância translacional, não substitui completamente a complexidade fisiológica observada em modelos de mamíferos e em estudos clínicos em humanos. Além disso, as análises *in silico* baseiam-se em previsões computacionais que necessitam de validação experimental adicional para confirmação definitiva dos mecanismos

moleculares envolvidos. Nesse sentido, os resultados obtidos neste trabalho devem ser interpretados como evidências iniciais que contribuem para o avanço do conhecimento sobre o potencial farmacológico da taxifolina. Assim, espera-se que esta investigação sirva como base científica e subsídio para estudos futuros mais aprofundados, incluindo ensaios pré-clínicos adicionais e pesquisas translacionais que possam ampliar a compreensão e a aplicação terapêutica desse composto.

1.2 Hipóteses

H1: A Taxifolina interage com alvos moleculares antinociceptivos e anti-inflamatórios, apresentando perfil farmacológico favorável e baixa toxicidade em análises *in silico*.

H2: A administração de Taxifolina em zebrafish reduz significativamente os comportamentos nociceptivos e os marcadores inflamatórios, apresentando eficácia comparável à de fármacos convencionais.

1.3 Questão de Pesquisa

A Taxifolina apresenta propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias eficazes e seguras quando avaliado por abordagens *in silico* e *in vivo* em modelo de Zebrafish (*Danio rerio*) adulto?

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da Taxifolina, um flavonoide de plantas medicinais, utilizando modelos *in silico* e *in vivo* em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Realizar uma revisão da literatura sobre os principais alvos moleculares relacionados à nocicepção e à inflamação.
2. Identificar alvos moleculares relacionados à nocicepção e à inflamação com potencial interação com a Taxifolina.
3. Investigar a interação da Taxifolina com alvos moleculares associados à nocicepção e inflamação.
4. Caracterizar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas da taxifolina.
5. Avaliar o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e o perfil toxicológico da Taxifolina nos zebrafish adultos (*Danio rerio*).

1.5 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está organizada em cinco capítulos, estruturados de forma a apresentar progressivamente o contexto teórico, os procedimentos metodológicos e os resultados da pesquisa.

O **Capítulo 1** corresponde à introdução do estudo, apresentando a contextualização do problema de pesquisa, a justificativa científica, as hipóteses, a questão de pesquisa e os objetivos que orientam a investigação.

O **Capítulo 2** apresenta a revisão de literatura, abordando os principais conceitos relacionados à dor e à inflamação, os mecanismos moleculares envolvidos na nocicepção, com destaque para os receptores TRP e as enzimas ciclooxigenases, bem como a utilização do zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental em estudos farmacológicos. Também são discutidos os flavonoides e seu potencial terapêutico, com ênfase na taxifolina e nas abordagens de triagem virtual aplicadas à investigação de compostos bioativos.

O **Capítulo 3** descreve os materiais e métodos empregados no estudo, detalhando os procedimentos experimentais adotados nas abordagens *in silico* e *in vivo*, incluindo as estratégias de triagem virtual, acoplamento molecular, predição de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, bem como os protocolos experimentais realizados em zebrafish adulto para avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

O **Capítulo 4** apresenta os resultados obtidos na pesquisa, organizados em formato de artigos científicos, nos quais são descritas as análises computacionais e os achados experimentais relacionados ao potencial farmacológico da taxifolina.

Capítulo 5 reúne as considerações finais da dissertação, sintetizando os principais resultados do estudo e discutindo suas contribuições para o avanço do conhecimento na área de dor, inflamação e farmacologia de produtos naturais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com a definição mais recente da *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor é caracterizada como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano (Raja *et al.*, 2020). Trata-se de um importante problema de saúde pública, que exige uma abordagem ampla e multidisciplinar, já que sua presença impacta diretamente a qualidade de vida dos pacientes (Messias, 2020). O modo como a dor é vivenciada depende de múltiplos fatores, como intensidade, duração, carga emocional, significado atribuído à experiência, doença de base e características individuais (Fillingim, 2017). Diante disso, a investigação sobre os mecanismos envolvidos na dor permanece fundamental.

Nesse contexto, um dos aspectos mais relevantes diz respeito à sua classificação de acordo com o tempo de duração. A forma aguda está relacionada a um início súbito, de curta duração, geralmente associada a uma condição nociva que sinaliza perigo ao organismo (Feizerfan; Sheh, 2015). Já a dor crônica caracteriza-se pela persistência além de três meses, indicando frequentemente processos patológicos mais complexos e sustentados (Kuner *et al.*, 2021).

Além da dimensão temporal, a dor pode ser compreendida também sob o ponto de vista fisiopatológico, sendo subdividida em três grandes categorias: nociceptiva, neuropática e nociplástica. A dor nociceptiva ocorre em resposta a estímulos ambientais nocivos mecânicos, térmicos ou químicos detectados por nociceptores, que ativam receptores específicos responsáveis pela sensação dolorosa (Khan, 2019). Estudos recentes destacam que tais nociceptores são alvos promissores para novas terapias contra dor crônica, devido à sua sensibilização, localização fora da barreira hematoencefálica e relativa seletividade (Dubin *et al.*, 2010).

Em contrapartida, a dor neuropática resulta de lesões ou disfunções no sistema nervoso somatossensitivo (Finnerup, 2021). Já a dor nociplástica caracteriza-se pela ausência de dano tecidual identificável que explique a ativação dos nociceptores, estando presente em condições de dor crônica, como fibromialgia, cefaleias, disfunções temporomandibulares e lombalgias (Raja *et al.*, 2020). Esse tipo de dor decorre de alterações no processamento da informação nociceptiva, provavelmente relacionadas à sensibilização central, que intensifica a transmissão neural e modifica os mecanismos de modulação da dor, culminando em hipersensibilidade,

Frequentemente, é acompanhada por comorbidades, como distúrbios do sono, fadiga, alterações cognitivas e disfunções do humor (Fitzcharles *et al.*, 2021).

2.1 Dor Inflamatória

Entre os diferentes tipos de dor, destaca-se a dor inflamatória, que constitui um subtipo relevante da dor nociceptiva, resultante da ativação dos nociceptores em resposta a processos inflamatórios. Nessa condição, a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina, citocinas e quimiocinas, aumenta a excitabilidade das fibras nociceptivas periféricas, promovendo a sensibilização primária. Esse fenômeno amplifica os sinais dolorosos, gerando um limiar de ativação reduzido, de forma que estímulos antes inócuos passam a ser percebidos como dolorosos (Raja *et al.*, 2020).

Convém destacar, entretanto, que a dor inflamatória não se restringe apenas ao local da lesão ou inflamação. Ela envolve também a sensibilização central, que ocorre quando os neurônios do sistema nervoso central passam a responder de maneira exacerbada aos estímulos aferentes periféricos. Essa plasticidade neural, embora inicialmente protetora, contribui para a manutenção de estados dolorosos persistentes quando a inflamação se prolonga (Kuner *et al.*, 2021).

Como consequência, esse tipo de dor é comumente observado em doenças crônicas inflamatórias, como artrite reumatoide, osteoartrite, doença inflamatória intestinal e condições autoimunes em geral. Nessas situações, a persistência da inflamação perpetua o ciclo de sensibilização periférica e central, transformando a dor em um fator debilitante que compromete a funcionalidade e a qualidade de vida dos pacientes (Fillingim, 2017; Messias, 2020).

2.2 Receptores TRPs e enzimas envolvidas

Os canais do potencial receptor transitório (TRP) constituem uma superfamília de canais catiônicos não seletivos que atuam como sensores celulares de estímulos térmicos, químicos, mecânicos e osmóticos. No contexto da dor, sua importância decorre da capacidade de converter estímulos potencialmente lesivos em sinais elétricos, participando da transdução e da modulação da nocicepção em diferentes sistemas sensoriais. Dessa forma, a discussão dos TRP é central para a sua dissertação, pois oferece a base molecular para compreender como processos inflamatórios e estímulos algogênicos desencadeiam respostas dolorosas e, ao mesmo tempo, revela alvos farmacológicos potencialmente moduláveis por compostos bioativos, como a Taxifolina (Luo *et al.*, 2021, Pérez de Vega *et al.*, 2016).

O entendimento da transdução sensorial da dor em nível molecular tem avançado consideravelmente, impulsionado, em parte, pela descoberta e caracterização funcional dos canais TRPs (Luo *et al.*, 2021). Esses canais são expressos em diversas estruturas orofaciais, incluindo neurônios do gânglio trigeminal, odontoblastos, vasos sanguíneos, células imunológicas e células-tronco mesenquimais (Hargreaves e Ruparel, 2016). Na realidade, sua expressão abrange praticamente todos os tipos celulares conhecidos. Eles são agrupados em seis subfamílias, de acordo com a sequência de aminoácidos: TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPML (mucolipina), TRPP (policistina) e TRPC (canônico) (Pereira, 2014).

Nessa lógica, os nociceptores exercem papel crucial ao detectar estímulos potencialmente prejudiciais, como calor intenso, pressão mecânica ou agentes químicos, em um processo denominado nocicepção. Os canais TRP participam diretamente desse mecanismo, contribuindo para a transmissão sensorial tanto em níveis periféricos quanto centrais (Behrendt, 2019). A modulação desses canais tem se destacado como uma estratégia promissora no manejo de diferentes condições dolorosas (Jansen *et al.*, 2019). Especificamente, alguns canais, como TRPV1 e TRPA1 e TRPM8 são ativados por estímulos nociceptivos, tornando-se alvos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos antinociceptivos (Iftinca, 2020).

2.2.1 Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1 (TRPV1)

Entre os TRPs, o TRPV1 é um dos mais estudados e foi o primeiro receptor vaniloide a ser caracterizado (Oliveira *et al.*, 2020). Trata-se de um canal catiônico não seletivo, sensível a calor, queda de pH e substâncias exógenas, como a capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonanamida), isolada da pimenta vermelha (*Capsicum* sp.), bem como outras toxinas vegetais, destacando-se a resiniferatoxina por sua alta potência (Oliveira *et al.*, 2020). A ação da capsaicina é explicada tanto por efeitos excitatórios quanto por dessensibilização de nociceptores polimodais (Parisi, 2016). TRPV1 está amplamente distribuído em neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal e em fibras aferentes primárias do tipo A δ e C, desempenhando funções centrais na modulação da dor, neurogênese e termorregulação (Morgan, 2019; Alawi *et al.*, 2015). Estudos demonstram que antagonistas de TRPV1 podem reduzir a nocicepção em modelos animais de inflamação, osteoartrite e neuropatia (Pereira, 2014).

A modulação farmacológica de TRPV1 por antagonistas tem sido intensamente investigada como estratégia para o manejo da dor, especialmente em condições inflamatórias e

neuropáticas. Revisões recentes mostram que diversos antagonistas de pequena molécula foram desenvolvidos e testados em modelos pré-clínicos e ensaios clínicos, demonstrando efeito antinociceptivo robusto; contudo, muitos desses compostos de primeira geração foram associados a eventos adversos relevantes, como hipertermia e alteração da percepção térmica, o que limitou sua progressão clínica (Iftinca, 2020).

Em resposta a essas limitações, novas gerações de antagonistas têm sido desenhadas com maior seletividade e perfis de segurança mais favoráveis, incluindo moléculas com ação preferencial periférica ou com modulação parcial do canal. Um recente antagonista do TRPV1 SAF312 (Libvatrep), cujo mecanismo de inibição foi caracterizado por estudos estruturais de alta resolução, evidenciando o modo de ligação ao canal e a interação com colesterol (Fan *et al.*, 2024), além de dados de farmacologia e toxicologia ocular que reforçam seu potencial terapêutico em condições dolorosas de superfície ocular (Mogi *et al.*, 2023).

2.2.2 Receptor de Potencial Transitório Anquirina do tipo 1 (TRPA1)

Seguindo na análise dos canais relacionados à nocicepção, o TRPA1 se destaca como outro membro relevante da superfamília TRPs. Ele é expresso principalmente em neurônios nociceptivos primários e é ativado por frio nocivo (Koivisto, 2018). Sua ativação ocorre via modificações covalentes em resíduos de cisteína, induzidas por agonistas endógenos, como fosfolipase C (PLC) ativadas por receptores acoplados à proteína G e espécies reativas de oxigênio, e por agonistas exógenos, como óleo de mostarda, cinamaldeído, alicina e Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Macpherson *et al.*, 2007).

Esse canal está presente nos gânglios da raiz dorsal, em neurônios trigeminiais e em uma subpopulação de nociceptores não mielinizados que co-expressam TRPV1, evidenciando seu papel na nocicepção (Moccia e Montagna, 2023). Estudos mostram que o bloqueio farmacológico ou a deleção genética de TRPA1 diminui a resposta nociceptiva em modelos de formalina, sugerindo seu potencial como alvo terapêutico para a dor (McNamara *et al.*, 2007).

Os antagonistas de TRPA1 têm se destacado como uma classe promissora de moléculas para o manejo da dor, pois bloqueiam a ativação desse canal por diversos mediadores pró-nociceptivos envolvidos em condições inflamatórias e neuropáticas. Ao impedir a abertura de TRPA1 em terminações nociceptivas periféricas e em sinapses centrais da medula espinal, esses fármacos reduzem o influxo de cálcio e a transmissão de sinais dolorosos, atenuando hipersensibilidade mecânica, térmica e química em diferentes modelos pré-clínicos de dor. (Abdel-Magid, 2021).

Evidências indicam que antagonistas com ação predominantemente periférica são particularmente eficazes na redução da hiperalgesia primária associada à inflamação tecidual, enquanto moléculas com boa penetração no sistema nervoso central parecem mais adequadas para quadros em que mecanismos de amplificação central, como hiperalgesia secundária e alodinia tátil, têm papel relevante (Koivisto *et al.*, 2024).

Do ponto de vista do desenvolvimento de fármacos, o cenário recente de patentes revela grande diversidade estrutural entre os antagonistas de TRPA1, incluindo pequenas moléculas heterocíclicas otimizadas quanto à potência, seletividade e propriedades farmacocinéticas (Abdel-Magid, 2021)

Revisões atualizadas descrevem compostos desenvolvidos desde 2020, contemplando novas aplicações terapêuticas para antagonistas já conhecidos, a identificação de inibidores de origem natural e a síntese de novas entidades químicas com perfis de segurança mais favoráveis em relação às gerações iniciais. Além da dor inflamatória e neuropática, cresce o interesse pelo uso desses antagonistas em outras condições associadas à ativação exacerbada de TRPA1, como enxaqueca, tosse crônica e doenças inflamatórias de vias aéreas, reforçando seu potencial como estratégia analgésica mais específica e com menor carga de efeitos adversos sistêmicos em comparação a tratamentos convencionais (Vitale, de Petrocellis, Amodeo, 2024).

2.2.3 Cicloxigenase-1 e Cicloxigenase-2

Além dos canais TRP, é importante destacar que as enzimas ciclooxigenases (COXs) também desempenham papel central na modulação da dor inflamatória. Tanto a COX-1 quanto a COX-2 catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, que atuam como potentes mediadores da inflamação e da nocicepção. Enquanto a COX-1 é expressa de forma constitutiva e participa da manutenção de funções fisiológicas, como proteção gástrica e regulação do fluxo sanguíneo, a COX-2 é induzida principalmente em resposta a estímulos inflamatórios, sendo ativada em células imunológicas e em tecidos lesionados (Shi, Lindholm e Sarna, 2013).

Os principais antagonistas das ciclooxigenases são os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), que atuam inibindo competitiva ou irreversivelmente os sítios catalíticos de COX-1 e COX-2, reduzindo a formação de prostaglandinas pró-inflamatórias. A maioria dos AINEs clássicos, como o ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, diclofenaco e indometacina, exerce inibição não seletiva das duas isoformas, o que explica tanto sua eficácia analgésica e anti-inflamatória quanto o perfil de efeitos adversos, especialmente gastrointestinais, renais e

cardiovasculares. Nesse contexto, o desenvolvimento de antagonistas mais seletivos buscou modular a atividade da via da ciclooxygenase sem comprometer de forma intensa as funções fisiológicas dependentes de COX-1, particularmente a proteção da mucosa gástrica e a homeostase plaquetária. (Vishwakarma e Negi, 2020; Kaur; Singh, 2022).

A partir desse racional, foram introduzidos os inibidores seletivos de COX-2 (coxibes), desenhados para bloquear preferencialmente a isoforma induzida em contextos inflamatórios, preservando em maior grau a atividade constitutiva de COX-1. Embora esses fármacos tenham mostrado menor incidência de complicações gastrointestinais quando comparados aos AINEs não seletivos, evidências posteriores associaram o bloqueio intenso de COX-2 a um aumento do risco de eventos cardiovasculares, em razão do desequilíbrio entre prostaciclina endotelial e tromboxano plaquetário (Haroun *et al.*, 2023; Vishwakarma e Negi, 2020).

2.3 Modelos experimentais de dor e inflamação

O estudo da dor e da inflamação depende fortemente de modelos experimentais que permitam compreender os mecanismos fisiopatológicos subjacentes e, ao mesmo tempo, viabilizem a descoberta de novos alvos terapêuticos (Lee *et al.*, 2018).

Os modelos animais tradicionais, como roedores, primatas não humanos e suínos, desempenharam um papel essencial na investigação biomédica ao longo das últimas décadas. No entanto, questões éticas, limitações técnicas e custos elevados têm estimulado a busca por alternativas que conciliam: relevância clínica, viabilidade metodológica e alinhamento com os princípios dos 3Rs (*Replace, Reduce, Refine*) (Canedo *et al* 2022).

Figura 1: Os princípios éticos dos 10 Rs para utilizar o zebrafish como um sistema modelo em pesquisa.



Cada modelo animal apresenta vantagens específicas, mas também limitações que devem ser consideradas no desenho experimental. Os primatas não humanos, como o macaco (*Rhesus*), apresentam elevada semelhança com humanos em termos de sistema nervoso e resposta imune, sendo amplamente utilizados em pesquisas relacionadas a doenças neurodegenerativas e inflamação sistêmica. Apesar disso, o alto custo, a complexidade do manejo e as fortes restrições éticas limitam seu uso em larga escala (Munster *et al.*, 2020).

De modo semelhante, os suínos oferecem grande proximidade anatômica e metabólica com humanos, sobretudo no estudo da dor visceral e inflamação. Entretanto, exigem infraestrutura especializada e investimentos consideráveis, o que dificulta sua ampla adoção (Yang, Wu, 2018). Essas limitações reforçam a necessidade de modelos alternativos que unam aplicabilidade científica, custo acessível e maior aceitabilidade ética. Nesse cenário, o Zebrafish (*Danio rerio*) vem se destacando como uma ferramenta promissora na pesquisa biomédica, já que compartilha aproximadamente 70% ou mais dos seus genes com os humanos, tais como os genes ortólogos que são genes com funções semelhantes e que foram herdados com um ancestral comum (Howe *et al* 2013).

2.4 Zebrafish como modelo experimental

O zebrafish (*Danio rerio*) consolidou-se como um modelo experimental versátil em pesquisas biomédicas por reunir características típicas de vertebrados com um manejo relativamente simples e de baixo custo. Trata-se de uma espécie que produz grande número de descendentes, apresenta desenvolvimento embrionário rápido e externo e possui embriões e larvas transparentes, o que permite a observação direta de processos celulares e teciduais *in vivo*. Em conjunto, essas características possibilitam acompanhar, em tempo real, eventos como organogênese, angiogênese e respostas inflamatórias, reduzindo a necessidade de utilização imediata de modelos mamíferos nas fases exploratórias da pesquisa. (Choi *et al.*, 2021).

Essa aplicabilidade prática se torna ainda mais relevante quando se consideram os aspectos translacionais. Estimativas baseadas em análises genômicas indicam que cerca de 70% dos genes humanos possuem pelo menos um ortólogo em zebrafish, e que a maioria dos genes associados a doenças humanas encontra correspondente nessa espécie, reforçando sua pertinência para o estudo de mecanismos de patogênese e de alvos terapêuticos (Adhish; Manjubala, 2023). Essa homologia genética, associada à conservação de vias de sinalização envolvidas em inflamação, dor, metabolismo e doenças neurológicas, confere ao modelo um forte potencial de extrapolação para a fisiologia humana (Choi *et al.*, 2021).

A partir dessa base, revisões recentes destacam que o zebrafish vem sendo utilizado em uma ampla gama de contextos, incluindo distúrbios do desenvolvimento, doenças neuropsiquiátricas e alterações metabólicas, justamente por ser capaz de reproduzir fenótipos fisiopatológicos complexos de forma reprodutível. Em modelos de doenças crônicas, diferentes linhagens mutantes e protocolos experimentais foram desenvolvidos para mimetizar processos inflamatórios e degenerativos, ampliando o emprego do zebrafish tanto em pesquisa básica quanto em estudos pré-clínicos (Balde, 2024).

No campo da farmacologia e da nanotecnologia, o zebrafish também se destaca como plataforma *in vivo* para avaliação de nanomedicines, esse modelo permite investigar, de forma rápida e economicamente viável, toxicidade, farmacocinética, biodistribuição e eficácia terapêutica de formulações nanoestruturadas em um vertebrado, reduzindo o número de ensaios iniciais em roedores (Ruchika, Sharma e Saneja, 2022).

Para além das aplicações estritamente biomédicas, o zebrafish é amplamente reconhecido como modelo alternativo em pesquisas ecotoxicológicas, essa espécie é sensível a diferentes contaminantes ambientais e permite análises em múltiplos níveis de organização biológica, desde alterações moleculares e genotóxicas até efeitos no desenvolvimento, no comportamento e na sobrevivência. Assim, o zebrafish configura-se como ferramenta relevante tanto para avaliação de risco ambiental quanto para o estudo dos impactos de substâncias químicas emergentes sobre a saúde dos ecossistemas (Braga *et al*, 2024)

O crescimento do uso do zebrafish em pesquisa tem sido acompanhado por discussões bioéticas e pela consolidação de diretrizes específicas para seu manejo. Santiago e Félix (2024) abordam aspectos práticos e éticos relacionados ao bem-estar de embriões e adultos, destacando a necessidade de critérios rigorosos de anestesia, eutanásia e planejamento experimental, em consonância com os princípios dos 3Rs (*Replace, Reduce, Refine*). Dessa forma, o zebrafish se apresenta não apenas como um modelo experimental robusto e diversificado, mas também como um aliado na substituição parcial de modelos mamíferos em fases iniciais dos estudos, contribuindo para abordagens mais éticas e sustentáveis em ciência (Santiago e Félix, 2024).

2.5 Aplicações farmacológicas e estudos de dor e inflamação usando o Zebrafish

O zebrafish adulto é útil na triagem de novos compostos, inclusive moléculas naturais, devido à elevada permeabilidade de sua pele à absorção de substâncias dissolvidas na água, permitindo análises farmacocinéticas e farmacodinâmicas confiáveis (Ferreira *et al.*, 2019). Estudos demonstraram o potencial anti-inflamatório de extratos vegetais, como *Trattinnickia*

rhoifolia e *Libidibia ferrea*, em testes de toxicidade aguda e avaliação funcional em zebrafish adultos (Souza *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2019). Para tanto, protocolos específicos empregam substâncias como ácido acético ou carragenina, cujos efeitos são medidos por alterações locomotoras, imobilidade, padrões de natação e quantificação de biomarcadores inflamatórios, incluindo TNF- α e IL-1 β (Sneddon *et al.*, 2023).

Além das aplicações farmacológicas, o zebrafish adulto tem sido amplamente utilizado em testes de toxicidade aguda e crônica, permitindo a análise integrada de parâmetros histológicos, comportamentais e bioquímicos (Liu *et al.*, 2024). A boa correlação desses resultados com modelos em mamíferos reforça sua relevância como ferramenta para triagem pré-clínicas de segurança (Ferreira *et al.*, 2019).

O uso do zebrafish deve, entretanto, respeitar os princípios dos 3Rs, assegurando o emprego do menor número possível de animais, a adoção de técnicas que minimizem o sofrimento e a aplicação de protocolos adequados de anestesia e eutanásia. O enriquecimento ambiental dos tanques também é essencial para o bem-estar dos animais (Canedo *et al.*, 2022). Hoje, a percepção de dor no zebrafish adulto é reconhecida, exigindo cuidados éticos equivalentes aos aplicados em pesquisas com mamíferos (Sneddon *et al.*, 2023). A legislação vigente, em âmbito nacional e internacional, recomenda sua inclusão em comitês de ética, fortalecendo a legitimidade científica e ética de sua utilização (Santiago *et al.*, 2024).

2.6 Abordagens atuais para o tratamento da dor e inflamação

Diferentes estratégias terapêuticas têm sido empregadas, variando entre intervenções farmacológicas clássicas e abordagens mais recentes que buscam reduzir os efeitos adversos e ampliar a eficácia clínica (Paul *et al.*, 2021; Pathan *et al.*, 2018). No manejo da dor, os analgésicos opioides ocupam posição central, atuando por meio da ligação aos receptores μ -opioides do sistema nervoso central, proporcionando alívio significativo, especialmente em casos de dor intensa, como dor oncológica e pós-operatória (Hsu *et al.*, 2019). Entretanto, seu uso prolongado está associado a riscos importantes, como dependência, tolerância e depressão respiratória, o que limita sua segurança em tratamentos de longa duração.

Nesse contexto, terapias não farmacológicas, incluindo fisioterapia, técnicas cognitivas e práticas integrativas, vêm sendo incentivadas como alternativas complementares, oferecendo um cuidado mais seguro e multidimensional (Smith *et al.*, 2016). Para o controle da inflamação, os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) permanecem como primeira escolha, atuando pela inibição das enzimas COX-1 e COX-2, responsáveis pela síntese de

prostaglandinas envolvidas na inflamação e na sensibilização da dor, promovendo redução do edema e alívio sintomático (Pathan *et al.*, 2018).

Apesar de eficazes, o uso crônico de AINEs está associado a efeitos adversos importantes, como gastropatias, disfunção renal e maior risco cardiovascular. Como resposta a essas limitações, novas estratégias terapêuticas vêm sendo desenvolvidas, incluindo anti-inflamatórios seletivos com menor impacto gastrointestinal e analgésicos não opioides com perfis de segurança mais favoráveis. A farmacogenômica surge como uma área promissora, permitindo personalizar os tratamentos de acordo com o perfil genético de cada paciente, com o objetivo de maximizar a eficácia e reduzir os efeitos adversos (Smith *et al.*, 2016; Paul *et al.*, 2021).

2.7 Produtos naturais com potencial antinociceptivo e anti-inflamatório

Os produtos naturais têm se consolidado como uma importante fonte de moléculas bioativas com propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias. Diferentes estudos destacam que compostos derivados de plantas exercem efeitos tanto na modulação de mediadores inflamatórios quanto na redução da percepção da dor. Como ilustrado na revisão sistemática sobre neuropatia periférica induzida por quimioterapia demonstrou que diversos fitoquímicos, incluindo terpenos, alcaloides e flavonoides, foram capazes de reduzir significativamente a dor em modelos animais, atuando por vias como diminuição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), regulação do estresse oxidativo e modulação de receptores neuronais (Santos *et al.*, 2022).

2.8 Flavonoides e potencial antinociceptivo

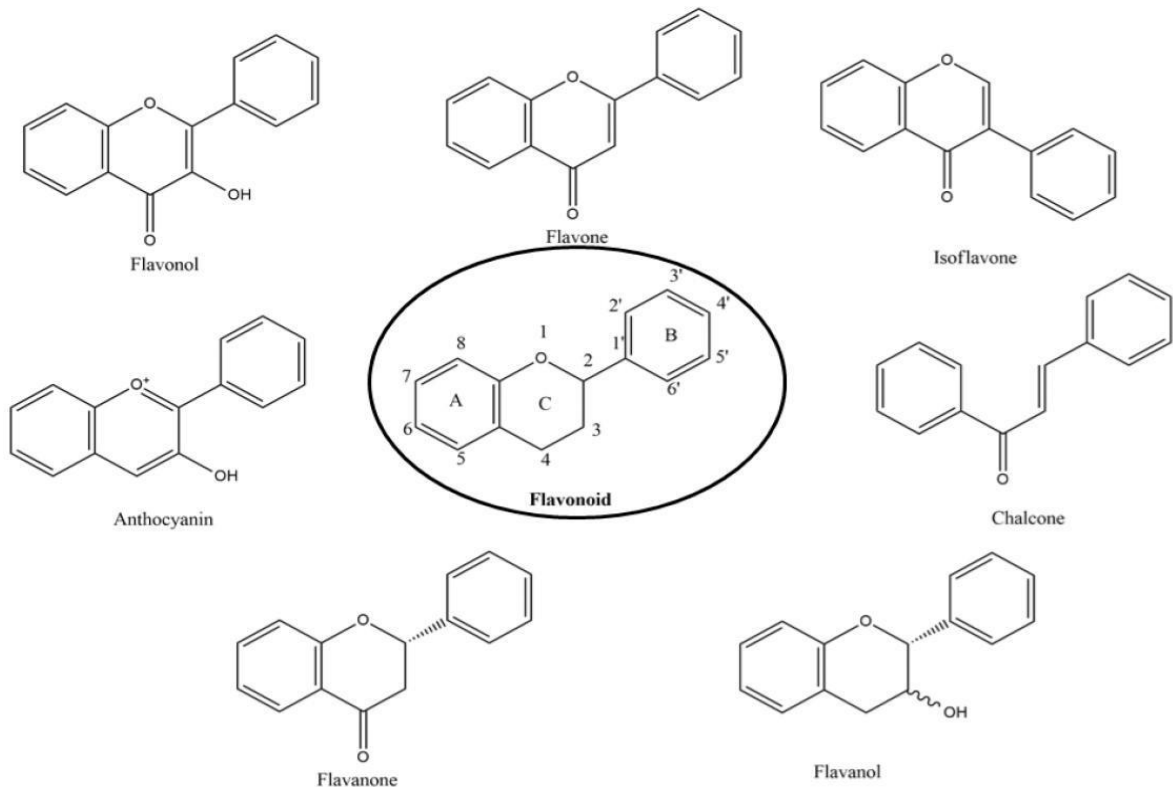
Os flavonoides representam um dos grupos de metabólitos secundários mais estudados na farmacologia natural, principalmente devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória e analgésica. Esse potencial torna os flavonoides promissores diante das limitações e efeitos adversos de analgésicos tradicionais, como opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (Ferraz *et al.*, 2020).

Em particular, a dor neuropática, caracterizada por lesão ou disfunção do sistema somatossensorial, impacta fortemente a qualidade de vida e apresenta manejo clínico desafiador. Nesse contexto, os flavonoides atuam em múltiplos alvos da nocicepção e inflamação, revertendo hiperalgesia Rao *et al.*, (2021). Segundo Zarei *et al.*, (2022) flavonoides como kaempferol demonstram efeito analgésico em modelos de dor aguda e inflamatória por meio da modulação dos canais TRPV1, com eficácia comparável à morfina em determinados

modelos a quercetina e a rutina também mostraram resultados positivos no manejo da neuropatia induzida por quimioterapia, reduzindo mediadores inflamatórios e prevenindo hiperalgesia e alodinia (Santos *et al.*, 2022; Rao *et al.*, 2021).

Do ponto de vista estrutural, os flavonoides compartilham um esqueleto básico de 15 carbonos (C6-C3-C6), cuja diversidade de hidroxilação, glicosilação e metilação influencia suas propriedades biológicas. Essas modificações explicam a capacidade de moléculas como kaempferol e quercetina de interagirem com múltiplos alvos moleculares envolvidos no controle da dor (Al-khayri *et al.*, 2022).

Figura 2: Estrutura química dos diferentes tipos de flavonoides.



Fonte: Al-khayri *et al* 2022.

2.9 Flavonoides e potencial anti-inflamatório

Os flavonoides constituem um grupo de polifenóis amplamente distribuídos em frutas, vegetais, chás e outras plantas, sendo reconhecidos por um conjunto de efeitos biológicos que inclui ações antioxidantes, analgésicas e anti-inflamatórias. Esses compostos apresentam um esqueleto carbônico comum de 15 átomos, com variações estruturais que determinam diferenças nos mecanismos de ação e na potência farmacológica (Ferraz *et al.*, 2020; Al-khayri *et al.*, 2022).

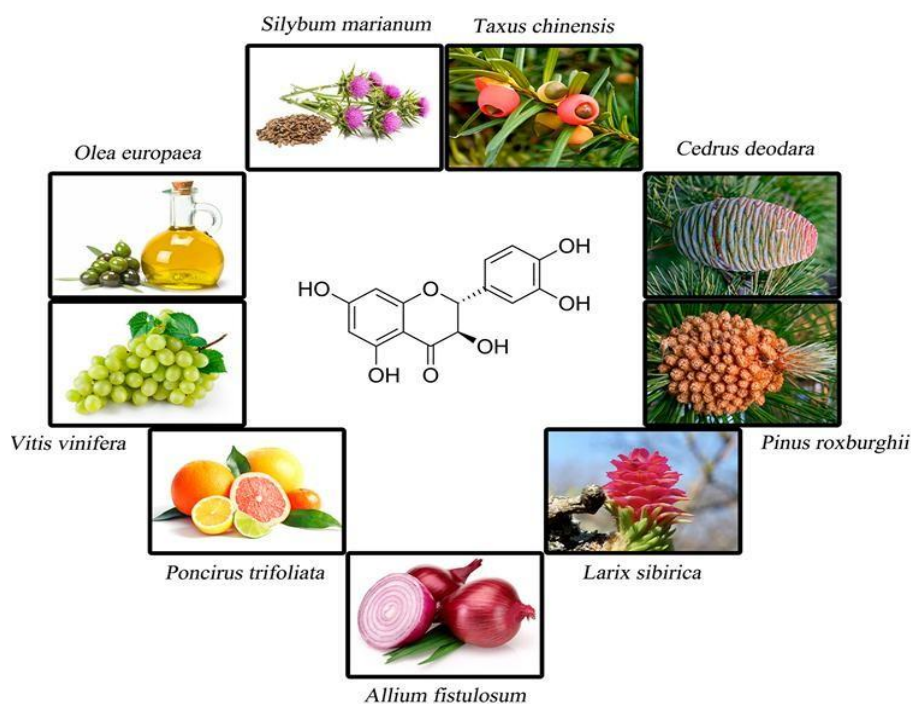
A literatura recente destaca que o consumo ou uso terapêutico de flavonoides está associado à modulação de mediadores inflamatórios e à atenuação de sinais de dor, o que os coloca como candidatos relevantes na busca por alternativas aos anti-inflamatórios clássicos, especialmente em condições crônicas em que o estresse oxidativo e a inflamação persistente desempenham papel central (Ysrafil *et al.*, 2023).

Do ponto de vista mecanístico, estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos mostram que flavonoides atuam em múltiplos alvos da cascata inflamatória, configurando um perfil marcadamente *multitarget*. Diversos compostos dessa classe são capazes de inibir a ativação do fator de transcrição NF- κ B, reduzir a expressão de enzimas pró-inflamatórias, como ciclooxigenase-2, lipoxigenases e óxido nítrico sintase induzível, além de diminuir a produção de citocinas como interleucina 1 beta, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa (Ferraz *et al.*, 2020; Ysrafil *et al.*, 2023).

Apesar desse potencial, limitações de solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade têm sido apontadas como entraves para a plena exploração terapêutica dos flavonoides. Nesse cenário, abordagens baseadas em nanotechnology e nanomedicine vêm sendo propostas como estratégias promissoras para otimizar o perfil farmacocinético desses compostos, aumentar sua absorção, proteger contra degradação e potencializar seus efeitos anti-inflamatórios *in vivo* (Zahra, Abrahamse e George, 2024).

2.10 Fontes naturais do Taxifolina

Dentro dos flavonoides, o Taxifolina destaca-se por seu amplo potencial farmacológico. Ele é encontrado em diversas espécies vegetais, principalmente coníferas como *Larix sibirica* (alerce siberiano), *Pinus roxburghii* (pinheiro do Himalaia), *Cedrus deodara* (cedro do Himalaia) e *Taxus chinensis* var. *mairei* (teixo chinês). Também ocorre em menor quantidade em alimentos como cebolas, maçãs, vinagre envelhecido e azeite de oliva, estando presente de forma incidental na dieta humana (Liu *et al.*, 2023; Das *et al.*, 2021). A ampla distribuição natural do Taxifolin reforça seu potencial como molécula bioativa de interesse farmacológico, conectando-se diretamente à discussão sobre flavonoides com efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios.

Figura 3: Plantas contendo Taxifolina

Fonte: (Das *et al.*, 2021).

Partes da planta como cascas, folhas jovens e sementes tendem a concentrar mais flavonoides, justificando seu uso em estudos fitoquímicos detalhados. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) é considerada uma técnica eficaz para identificar a taxifolina mesmo em quantidades mínimas, contribuindo para ampliar o conhecimento sobre suas fontes vegetais (Liu *et al.*, 2023).

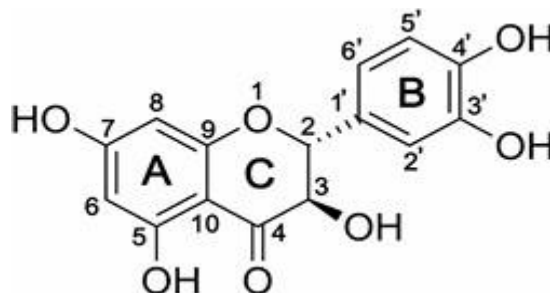
2.11 Taxifolina e seu potencial farmacológico

A taxifolina, também chamada diidroquercetina, é um flavanonol pertencente à classe dos flavonoides. Sua fórmula molecular é $C_{15}H_{12}O_7$, com massa de 304,25 g/mol (Das *et al.*, 2021). A molécula contém dois anéis fenólicos (A e B) ligados por um anel heterocíclico (C), formando o esqueleto típico das flavanonas (Figura). Os grupos hidroxila nas posições 3, 3', 4', 5 e 7 conferem alta capacidade antioxidante, característica que diferencia a taxifolina de outros flavonoides semelhantes (Liu *et al.*, 2023).

Ao contrário da quercetina, a taxifolina não apresenta a ligação dupla entre os carbonos C2 e C3 do anel C. Essa diferença altera sua conformação tridimensional e suas propriedades farmacológicas. Essa modificação estrutural resulta em maior estabilidade frente à oxidação e ao metabolismo hepático, o que pode favorecer seu uso em formulações farmacêuticas (Sunil; Xu, 2019). Além disso, a ausência dessa ligação facilita a formação de

complexos com íons metálicos, o que pode ter aplicação no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo (Topal *et al.*, 2016).

Figura 4: Estrutura química da taxifolina.



Fonte: (Das *et al.*, 2021)

2.12 Triagem virtual de compostos naturais

O desenvolvimento de fármacos tem se beneficiado de forma expressiva dos avanços em computação e inteligência artificial aplicada à área de bioprospecção de novos compostos obtidos da biodiversidade da flora. Nessa conjuntura, a triagem virtual, também chamada de screening virtual, tornou-se uma ferramenta eficiente para acelerar a identificação de compostos com potencial terapêutico. Trata-se de uma abordagem computacional que utiliza softwares especializados para simular a interação entre alvos biológicos, como proteínas, e bibliotecas extensas de moléculas. Essa estratégia permite selecionar candidatos promissores de forma rápida, reduzindo custos e tempo nas fases pré-clínicas do desenvolvimento de novos medicamentos (Luo *et al.*, 2022).

A triagem virtual pode ser dividida em duas abordagens principais: a triagem baseada em ligante (Ligand-Based Virtual Screening-LBVS) e a triagem baseada em estrutura (Structure-Based Virtual Screening-SBVS). Enquanto o SBVS exige o conhecimento da estrutura tridimensional da proteína-alvo para modelar diretamente o encaixe das moléculas no sítio ativo, a LBVS é indicada quando não há dados estruturais detalhados da proteína, mas existem informações sobre ligantes com atividade biológica conhecida (Lanka *et al.*, 2023).

Os produtos naturais representam uma fonte rica de moléculas bioativas, tornando a triagem baseada em estrutura também conhecida como ancoragem molecular (*docking molecular*), uma técnica central para explorar essa diversidade química na relação entre alvos de interesse biomédico e compostos naturais com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (Akili *et al.* (2023)

Estudos recentes exemplificam a aplicação desta técnica que vem se difundindo entre os grupos de pesquisa integrando de forma complementar estudos fitoquímicos e farmacológicos. Muitos destes estudos descrevem a interação molecular de flavonoides com proteínas expressas em seres humanos responsáveis pelo aparecimento de doenças. Akili *et al.* (2023) investigaram flavonoides do gênero *Erythrina* como possíveis inibidores da enzima DNA girase, relevante no desenvolvimento de antibióticos, enquanto Saha *et al.* (2025) avaliaram o efeito combinado de compostos da *Moringa oleifera* na inibição da proteína BCL-2, envolvida na regulação da apoptose celular e câncer. Esses trabalhos, dentre outros, demonstram como a triagem virtual integra conhecimento químico e biológico para identificar moléculas com potencial terapêutico.

2.12.1 Triagem Baseada no Ligante

A abordagem baseada no ligante tem se mostrado especialmente útil na análise de produtos naturais, por permitir processar grandes bancos de dados contendo flavonoides, alcaloides, terpenos e outros metabólitos secundários presentes em plantas e microrganismos (Akili *et al.*, 2023; El aissouq *et al.*, 2022). Outrossim, ela gera hipóteses moleculares que podem ser posteriormente testadas e refinadas em experimentos laboratoriais, promovendo a integração entre métodos computacionais (*in silico*) e estudos em modelos experimentais.

2.12.2 Triagem Baseada no Receptor

Já o *docking* molecular é a técnica central na triagem baseada no receptor. Seu objetivo é prever como uma pequena molécula se acomoda no sítio de ligação de uma proteína. O processo inclui a preparação das estruturas tridimensionais do ligante e do receptor, com adição de hidrogênios e remoção de moléculas de água não essenciais, seguida de algoritmos que exploram diferentes orientações do ligante e avaliam essas conformações por funções de pontuação, estimando a afinidade da ligação, entre os algoritmos mais utilizados estão o Algoritmo Genético, o Algoritmo Genético Lamarckiano, o Simulated Annealing e o método de Monte Carlo (El aissouq *et al.*, 2022).

Para aumentar a precisão das previsões, o *docking* pode ser complementado com simulações de dinâmica molecular, que avaliam a estabilidade do complexo ligante-receptor ao longo do tempo (Shoab *et al.*, 2023). Dessa forma, a abordagem baseada no receptor combina informação estrutural detalhada e avaliação *in silico*, tornando a triagem de candidatos a fármacos mais confiável e direcionada.

2.13 Avaliação de propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas

A eficácia de um candidato a fármaco não depende apenas de sua capacidade de se ligar ao alvo biológico; é igualmente essencial que apresente propriedades farmacocinéticas e toxicológicas adequadas, resumidas pelo conceito de *ADMET*, que inclui Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade. Esses parâmetros determinam a viabilidade clínica e a segurança do composto (Lanka *et al.*, 2023).

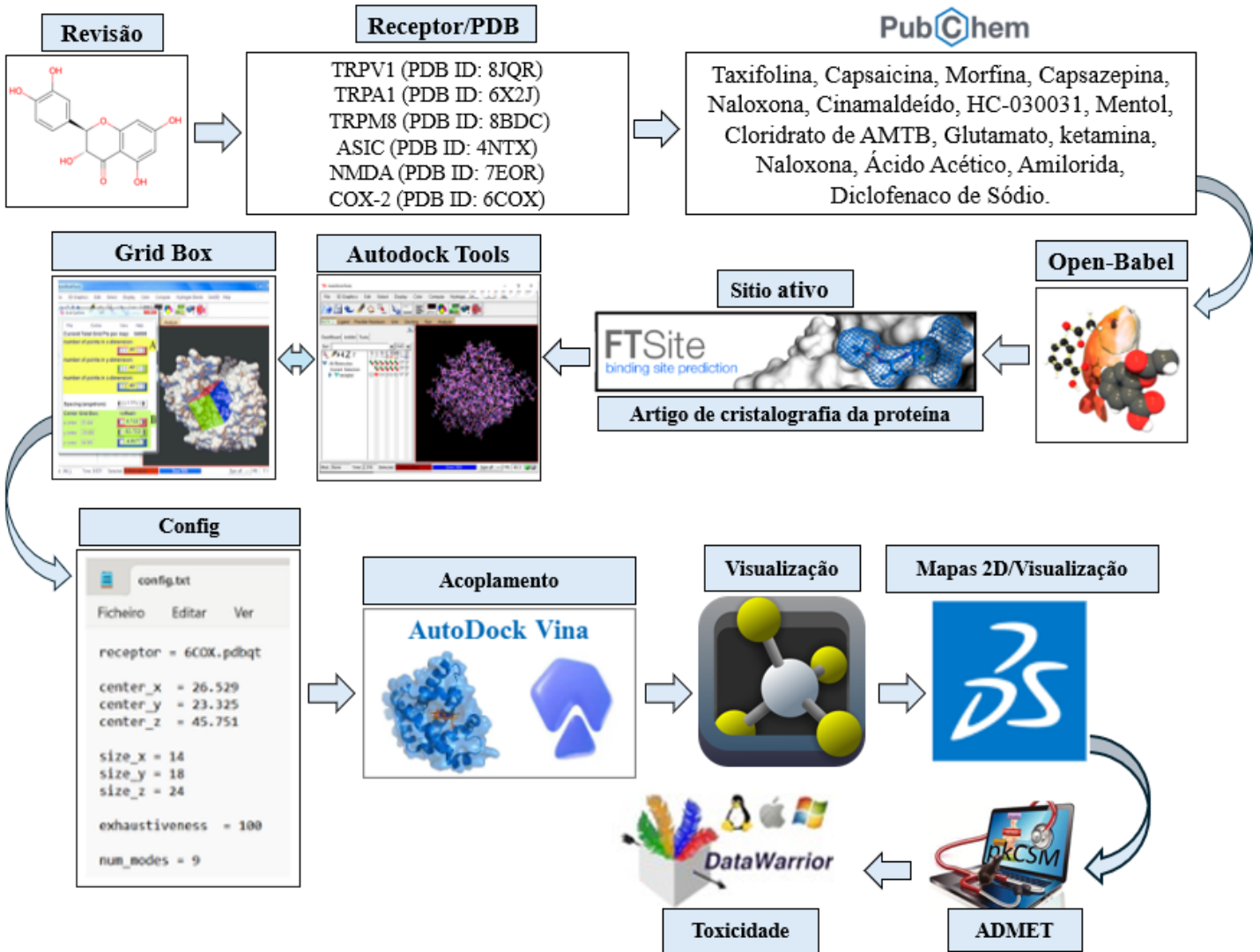
Estudos *in silico* de *ADMET* permitem prever rapidamente características críticas antes de avançar para etapas experimentais, incluindo solubilidade em meio aquoso, capacidade de atravessar membranas biológicas, fração de ligação a proteínas plasmáticas e estabilidade metabólica relacionada à atuação das enzimas do citocromo P450 (Ansari *et al.*, 2022).

Diversos programas especializados oferecem estimativas confiáveis desses parâmetros: o SwissADME calcula permeabilidade intestinal e interações com transportadores celulares; o ADMETlab fornece informações sobre efeitos adversos, como toxicidade hepática e risco de mutagenicidade; e plataformas como pkCSM e PreADMET integram dados de farmacocinética e toxicidade em uma análise unificada (Vardhan; Sahoo, 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a investigação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da taxifolina, foi realizado um protocolo *in silico* baseado em estudos de ancoragem molecular (*molecular docking*). Inicialmente, foram selecionados receptores moleculares relevantes envolvidos nos processos de dor e inflamação, cujas estruturas tridimensionais foram obtidas a partir do banco de dados Protein Data Bank (PDB). Em seguida, foram selecionados ligantes de interesse a partir da base de dados PubChem, incluindo a Taxifolina e compostos de referência farmacológica utilizados como controles. Posteriormente, as estruturas foram preparadas e processadas utilizando ferramentas computacionais apropriadas para a definição do sítio ativo e realização das simulações de *docking*. O fluxograma geral das etapas utilizadas no protocolo *in silico* encontra-se apresentado na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma do protocolo *in silico*



Autor: Quilenda, 2025

3.1 Experimentos *in silico*

3.1.1 Pesquisa em bases de dados

Foi realizada uma pesquisa inicial na base de dados *DrugBank* (<https://go.drugbank.com/>) utilizando as palavras-chave medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios, com o objetivo de identificar fármacos que atuam seletivamente sobre alvos moleculares envolvidos na nocicepção e na inflamação. A partir dessa triagem, foram selecionadas estruturas de fármacos inibidores e moduladores dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, NMDA e da enzima COX-2.

As estruturas dos compostos de interesse Taxifolina, Capsaicina, Morfina, Capsazepina, Naloxona, Cinamaldeído, HC-030031, Mentol, Cloridrato de AMTB, Glutamato, Ketamina, Ácido acético, Amilorida e Diclofenaco de sódio foram obtidas na base de dados *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) em formato tridimensional (3D SDF) para posterior preparo e acoplamento molecular.

3.1.2 Triagem virtual, acoplamento molecular e ferramentas ADMET

As estruturas moleculares dos ligantes foram baixadas em formato 3D SDF e, posteriormente, convertidas para o formato PDBQT utilizando o programa Open Babel (<https://sourceforge.net/projects/openbabel/>), para serem empregadas nos cálculos de acoplamento molecular (*docking*).

As estruturas cristalográficas dos alvos moleculares foram obtidas no Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>): TRPV1 (PDB ID: 8JQR), TRPA1 (PDB ID: 6X2J), TRPM8 (PDB ID: 8BDC), ASIC (PDB ID: 4NTX), receptor NMDA (PDB ID: 7EOR) e COX-2 (PDB ID: 6COX). Os sítios ativos de cada receptor/enzima foram preditos pela ferramenta online *FTSite* (<https://ftsitesite.bu.edu>) e confirmados com base nos artigos de cristalografia de cada proteína disponíveis no próprio PDB.

Os receptores foram preparados e convertidos para o formato PDBQT no programa AutoDockTools, incluindo remoção de moléculas de água, adição de hidrogênios polares e cargas parciais. Em seguida, foi realizada a triagem virtual e o acoplamento molecular entre todos os ligantes selecionados Taxifolina, Capsaicina, Morfina, Capsazepina, Naloxona, Cinamaldeído, HC-030031, Mentol, Cloridrato de AMTB, Glutamato, Ketamina, Ácido acético, Amilorida e Diclofenaco de sódio e os receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, NMDA e COX-2, utilizando o software AutoDock Vina.

Para cada complexo receptor-ligante, foram geradas nove poses, retornando suas respectivas energias de afinidade ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). As melhores poses, selecionadas com base na menor energia de afinidade e no posicionamento adequado no sítio ativo, foram analisadas e visualizadas no software PyMOL 2.1 (<https://www.pymol.org/>). Os mapas de interação 2D de cada complexo foram obtidos por meio do software Discovery Studio Visualizer 4.5 (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

As propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET) dos ligantes foram avaliadas com o auxílio dos programas DataWarrior (<https://openmolecules.org/datawarrior/>) e

pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>), permitindo estimar o perfil de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade dos compostos selecionados.

3.2 Experimentos *in vivo*

3.2.1 Amostra

Nesse trabalho foram utilizadas a taxifolina (Taxi), adquirida da Sigma-Aldrich Brasil (Lote BCCL3286) e doada gentilmente pelo Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães (PPGNS-UECE).

3.2.2 Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos com idade de 90 dias, tamanhos de $3,5 \pm 0,5$ cm e peso $0,4 \pm 0,1$ g foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Grupos de 40–50 peixes foram aclimatados em aquário de vidro de 9 L a temperatura ambiente (26 ± 2 °C) por 24 h, contendo água desclorada (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo cicardiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração *ad libitum* 24 h antes dos experimentos. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 04009489/2023 (Anexo 1).

3.2.3 Protocolo geral

Os testes foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães *et al.* (2017) e Ekambaram *et al.* (2017). No dia dos experimentos, os Zebrafish foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras testes ou controles, via intraperitoneal (*i.p.*) ou via oral (*v.o.*). Em seguida foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via intraperitoneal (*i.p.*) foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G. Para os tratamentos via oral (*v.o.*) foi usada pipeta automática variável de 20 µL. O comportamento dos animais foi registrado por analisadores calibrados e cegos.

3.2.4 Toxicidade aguda 96h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish adulto de acordo com a Organização de Cooperação Econômica e Método Padrão de Desenvolvimento (OECD, 1992) para determinar a LC₅₀-96h. Os animais (n=6/grupo) foram tratados, via oral (*v.o.*), com 20 µL

de Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (DSMO 3%; controle). Após os tratamentos foi avaliada a mortalidade dos Zebrafish a cada 24 horas. Após 96 h, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50 % dos animais (LC50) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (Arellano-Aguiar *et al.*, 2015).

3.2.5 Teste de Campo Aberto

O Teste de Campo (Magalhães *et al.*, 2017) foi realizado para avaliar o efeito sedativo ou relaxamento muscular dos animais tratados com amostras testadas antes da exposição ao AlCl₃ (100 µg/L; pH 5,8) (Kaur *et al.*, 2022). Os animais (n=6/grupo) foram tratados, via oral (v.o.), com 20 µL de Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (DSMO 3%; controle). Um grupo (n=6/grupo) sem tratamentos foi utilizado como controle (Naive). Após 1 h dos tratamentos via oral, os animais foram adicionados em placas de Petri (100 x 15 mm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e o efeito neuroprotetor foi analisado quanto à atividade locomotora natural dos Zebrafish, quantificado através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL), durante 0-5 minutos.

3.2.6 Atividade antinociceptiva comportamental

Foram selecionadas as concentrações das soluções das amostras testes que não alteraram atividade locomotora dos animais. As concentrações das soluções dos agentes nocivos: Formalina (0,1%; 5,0 µL; agonista TRPA1) ou salina hipertônica (NaCl 5M; 3,0 µL; agonista TRPV1) ou LPS (0,0625 mg/mL; 3,0 µL; Agonista TRPA1) e antagonistas: Capsazepina (antagonista TRPV1; 0,5 mg/mL; 5 µL); HC-030031 (antagonista TRPA1; 0,1 mg/mL; i.p.), bem como o tempo de análise de ação nociceptiva foram utilizadas baseando-se nos testes com roedores, nos quais foram padronizados em zebrafish conforme metodologias de Magalhães *et al.* (2017; 2018), Batista *et al.* (2018), Soares *et al.* (2019) e de Oliveira *et al.* (2025). Para as análises comportamentais, após tratamentos com agentes nociceptivos ou antagonistas, os animais foram, individualmente, adicionados em uma placa de Petri de vidro (100 x 15 mm), divididos em quadrantes, e a resposta nociceptiva ou antinociceptiva foi quantificada em termos de atividade locomotora (AL) ou cruzamentos de linhas (CL) realizadas durante um período de tempo determinado, específico para cada modelo descrito a seguir.

3.2.7 Comportamento nociceptivo induzido por formalina

O zebrafish adulto foi pré-tratado (20 µL; v.o.) com de Taxifolina (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou morfina (Mor; Controle positivo; 0,2 mg/mL; i.p.), ou veículo (Controle, DMSO

3%). Após 1 hora dos tratamentos via oral e 30 min via intraperitoneal, foi administrado uma injeção intramuscular de formalina (Agonista TRPA1; 0,1%; 5,0 µL; i.m.) na cauda dos animais (n=6/grupo). Um grupo sem tratamentos (Naive) também foi incluído. O efeito antinociceptivo foi caracterizado pelo aumento da AL na fase neurogênica (0-5 min), bem como na fase inflamatória (15 a 30 min), conforme metodologia proposta por Magalhães *et al.* (2017).

3.2.8 Comportamento nociceptivo corneal induzido por salina hipertônica

A nocicepção corneal foi induzida com solução salina hipertônica (agonista do TRPV1; NaCl 5,0 M; 5,0 µL), aplicada no olho direito dos animais (n = 6/grupo), 1 h após o pré-tratamento via oral de Taxifolina (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle negativo; DMSO 3%; 20 µL; v.o.), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,4 mg/mL; 20 µL; i.p.). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. O efeito antinociceptivo corneal foi caracterizado pelo aumento da AL durante 0-5 min de análise (Magalhães *et al.*, 2018).

Este teste foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos canais do TRPV1 (Ver resultados). Portanto, em um experimento subsequente, os animais (n = 6/grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com capsazepina (antagonista do TRPV1; 0,5 mg/mL; 20 µL; i.p.), 15 minutos antes da administração oral da menor dose eficaz de Taxifolina.

3.2.9 Comportamento nociceptivo abdominal induzido por Lipopolissacarídeo (LPS)

A nocicepção abdominal foi induzida com solução de Lipopolissacarídeo isolado de *Escherichia coli* (LPS; agonista TRPA1; 62,5 µg/mL; 3,0 µL), aplicada (i.p.) no abdômen dos animais (n = 6/grupo), 1 h após o pré-tratamento via oral com Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle negativo; DMSO 3%; 20 µL; v.o.), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,2 mg/mL; 5,0 µL; i.p.). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. O efeito antinociceptivo abdominal foi caracterizado pelo aumento da AL durante 0-5 min de análise (de Oliveira *et al.*, 2025).

Este teste também foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos canais do TRPA1. Portanto, em um experimento subsequente, os animais (n = 6/grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com HC-030031 (HC; antagonista TRPA1; 0,1 mg/mL; 5,0 µL; i.p.), 15 minutos antes da administração oral da menor dose eficaz da amostra teste

3.2.10 Comportamento nociceptivo induzido por glutamato

A nocicepção foi induzida com solução de glutamate (agonista NMDA; 12,5 μ M; 5,0 μ L), aplicada (i.p.) na calda dos animais ($n = 6$ /grupo), 1 h após o pré-tratamento via oral com Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle negativo; DMSO 3%; 20 μ L; v.o.), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,2 mg/mL; 5,0 μ L; i.p.). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. O efeito antinociceptivo foi caracterizado pelo aumento da AL durante 0-15 min de análise (Batista *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2019).

Este teste também foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos receptores glutamatérgicos (NMDA). Portanto, em um experimento subsequente, os animais ($n = 6$ /grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com ketamina (Keta; antagonista NMDA; 0,001 %; 5,0 μ L; i.p.), 15 minutos antes da administração oral da menor dose eficaz de Taxifolina.

3.2.11 Comportamento nociceptivo induzido por mentol

A nocicepção foi induzida com solução de mentol (agonista TRPM8; 1,2 mM; 5,0 μ L), aplicada (i.p.) na calda dos animais ($n = 6$ /grupo), 1 h após o pré-tratamento via oral com Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle negativo; DMSO 3%; 20 μ L; v.o.), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,2 mg/mL; 5,0 μ L; i.p.). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. O efeito antinociceptivo foi caracterizado pelo aumento da AL durante 0-10 min de análise (Ribeiro *et al.*, 2024).

Este teste também foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos canais iônicos TRPM8. Portanto, em um experimento subsequente, os animais ($n = 6$ /grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com AMTB (antagonista TRPM8; 0,3 mg/mL; 5,0 μ L; i.p.), 15 minutos antes da administração oral da menor dose eficaz de Taxifolina.

3.2.12 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi realizada sob edema abdominal induzido por carragenina, conforme descrito por Huang *et al.* (2014). Os animais ($n = 6$ /grupo) receberam os mesmos tratamentos dos testes nociceptivos, mas o controle positivo foi diclofenaco sódico (2,5 mg/mL; v.o.; 20 μ L). Após 1 h dos tratamentos, o Zebrafish recebeu, no abdômem, injeção de carragenina (1,4%; 20 μ L; i.p.). O efeito anti-inflamatório foi caracterizado com a diminuição do edema abdominal (EA), medindo-se o peso corporal dos animais, em miligramas (mg), antes (0h) e até 4 h após indução de inflamação (EA = PC4h - PC0h). Os animais foram sacrificados imediatamente para cessar as reações biológicas ao final do experimento.

3.2.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 9.0. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados em dois manuscritos, conforme descrito abaixo:

Manuscrito 1 - Caracterização *in silico* da Taxifolina como um ligante duplo da ciclooxigenase: possível papel na limitação da inflamação? **Status:** submetido.

Manuscrito 2 - Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do fitoterápico Taxifolina por meio de vias opioides, glutamatérgicas e de canais iônicos sensíveis ao ácido em zebrafish adultos (*Danio rerio*). **Status:** ainda não submetido.

4.1 Artigo 1

Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets

Título: Caracterização *in silico* da taxifolina como um ligante duplo da ciclooxigenase: possível papel na limitação da inflamação?

Título abreviado: Taxifolina é um ligante duplo da ciclooxigenase.

Autores:

José Calado Quilenda 1, 6; Sanseray da Silveira Cruz-Machado 1, 6; Malu de Andrade Marques 1, 6; Paulo Adenes Teixeira Coelho 2; João Gabriel Leite da Silva 2; Jonas Araújo de Sousa 2; Gabriela Alves do Nascimento 2; Francisco Bastos Cavalcante Sobrinho 2; Sacha Aubrey Alves Rodrigues Santos 3; Luzia Débora Saldanha Marques 2; Daniela Braga de Souza 2, 4, Maria Rayane Correia de Oliveira 2; Adriana Rolim Campos 3; Antônio Eufráasio Vieira-Neto 3; Francisco Ernani Alves Magalhães 2,4; Wagner Rodrigues de Assis Soares 1,6*

Afiliações do autor:

1. Programa de pós-graduação em Enfermagem e Saúde (PPGES). Departamento de Saúde II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié, Bahia, Brasil, CEP: 45.200-000.
2. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde (PPGNS), Grupo de Estudos NutriFisher (GENFISH), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil, CEP 60714-903
3. Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), Universidade de Fortaleza, UNIFOR, Fortaleza, Ceará, Brasil, CEP: 60811-905
4. Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, Rua Solon Medeiros, S/N, BR-020. Bairro Bezerra e Sousa, Tauá, Ceará, Brasil, CEP: 63660-000
5. Universidade de Fortaleza, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), Fortaleza, Ceará CEP: 60.811-650, Brasil
6. Laboratório de Ciências Biomédicas e Inovação. Departamento de Saúde II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié, Bahia, Brasil. CEP: 45.200-000

*** Autor correspondente:**

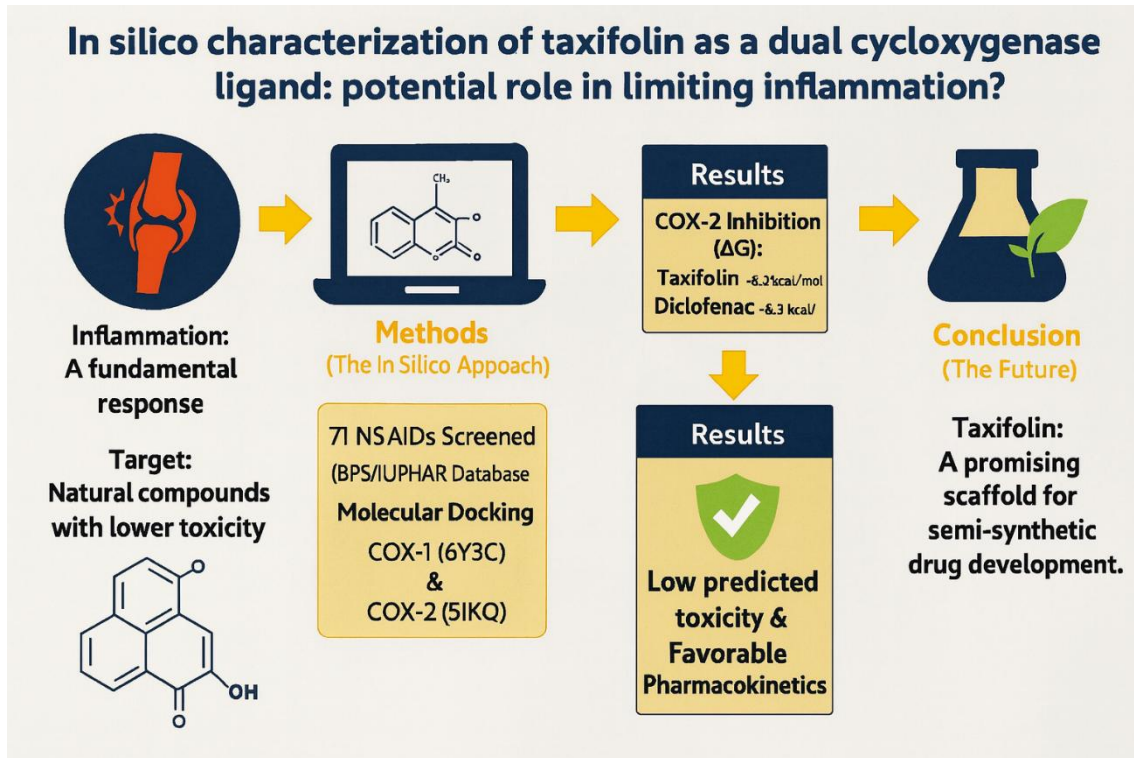
Wagner Rodrigues de Assis Soares: Programa de Pós-Graduação em Enfermagem e Saúde (PPGES). Departamento de Saúde II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié, Bahia, Brasil, CEP 45.200-000. E-mail: wrasoares@uesb.edu.br

Resumo Estruturado

Introdução/Objetivos: A inflamação é uma resposta fisiológica fundamental. No entanto, quando crônica, torna-se uma condição debilitante e de difícil manejo clínico. Os medicamentos atualmente disponíveis, como os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), embora eficazes, apresentam limitações significativas, incluindo toxicidade gastrointestinal e hepática, além de eficácia reduzida durante o tratamento prolongado. Nesse contexto, há um crescente interesse em compostos naturais com perfis farmacológicos distintos, como a taxifolina, um flavanonol encontrado em diversas espécies vegetais. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório *in silico* da taxifolina em comparação com medicamentos utilizados terapeuticamente. Métodos: Após a triagem de 71 AINEs identificados no Guia de Farmacologia BPS/IUPHAR e na literatura, seus perfis de ligação *in silico* foram comparados aos da taxifolina para avaliar a atividade contra as ciclooxigenases (COX-1: PDB ID 6Y3C e COX-2: PDB ID 5IKQ). Adicionalmente, os parâmetros *ADMET in silico* dos compostos mais promissores foram avaliados, com foco nas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas. Resultados: As análises de triagem virtual revelaram que diversas moléculas apresentaram potencial para inibir a COX-1, notadamente taxifolina (-7,5 kcal/mol), naproxeno (-7,9 kcal/mol), ácido meclofenâmico (-7,9 kcal/mol), suprofen (-7,7 kcal/mol), cetoprofeno (-7,7 kcal/mol) e diclofenaco (-6,6 kcal/mol). Em relação à inibição da COX-2, a taxifolina (-8,2 kcal/mol), o diclofenaco (-8,3 kcal/mol), o valdecoxibe (-9,1 kcal/mol), o flurbiprofeno (-9,1 kcal/mol), o rofecoxibe (-9,3 kcal/mol) e o celecoxibe (-10,5 kcal/mol) demonstraram as afinidades de energia de ligação mais favoráveis. As análises *ADMET* indicaram que a taxifolina apresenta um perfil farmacocinético e de segurança favorável, com menor toxicidade prevista em comparação com os AINEs avaliados. Conclusão: Em conjunto, este estudo fornece evidências que apoiam a taxifolina, um composto natural de interesse translacional, como uma estrutura para o desenvolvimento de análogos semissintéticos promissores.

Palavras-chave: Produtos naturais; Flavonoides; Taxifolina; Inflamação; Ciclooxigenase; Medicamentos anti-inflamatórios; Triagem *in silico*.

Resumo gráfico



1. Introdução:

As ciclooxigenases (COX, prostaglandina G/H sintase, PGHS) catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G₂ (PGG₂) e, subsequentemente, em prostaglandina H₂ (PGH₂), precursora das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (1). Esses mediadores participam da perfusão renal, proteção gástrica, função plaquetária, homeostase vascular e respostas patológicas como dor, febre e inflamação aguda e crônica. Portanto, a compreensão das características estruturais e da localização subcelular da COX-1 e da COX-2 pode revelar sítios de ligação essenciais baseados na estrutura, fomentando assim o desenvolvimento de fármacos e estratégias de reposicionamento direcionadas a vias anti-inflamatórias (2, 3).

Embora as ciclooxigenases catalisem a mesma reação, as isoformas diferem na regulação, distribuição tecidual e consequências da inibição. A COX-1 é predominantemente constitutiva, sustentando prostaglandinas gastroprotetoras, modulando o fluxo sanguíneo renal e gerando tromboxano A₂ nas plaquetas, o que explica grande parte dos efeitos adversos gastrointestinais e renais associados aos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) não seletivos (4). A COX-2, em contraste, é induzida por citocinas, padrões moleculares associados a patógenos e fatores de crescimento, atuando como fonte de prostaglandinas pró-inflamatórias em tecidos lesados e constituindo o principal alvo de inibidores seletivos (3, 5).

Em nível estrutural, substituições de aminoácidos perto do canal de acesso geram um bolso lateral maior na COX-2, capaz de acomodar coxibs e outros inibidores volumosos (2). Esse conhecimento impulsionou abordagens *in silico*, como triagem virtual e acoplamento molecular, combinadas com cálculos de energia livre e dinâmica molecular, para prever afinidade, pose de ligação e seletividade de isoformas, distinguindo assim padrões de interação entre coxibs e AINEs clássicos e abrindo caminhos para investigar pequenas moléculas de origem natural (6, 7).

A taxifolina (di-hidroquercetina), um flavonóide presente em diversas plantas e alimentos, exibe atividade antioxidante e evidências crescentes de efeitos anti-inflamatórios. Estudos *in vitro* e *in vivo* relatam reduções em diversas citocinas e mediadores inflamatórios (como IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS e COX-2), bem como modulação de vias de sinalização (como MAPK e PI3K/Akt), com efeitos protetores em modelos de fibrose hepática, lesão isquêmica e disfunção vascular (8, 9). Em muitos desses estudos, entretanto, a interferência com a COX-2 é descrita principalmente como modulação da expressão, em vez de inibição direta da atividade catalítica, o que representa uma lacuna em relação ao mecanismo de interação com o sítio ativo da enzima.

Apesar do crescente número de evidências que apoiam a relevância biológica da taxifolina, os mecanismos precisos subjacentes à sua atividade anti-inflamatória permanecem incompletamente compreendidos. A maioria dos relatos experimentais enfatiza sua capacidade de modular cascatas de sinalização a montante e reduzir a expressão de mediadores pró-inflamatórios; contudo, poucos estudos abordaram se a taxifolina pode interagir diretamente com alvos enzimáticos que são centrais para o processo inflamatório. Entre estes, as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) desempenham um papel fundamental, pois catalisam a biossíntese de prostanoídeos que regulam o tônus vascular, a agregação plaquetária e a amplificação das respostas inflamatórias. A distinção entre COX-1, uma isoforma constitutiva associada a funções homeostáticas, e COX-2, uma isoforma induzível ligada à inflamação patológica, orientou o desenvolvimento racional de inibidores seletivos nas últimas décadas (3). Entretanto, os efeitos adversos dos AINEs não seletivos e as limitações dos coxibs destacam a necessidade de alternativas mais seguras, com eficácia e tolerabilidade equilibradas. Nesse contexto, compostos naturais como a taxifolina oferecem uma estrutura promissora, combinando perfis farmacológicos favoráveis com

potencial de toxicidade reduzido (8, 9). Preencher a lacuna entre os efeitos biológicos descritivos e as interações em nível molecular é essencial para o avanço das aplicações translacionais. Abordagens computacionais, incluindo ancoragem molecular, triagem virtual e predições ADMET, fornecem ferramentas poderosas para explorar afinidades de ligação, seletividade de isoformas e comportamento farmacocinético *in silico*, complementando assim os dados experimentais e orientando as estratégias de desenvolvimento de fármacos (6, 7). Ao situar a taxifolina nesse contexto, torna-se possível avaliar não apenas sua capacidade teórica de inibir as enzimas COX, mas também sua adequação como composto líder para o planejamento de análogos semissintéticos. Em conjunto, essas considerações reforçam a justificativa para uma investigação *in silico* sistemática, vinculando diretamente a relevância biológica à modelagem farmacológica preditiva e abrindo caminho para aplicações translacionais na descoberta de fármacos anti-inflamatórios. Assim, este estudo tem como objetivo investigar a interação e analisar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET) da taxifolina em comparação com o estabelecido. Inibidores da ciclooxigenase usando simulações preditivas *in silico*.

Assim, este estudo tem como objetivo investigar a interação e analisar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET) da taxifolina em comparação com o estabelecido. Inibidores da ciclooxigenase usando simulações preditivas *in silico*.

2. Materiais e métodos

2.1. Ferramentas de triagem virtual, acoplamento molecular e ADMET

2.1.1. Pesquisa no DrugBank

Foi realizada uma busca no banco de dados IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology (<https://www.guidetopharmacology.org>), do qual foram selecionadas apenas as estruturas de 33 medicamentos anti-inflamatórios (AINEs) usados na terapia clínica que atuam seletivamente na COX-1 e 38 seletivos para COX-2, totalizando 71 compostos anti-inflamatórios.

2.1.2. Ferramentas de conjunto de dados, triagem virtual, ancoragem molecular e ADMETox

Todas as moléculas foram verificadas e preparadas utilizando o software Marvin Sketch™. As estruturas moleculares foram baixadas no formato SMILES e posteriormente convertidas para o formato 3D SDF utilizando o Open Babel™ (<https://sourceforge.net/projects/openbabel/>) para os cálculos de ancoragem molecular. As estruturas cristalográficas de COX-1 (PDB ID: 6Y3C, resolução de 3,36 Å) e COX-2 (PDB ID: 5IKQ, resolução de 2,41 Å), ambas de *Homo sapiens*, foram obtidas do Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org>). As estruturas proteicas foram preparadas utilizando o AutoDockTools™, incluindo a remoção das moléculas de água cristalográficas, a adição de hidrogênios polares e a atribuição de cargas, e posteriormente convertidas para o formato PDBQT para ancoragem molecular.

Simulações de acoplamento molecular entre as proteínas e os ligantes (71 AINEs seletivos) foram realizadas usando o AutoDock Vina™ (<https://vina.scripps.edu/downloads/>). A taxifolina, o composto natural de interesse neste estudo, foi adicionada ao painel como molécula de teste, embora não esteja listada no banco de dados como um inibidor clássico da ciclooxigenase.

Os resultados do acoplamento molecular e a avaliação de cada complexo receptor-ligante, incluindo a energia de afinidade de ligação ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) e o posicionamento do ligante no sítio ativo das ciclooxigenases 1 e 2, foram analisados utilizando o software PyMOL 2.1™, sendo selecionada para análises posteriores a

conformação que apresentou a menor energia de afinidade de ligação. Nove poses do ligante foram geradas para cada complexo, com suas respectivas energias de afinidade de ligação registradas. Posteriormente, todas as melhores poses ligante-proteína selecionadas foram representadas graficamente utilizando o PyMOL 2.1TM (<https://www.pymol.org/>), e seus respectivos mapas de interação 2D foram gerados utilizando o software Discovery Studio 4.5TM (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>). As propriedades ADMET foram avaliadas usando os softwares Data WarriorTM e PkCSMTM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>).

3. Resultados

3.1 Acomodamento molecular da taxifolina e dos AINEs com a COX-1

Conforme apresentado na Figura 1, a taxifolina se acomoda no canal catalítico da ciclooxygenase-1 (COX-1, PDB ID: 6Y3C), ocupando a cavidade de ligação interna típica dos AINEs. A visualização tridimensional revela que o anel aromático central permanece bem inserido na região hidrofóbica do sítio ativo, enquanto os grupos hidroxila periféricos se estendem em direção aos resíduos polares que circundam a cavidade, favorecendo a formação de interações específicas. O mapa de interação bidimensional revela que a taxifolina estabelece uma rede de contatos de van der Waals com diversos resíduos do sítio ativo, além de múltiplas ligações de hidrogênio convencionais com aminoácidos polares, como Gln192, Asn515, Gly354, Ser353 e Ser516. Interações hidrofóbicas e interações Pi-alquila também são observadas, envolvendo principalmente resíduos como His90, Thr94, Pro191, Pro514, Gly193, His95, His513 e Arg581 (Figura 2). Coletivamente, esse padrão de ligações de hidrogênio, contatos hidrofóbicos e interações Pi sugere uma ancoragem estável da taxifolina no sítio ativo da COX-1, consistente com o potencial inibitório proposto para esse composto.

Os resultados da modelagem molecular preditiva com COX-1 (PDB ID: 6Y3C) são apresentados na tabela 1 e sugerem uma afinidade favorável de todos os ligantes pelo sítio ativo, com energias de ligação calculadas variando de $-6,6$ a $-7,9$ kcal·mol⁻¹. No modelo in silico, o ácido meclufenâmico e o naproxeno exibiram as energias mais negativas ($-7,9$ kcal·mol⁻¹), seguidos pelo suprofeneno e cetoprofeneno ($-7,7$ kcal·mol⁻¹). A taxifolina apresentou uma energia de ligação estimada em $-7,5$ kcal·mol⁻¹, próxima aos melhores valores obtidos para os AINEs de referência. Esses achados indicam, em nível preditivo, uma potencial capacidade de interação da taxifolina com a COX-1 superior à observada para o diclofenaco ($-6,6$ kcal·mol⁻¹), embora a validação experimental ainda seja necessária.

Do ponto de vista estrutural, o padrão de interação calculado mostra que os ligantes exploram, em diferentes graus, resíduos considerados críticos para o sítio catalítico da COX-1, como Arg120, Gln192, Tyr355, Tyr385, Ile523 e Ser530, conforme descrito (10). O diclofenaco depende principalmente de interações de van der Waals com Tyr355, Tyr385 e Phe518, bem como de uma interação Pi-alquila com Ile523, além de exibir uma interação acceptor-acceptor desfavorável com Tyr385, o que pode contribuir para sua energia de ligação menos negativa. Em contraste, a taxifolina estabelece, no modelo, ligações de hidrogênio com Gln192, Ser516, His90 e His513, além de vários contatos de van der Waals ao longo do canal hidrofóbico, sugerindo uma ancoragem estável, embora com um padrão de interação parcialmente distinto daquele dos AINEs clássicos. De acordo com os cálculos, o suprofeneno, o cetoprofeneno, o ácido meclufenâmico e o naproxeno exibem perfis de interação compatíveis com inibidores da COX-1, combinando interações π -cátion com Arg120, contatos π -alquila e π -sigma, e múltiplas ligações de hidrogênio com Tyr355, Tyr385 e Ser530. Esses resultados, alinhados com o modelo estrutural da enzima, reforçam o papel desses resíduos na estabilização do ligante. Quando comparado a esses

fármacos, o taxifolina ocupa o mesmo sítio catalítico e apresenta uma afinidade prevista semelhante, o que pode indicar um possível mecanismo de inibição competitiva (Tabela 1).

3.2 Acoplamento molecular da taxifolina e dos AINEs com a COX-2

O modelo de acoplamento sugere que a taxifolina também se acomoda no canal catalítico da ciclooxigenase-2 (COX-2, PDB ID: 5IKQ), em uma região compatível com o sítio de ligação descrito para outros ligantes dessa enzima. Na visualização tridimensional, o flavonóide ocupa uma cavidade alongada dentro da proteína, com o núcleo aromático alinhado ao longo do túnel hidrofóbico e os grupos hidroxila orientados para a superfície interna do sítio ativo (Figura 3). O mapa de interação bidimensional indica que a taxifolina estabelece diversas forças de van der Waals com resíduos como Leu352, Val349, Leu384, Phe381 e Gly526, além de ligações de hidrogênio convencionais com Tyr385 e Ser530. Interações π - σ e π -alquila também são observadas, contribuindo para a acomodação do anel aromático no sítio hidrofóbico. Uma interação desfavorável entre doadores com HisA90 também está presente, o que pode atenuar parte da estabilização, mas não impede o conjunto geral de interações favoráveis (Figura 4). Em conjunto, esses resultados *in silico* sugerem um modo de ligação estável da taxifolina à COX-2, fornecendo uma base estrutural para hipóteses sobre a possível modulação dessa isoforma em estudos futuros.

A Tabela 2 resume os resultados preditivos de acoplamento molecular com COX-2 (PDB ID: 5IKQ), mostrando energias de ligação que variam de $-8,2$ a $-10,5$ kcal·mol⁻¹. Entre os inibidores de referência, o celecoxibe apresentou a energia mais negativa ($-10,5$ kcal·mol⁻¹), seguido pelo rofecoxibe ($-9,3$ kcal·mol⁻¹), valdecoxibe e flurbiprofeno (ambos com $-9,1$ kcal·mol⁻¹). A energia de ligação estimada para a taxifolina ($-8,2$ kcal·mol⁻¹) foi próxima à do diclofenaco ($-8,3$ kcal·mol⁻¹), sugerindo, em nível *in silico*, uma afinidade potencialmente relevante da molécula pelo sítio ativo da COX-2, embora menor do que a observada para COXibs seletivos. Esses resultados são consistentes com a organização do sítio catalítico e com a importância das interações específicas com os resíduos de COX-2 discutidas na literatura.

O padrão de interação calculado indica que os ligantes exploram diferencialmente resíduos-chave do sítio ativo, como His90, Arg120, Gln192, Tyr355, Tyr385, Arg513, Phe518, Val523 e Ser530. Para a taxifolina, o modelo indica interações de van der Waals distribuídas ao longo da cavidade e ligações de hidrogênio com Tyr355 e Tyr385, bem como um contato π - σ com Val523; no entanto, prevê-se uma interação doador-doador desfavorável com His90 (Udd), que pode atenuar parte da estabilização do complexo. Em contraste, os coxibs (valdecoxib, rofecoxib e celecoxib) exibem combinações mais extensas de ligações de hidrogênio (Co.hB) com His90, Arg120, Gln192, Tyr355 e Ser530, além de empilhamento π (Pi.Sig) e interações Pi-alquil com Tyr355, Phe518 e Val523, um padrão consistente com a alta afinidade e seletividade para COX-2 descrita (2). Esses dados preditivos sugerem que a taxifolina pode se posicionar dentro do mesmo sítio catalítico ocupado pelos inibidores clássicos, contribuindo para a formulação de hipóteses sobre a possível modulação da COX-2.

3.3 Previsão *in silico* das propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET)

As propriedades físico-químicas previstas para a taxifolina indicam uma molécula com fórmula molecular C₁₅H₁₂O₇ e massa molar de 304,25 g/mol. O baixo valor da fração Csp³ (0,13) e o número reduzido de ligações rotativas (RB = 1) sugerem uma estrutura relativamente rígida. Foram identificados sete aceptores de ligações de

hidrogênio e cinco doadores de ligações de hidrogênio (HBA = 7; HBD = 5), juntamente com uma refratividade molar (MR) de 74,76 e uma área de superfície polar topológica (TPSA) de 127,45 Å². O valor de LogP de 1,18, associado à classificação como solúvel pelo modelo ESOL, indica uma molécula com polaridade intermediária e boa solubilidade aquosa. A estrutura tridimensional e o SMILES canônico da taxifolina, bem como o gráfico de radar de suas propriedades, são apresentados na Tabela 3.

Os parâmetros físico-químicos avaliados para os compostos revelam um conjunto de características amplamente compatíveis com perfis favoráveis de absorção e permeabilidade, de acordo com a Regra dos Cinco de Lipinski. Todos os ligantes apresentaram zero violações, indicando que permanecem dentro dos limites clássicos para peso molecular, lipofilicidade, capacidade de doação e aceitação de ligações de hidrogênio e área de superfície polar. A taxifolina destacou-se por exibir maior polaridade (PSA = 127,45 Å²) e um maior número de grupos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio (HBD = 5; HBA = 7) quando comparada aos AINEs de referência, sugerindo um caráter mais hidrofílico. Essa distinção estrutural também se refletiu no menor valor de LogP (1,18), indicando lipofilicidade reduzida em relação a moléculas como diclofenaco, flurbiprofeno e ácido meclofenâmico, cujos valores de LogP variaram de 2,5 a 4,7 (Tabela 3). Este conjunto de propriedades posiciona a taxifolina como um composto com boa solubilidade e potencial para alta absorção em ambientes aquosos, embora sua área de superfície polar expandida possa limitar a permeabilidade em certos tecidos quando comparada a AINEs mais lipofílicos. Contudo, seu peso molecular moderado (304,25 g/mol) e a ausência de violações das regras de fármaco-like corroboram sua adequação como candidato farmacológico. Entre os compostos sintéticos avaliados, observou-se um padrão relativamente homogêneo: todos apresentaram valores de PSA entre 99 e 148 Å², valores de LogP variando de 2,5 a 4,7 e pesos moleculares abaixo de 400 g/mol, consistentes com o perfil de fármacos anti-inflamatórios amplamente utilizados.

Considerando o módulo de propriedades farmacocinéticas, a taxifolina apresentou previsão de alta absorção gastrointestinal (GIA alta) e ausência de penetração significativa através da barreira hematoencefálica (BHE não). O composto não foi identificado como substrato da glicoproteína P (P-gpS não) e não exibiu potencial inibitório relevante em relação às principais isoformas do citocromo P450 avaliadas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4, todas classificadas como não atuando ou interferindo no metabolismo dessas enzimas). O valor de Log K_p de -7,48 cm/s é consistente com baixa permeabilidade cutânea (Tabela 4).

Em relação aos perfis de lipofilicidade e de semelhança a fármacos, a taxifolina não apresentou violações das regras clássicas de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (todas com zero violações). O escore de biodisponibilidade (BAS) foi de 0,55, indicando uma probabilidade moderada de boa biodisponibilidade oral, e nenhum alerta estrutural foi detectado. O parâmetro de semelhança a um composto líder também foi zero, enquanto o escore de acessibilidade sintética (SA = 3,51) sugere um nível intermediário de complexidade sintética (Tabela 5). Em conjunto, esses resultados indicam que a taxifolina exibe um perfil *in silico* compatível com um candidato promissor, combinando propriedades físico-químicas favoráveis, bom potencial de absorção oral e ausência de alertas estruturais importantes.

De acordo com o perfil de toxicidade, os valores de DL₅₀ e a toxicidade máxima tolerada em humanos prevista para a taxifolina situam-se dentro de uma faixa considerada segura para ingestão humana, particularmente quando se consideram os valores de toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL), em comparação com os AINEs. Os compostos naturais apresentaram uma margem de segurança mais ampla para uso crônico. Além disso, não

foram observados alertas para toxicidade mutagênica, tumorigênica, no sistema reprodutivo ou irritante, enquanto que alertas foram identificados para diclofenaco, suprofen, rofecoxibe e ácido meclofenâmico.

4. Discussão

A inflamação continua sendo um grande desafio clínico, não apenas devido à sua alta prevalência em doenças musculoesqueléticas, autoimunes e metabólicas, mas também devido ao seu impacto socioeconômico e à redução substancial na qualidade de vida dos pacientes. Embora os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) sejam amplamente prescritos, suas limitações são bem documentadas e estão amplamente associadas a efeitos adversos gastrointestinais e hepáticos, bem como a um risco cardiovascular aumentado, particularmente durante o uso prolongado (11–14). Nesse contexto, há um crescente interesse em alternativas terapêuticas mais seguras, incluindo compostos naturais com potencial farmacológico distinto, como os flavonoides (15, 16).

A taxifolina (di-hidroquercetina) é um flavanonol encontrado em diversas espécies vegetais, incluindo *Larix sibirica* e *Silybum marianum* (17). Estudos pré-clínicos demonstraram suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, sugerindo seu potencial como agente terapêutico em condições inflamatórias e metabólicas (18). A capacidade da taxifolina de modular vias de sinalização relacionadas ao estresse oxidativo e às respostas inflamatórias, como NF- κ B e MAPK, reforça ainda mais sua relevância como um promissor candidato anti-inflamatório (15). A aplicação de abordagens *in silico*, incluindo ancoragem molecular e análises ADMET, permite a identificação de potenciais interações com alvos farmacológicos relevantes, como as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), antes de avançar para estudos *in vitro* e *in vivo* (19, 20).

Os resultados *in silico* obtidos neste estudo demonstram que a taxifolina apresenta afinidade de ligação comparável tanto para COX-1 quanto para COX-2. Para COX-1, sua energia de ligação (-7,5 kcal/mol) foi comparável à de fármacos clássicos como o naproxeno (-7,9 kcal/mol) e o ácido meclofenâmico (-7,9 kcal/mol). Em relação à COX-2, a taxifolina (-8,2 kcal/mol) apresentou energia de ligação semelhante à do diclofenaco (-8,3 kcal/mol) e afinidades dentro da faixa competitiva em relação aos coxibs, como o rofecoxib (-9,3 kcal/mol) e o celecoxib (-10,5 kcal/mol). Esses achados sugerem que a taxifolina pode atuar como um inibidor duplo de COX, com potencial para reduzir a inflamação por meio de mecanismos semelhantes aos dos AINEs, mas possivelmente com menor toxicidade (18). Dado o número limitado de estudos que abordam os seus mecanismos de interação molecular com as ciclooxigenases humanas, estes resultados contribuem com novas informações sobre o seu potencial anti-inflamatório e perfil de segurança (21, 22).

A seletividade entre COX-1 e COX-2 é um aspecto crítico da farmacologia dos AINEs, visto que os fármacos que interagem seletivamente com o sítio ativo da COX-2 estão associados a uma melhor eficácia anti-inflamatória (21). Enquanto a inibição da COX-2 está ligada ao efeito anti-inflamatório desejado, a inibição da COX-1 pode levar a efeitos adversos gastrointestinais (23). O perfil observado para a taxifolina, caracterizado por afinidade moderada pela COX-1 e afinidade de ligação comparável pela COX-2, sugere um equilíbrio que poderia ser explorado para reduzir os efeitos colaterais sem comprometer a eficácia (16).

A taxifolina acomoda-se profundamente no canal catalítico da COX-1, ocupando a cavidade interna tipicamente associada à ligação de AINEs. Sua interação com aminoácidos na região hidrofóbica do sítio ativo favorece a ligação a resíduos polares circundantes, permitindo a formação de contatos de van der Waals e múltiplas ligações de hidrogênio convencionais, notadamente envolvendo His90. Essa interação sugere uma ancoragem estável, embora com um padrão de interação parcialmente distinto daquele dos AINEs clássicos, que não interagem

com esse resíduo. Esses resultados, alinhados com o modelo estrutural da enzima, sugerem um papel potencial desses resíduos na estabilização de um ligante natural quando comparado a AINEs sintéticos. A taxifolina ocupa o mesmo sítio catalítico e exibe afinidade prevista semelhante, corroborando um possível mecanismo de inibição competitiva (10).

Um modo de ligação semelhante foi observado para a taxifolina dentro do canal catalítico da ciclooxigenase-2 (COX-2, PDB ID: 5IKQ), em uma região consistente com o sítio de ligação descrito para outros inibidores da COX-2. A taxifolina estabeleceu interações de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações π - σ e π -alquila, contribuindo para a acomodação de seu anel aromático dentro do bolso hidrofóbico. Notavelmente, uma interação com His90 também foi identificada, a qual pode atenuar parcialmente a estabilização do complexo, mas não impede a formação de uma rede de interação favorável. Essa interação de resíduos também foi observada para celecoxib, rofecoxib e valdecoxib, que são inibidores altamente seletivos da COX-2 (24). Esses achados são consistentes com a organização do sítio catalítico e com a importância de interações específicas de resíduos na COX-2, refletindo um padrão compatível com a alta afinidade e seletividade descritas (2). Coletivamente, esses dados preditivos indicam que a taxifolina pode ocupar o mesmo sítio catalítico que os inibidores clássicos, contribuindo para hipóteses sobre sua potencial modulação da COX-2 (10).

Os flavonoides, amplamente distribuídos em espécies vegetais, apresentam diversas aplicações terapêuticas em humanos devido às suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antivirais, anti-inflamatórias e antialérgicas, que foram extensivamente demonstradas em vários estudos pré-clínicos e clínicos, oferecendo, assim, perspectivas terapêuticas promissoras (25, 26). Essas propriedades sustentam sua ampla aplicabilidade na medicina (27). No entanto, uma compreensão abrangente de suas propriedades farmacocinéticas, características de similaridade a fármacos e perfis de segurança é essencial para a aplicabilidade translacional dessas moléculas em contextos clínicos (18, 28).

As análises ADMET revelaram que a taxifolina apresenta boa biodisponibilidade oral e ausência de alertas de toxicidade significativos, ao contrário de vários AINEs que frequentemente apresentam hepatotoxicidade e nefrotoxicidade durante o uso prolongado (22, 23). Além disso, a taxifolina demonstrou características farmacocinéticas previstas favoráveis, incluindo absorção adequada, perfil de distribuição apropriado, ausência de interação com enzimas CYP450 (sugerindo estabilidade metabólica) e excreção facilitada. Esses resultados reforçam a hipótese de que compostos naturais, como a taxifolina, podem oferecer oportunidades terapêuticas em comparação com os fármacos sintéticos tradicionais, particularmente para pacientes submetidos a tratamento de longo prazo para doenças inflamatórias crônicas e que apresentam maior risco de eventos adversos (29).

Apesar da ampla gama de propriedades benéficas, o desenvolvimento de fármacos à base de flavonoides é frequentemente dificultado pela sua baixa biodisponibilidade (30). No entanto, novas estratégias têm sido propostas para melhorar a sua biodisponibilidade *in vivo*, incluindo o desenvolvimento de sistemas de administração inovadores, como nanopartículas, lipossomas e carreadores lipídicos sólidos, com o objetivo de aumentar a estabilidade, a absorção e a liberação direcionada (28, 31). Além disso, modificações estruturais, incluindo metilação, acetilação e desidroxilação, têm sido empregadas como estratégias para alterar as características estruturais dos compostos originais, visando aumentar a absorção e a biodisponibilidade. Essas abordagens podem facilitar o desenvolvimento de uma série de novos compostos bioativos semissintéticos com potencial anti-inflamatório derivados da taxifolina (31).

Os resultados do presente estudo sugerem que a taxifolina pode ser considerada uma candidata promissora para o desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios. Sua atividade multialvo, combinada com um perfil de segurança favorável, abre perspectivas para formulações farmacêuticas inovadoras, incluindo análogos semissintéticos projetados para otimizar a potência e a seletividade (18). Além disso, a taxifolina pode ser explorada em doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos, onde o controle da inflamação é essencial (32). O potencial translacional da taxifolina também se estende ao campo da imunomodulação, visto que os flavonoides têm sido associados à regulação das respostas imunes e à modulação de citocinas pró-inflamatórias. Essa característica pode ser particularmente relevante em doenças autoimunes e inflamatórias sistêmicas (31).

Apesar desses resultados promissores, é importante reconhecer as limitações inerentes aos estudos *in silico*. A precisão dos modelos de acoplamento molecular depende da qualidade das estruturas cristalográficas utilizadas e dos parâmetros computacionais aplicados (22). Além disso, os resultados obtidos não substituem a necessidade de validação experimental. Ensaios *in vitro* e *in vivo* são essenciais para confirmar a eficácia e a segurança da taxifolina, bem como para avaliar o metabolismo, a biodisponibilidade real e as potenciais interações medicamentosas (18, 32).

5. Conclusão

Os resultados *in silico* deste estudo demonstram que a taxifolina apresenta um perfil promissor como potencial agente anti-inflamatório, mostrando afinidade competitiva pelos sítios catalíticos de ambas as isoformas da ciclooxigenase, COX-1 e COX-2, com energias de ligação comparáveis às dos AINEs clássicos e dos coxibs utilizados clinicamente. As análises de acoplamento molecular indicaram que a taxifolina se acomoda de forma estável no canal catalítico de ambas as isoformas, estabelecendo interações favoráveis com resíduos-chave envolvidos na inibição enzimática, o que corrobora um possível mecanismo de inibição competitiva. Além disso, as previsões farmacocinéticas e toxicológicas revelaram um perfil ADMET favorável, caracterizado por boa absorção gastrointestinal, ausência de interações relevantes com isoformas do citocromo P450 e baixa toxicidade prevista, contrastando com os efeitos adversos comumente associados ao uso prolongado de AINEs sintéticos.

Em conjunto, os dados apoiam a taxifolina como um composto natural de interesse translacional, com potencial para o desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios ou derivados semissintéticos visando otimizar a potência, a seletividade e a biodisponibilidade. No entanto, a validação experimental por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* é necessária para confirmar sua eficácia farmacológica, segurança e aplicabilidade clínica.

Aprovação Ética e Consentimento para Participação: Não aplicável.

Direitos Humanos e Direitos dos Animais: Não aplicável.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflitos de interesse em relação a este artigo.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio financeiro das agências e instituições de fomento que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, incluindo a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e a Fundação Cearense de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). JCQ é bolsista de pós-graduação do Programa de Mobilidade Internacional GCUB na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). MAM é bolsista de pós-graduação na UESB. SSCM é pesquisador de pós-doutorado na UESB.

Contribuições dos autores: JCQ e WRAS realizaram a análise formal dos dados e prepararam as figuras e tabelas. JCQ, SSCM e WRAS conceberam o estudo e redigiram o manuscrito. WRAS forneceu recursos essenciais para o estudo. Todos os autores editaram, revisaram e aprovaram a versão final do manuscrito a ser enviada para a revista *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*.

Referências

1. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 May;31(5):986-1000. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449.
2. Orlando BJ, Malkowski MG. Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2016 Oct 1;72(Pt 10):772-776. doi:10.1107/S2053230X16014230.
3. Ju Z, Li M, Xu J, Howell DC, Li Z, Chen FE. Recent development on COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: The past 10 years. *Acta Pharm Sin B.* 2022 Jun;12(6):2790-2807. doi:10.1016/j.apsb.2022.01.002.
4. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest.* 2001;107(12):1491-1495. doi:10.1172/JCI13271.
5. Faki Y, Er A. Different chemical structures and physiological/pathological roles of cyclooxygenases. *Rambam Maimonides Med J.* 2021 Jan 19;12(1):e0003. doi:10.5041/RMMJ.10426.
6. Bello-Vargas E, Leyva-Peralta MA, Gómez-Sandoval Z, Ordóñez M, Razo-Hernández RS. A computational method for the binding mode prediction of COX-1 and COX-2 inhibitors: analyzing the union of coxibs, oxicams, propionic and acetic acids. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023 Dec 4;16(12):1688. doi:10.3390/ph16121688.
7. Ahmad V, Khan MI, Jamal QMS, Alzahrani FA, Albiheyri R. Computational molecular docking and simulation-based assessment of anti-inflammatory properties of *Nyctanthes arbor-tristis* Linn phytochemicals. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024;17(1):18. doi:10.3390/ph17010018.

8. Zhang X, Lian X, Li H, Zhao W, Li X, Zhou F, Zhou Y, Cui T, Wang Y, Liu C. Taxifolin attenuates inflammation via suppressing MAPK signal pathway in vitro and in silico analysis. *Chin Herb Med.* 2022 Sep 1;14(4):554-562. doi:10.1016/j.chmed.2021.03.002.
9. Liu X, Liu W, Ding C, Zhao Y, Chen X, Ling D, Zheng Y, Cheng Z. Taxifolin, Extracted from Waste Larix olgensis Roots, Attenuates CC14-Induced Liver Fibrosis by Regulating the PI3K/AKT/mTOR and TGF- β 1/Smads Signaling Pathways. *Drug Des Devel Ther.* 2021 Feb 26;15:871-887. doi:10.2147/DDDT.S281369.
10. Kaur B, Singh P. Inflammation: Biochemistry, cellular targets, anti-inflammatory agents and challenges with special emphasis on cyclooxygenase-2. *Bioorg Chem.* 2022 Apr;121:105663. doi:10.1016/j.bioorg.2022.105663.
11. Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm Res.* 1998 Oct;47 Suppl 2:S78-87. doi:10.1007/s000110050284.
12. Warner TD, Mitchell JA. COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet.* 2008 Jan 19;371(9608):270-3. doi:10.1016/S0140-6736(08)60137-3.
13. Moore RA, Derry S, McQuay HJ. Cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: balancing gastrointestinal and cardiovascular risk. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007 Aug 3;8:73. doi:10.1186/1471-2474-8-73.
14. Scheiman JM. Balancing risks and benefits of cyclooxygenase-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Gastroenterol Clin North Am.* 2009 Jun;38(2):305-14. doi:10.1016/j.gtc.2009.03.006.
15. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5:e47. doi:10.1017/jns.2016.41.
16. Safe S, Jayaraman A, Chapkin RS, Howard M, Mohankumar K, Shrestha R. Flavonoids: structure–function and mechanisms of action and opportunities for drug development. *Toxicol Res.* 2021;37(2):147-162. doi:10.1007/s43188-020-00080-z.
17. Chen X, Fei HX, Zhou ZG, Huang SM. Research progress on pharmacological effects of dihydroquercetin. *Res Prog Pharmacol Eff Dihydroquercetin.* 2017;45:90-92. doi:10.19664/j.cnki.1002-2392.2017.01.026.
18. Liu Y, Shi X, Tian Y, Zhai S, Liu Y, Xiong Z, Chu S. An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin. *Front Pharmacol.* 2023 May 12;14:1173855. doi:10.3389/fphar.2023.1173855.
19. Singh S, Singh PK, Sachan K, Kumar M, Bhardwaj P. Automation of drug discovery through cutting-edge in-silico research in pharmaceuticals: challenges and future scope. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2024;20(6):723-735. doi:10.2174/0115734099260187230921073932.
20. Al-Mohaya M, Mesut B, Kurt A, Çelik YS. In silico approaches which are used in pharmacy. *J Appl Pharm Sci.* 2024 Apr;14(4):239-253. doi:10.7324/JAPS.2024.154854.
21. Janakiramulu P, Mamidala E. Molecular docking and dynamic simulation analysis of flavonoid derivatives as COX-2 inhibitors. *In Silico Pharmacol.* 2025 Apr 16;13(2):59. doi:10.1007/s40203-025-00349-x.
22. Derardja I, Rebai R, Toumi ME, Kebaili FF, Boudah A. Identification of new potential cyclooxygenase-2 inhibitors using structure-based virtual screening, molecular dynamics and pharmacokinetic modelling. *Biol Life Sci Forum.* 2024;35(1):6. doi:10.3390/blsf2024035006.

23. Davies NM, Smith GD, Windmeijer F, Martin RM. COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastrointestinal tract complications and myocardial infarction: an instrumental variable analysis. *Epidemiology*. 2013 May;24(3):352-362. doi:10.1097/EDE.0b013e318289e024.
24. Rodrigues P, Bangali H, Hammoud A, Mustafa YF, Al-Hetty HRAK, Alkhafaji AT, Deorari MM, Al-Tae MM, Zabibah RS, Alsalamy A. COX 2-inhibitors; a thorough and updated survey into combinational therapies in cancers. *Med Oncol*. 2024 Jan 2;41(1):41. doi:10.1007/s12032-023-02256-7.
25. Zheng X, Zhang X, Zeng F. Biological functions and health benefits of flavonoids in fruits and vegetables: a contemporary review. *Foods*. 2025;14(2):155. doi:10.3390/foods14020155.
26. Chavda VP, Patel AB, Mistry KJ, Suthar SF, Wu ZX, Chen ZS, Hou K. Nano-drug delivery systems entrapping natural bioactive compounds for cancer: recent progress and future challenges. *Front Oncol*. 2022 Mar 29;12:867655. doi:10.3389/fonc.2022.867655.
27. Kurek-Górecka A, Górecki M, Rzepecka-Stojko A, Balwierz R, Stojko J. Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*. 2020;25(3):556. doi:10.3390/molecules25030556.
28. Dubey AK, Chandragiri SS, Geevarghese AV, Kapoor B, Gulati M, Rani P, et al. Exploring the pharmacokinetics, drug-likeness, and toxicological features of anticancer flavonoids: a Boulevard to explore their clinical translational potential. *Front Pharmacol*. 2025 Oct 3;16:1648395. doi:10.3389/fphar.2025.1648395.
29. Sonu, Kamal YT, Gautam GK, Mishra AK, Parveen BR, Kumar A, Singh M, Singh H. Synthesis, characterization, molecular docking and pharmacological evaluation of isoxazole derivatives as potent anti-inflammatory agents. *Heliyon*. 2024 Nov 15;10(22):e40300. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e40300.
30. Taldaev A, Svtin AA, Obukhov SI, Terekhov RP, Selivanova IA. Modification of biopharmaceutical parameters of flavonoids: a review. *Front Chem*. 2025 Apr 29;13:1602967. doi:10.3389/fchem.2025.1602967.
31. Hu L, Luo Y, Yang J, Cheng C. Botanical flavonoids: efficacy, absorption, metabolism and advanced pharmaceutical technology for improving bioavailability. *Molecules*. 2025 Mar 6;30(5):1184. doi:10.3390/molecules30051184.
32. Shaker B, Ahmad S, Lee J, Jung C, Na D. In silico methods and tools for drug discovery. *Comput Biol Med*. 2021;137:104851. doi:10.1016/j.combiomed.2021.104851.

Lista de figuras, tabelas e legendas:

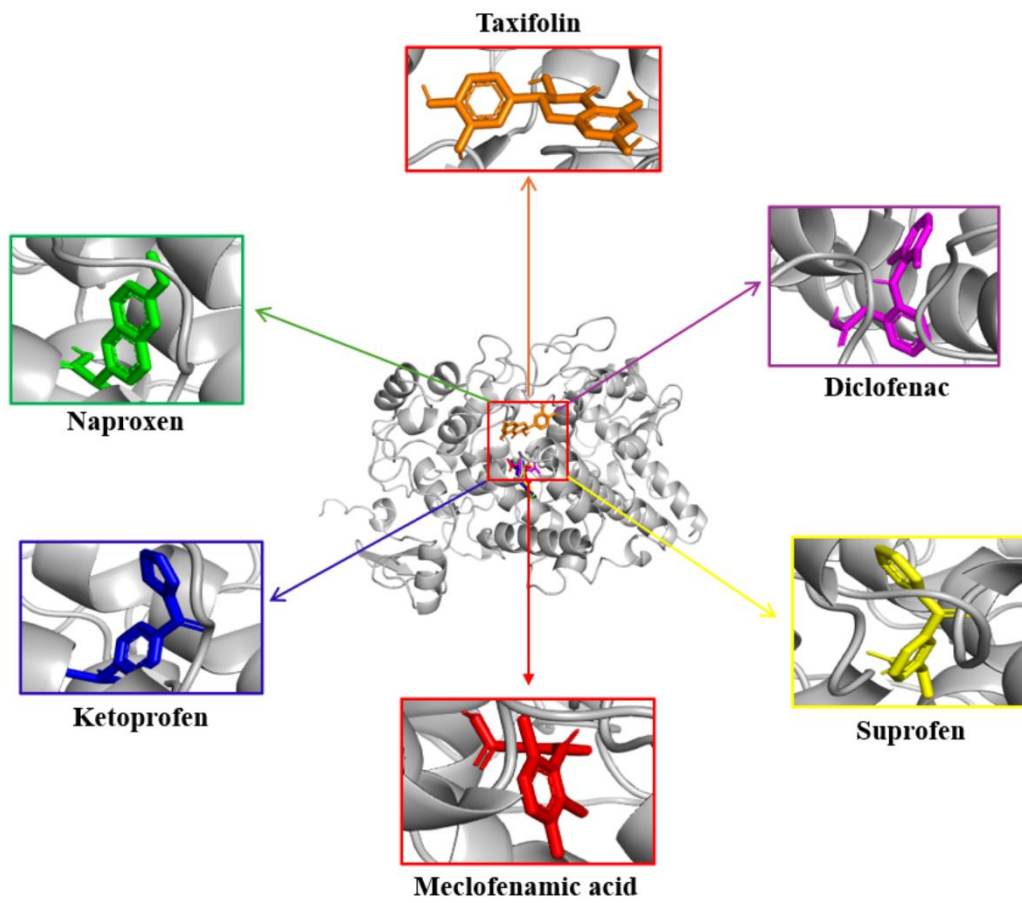


Figura 1. Representação tridimensional da ciclooxygenase-1 (COX-1; PDB ID: 6Y3C) mostrando a interação com ligantes seletivos acoplados ao sítio ativo. A taxifolina é representada em laranja e está acomodada dentro do canal catalítico da COX-1 (em cinza), ocupando a cavidade de ligação interna característica associada a anti-inflamatórios não esteroides (AINEs).

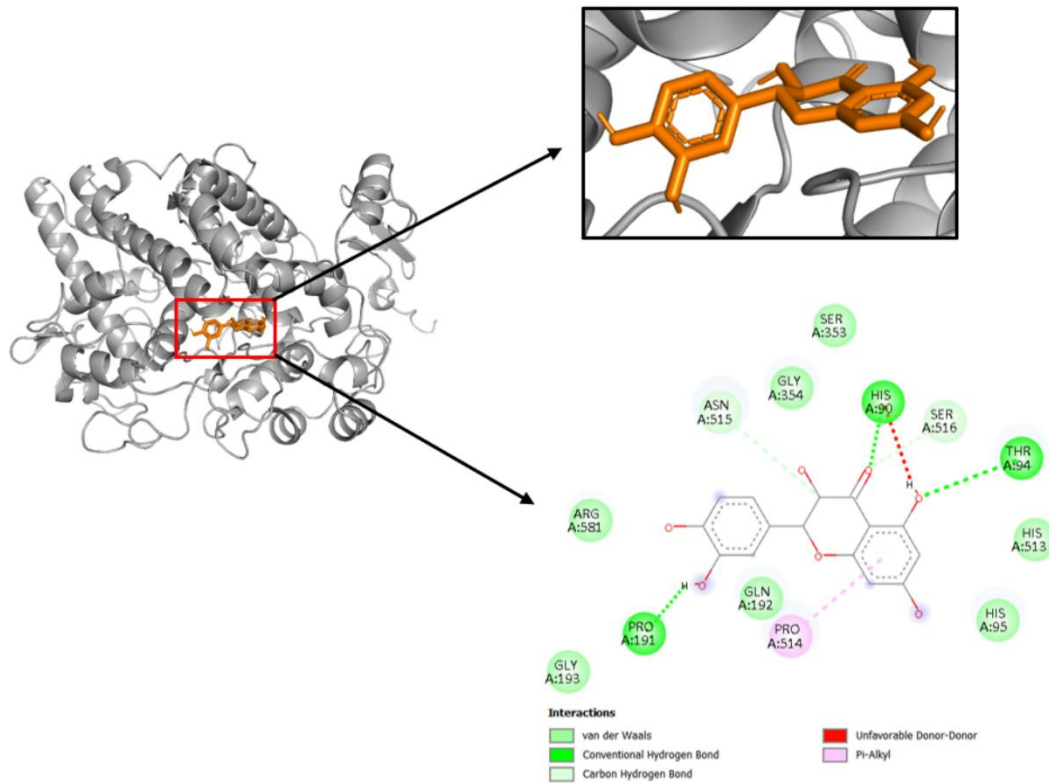


Figura 2. Mapa de interação bidimensional da taxifolina acoplada ao sítio ativo da ciclooxigenase-1 (COX-1; PDB ID: 6Y3C). O diagrama ilustra a rede de interações que estabilizam a taxifolina dentro do canal catalítico, incluindo contatos de van der Waals, ligações de hidrogênio convencionais e interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos chave que revestem o sítio ativo. Esse padrão de interação corrobora a acomodação estável da taxifolina na cavidade de ligação de AINEs característica da COX-1.

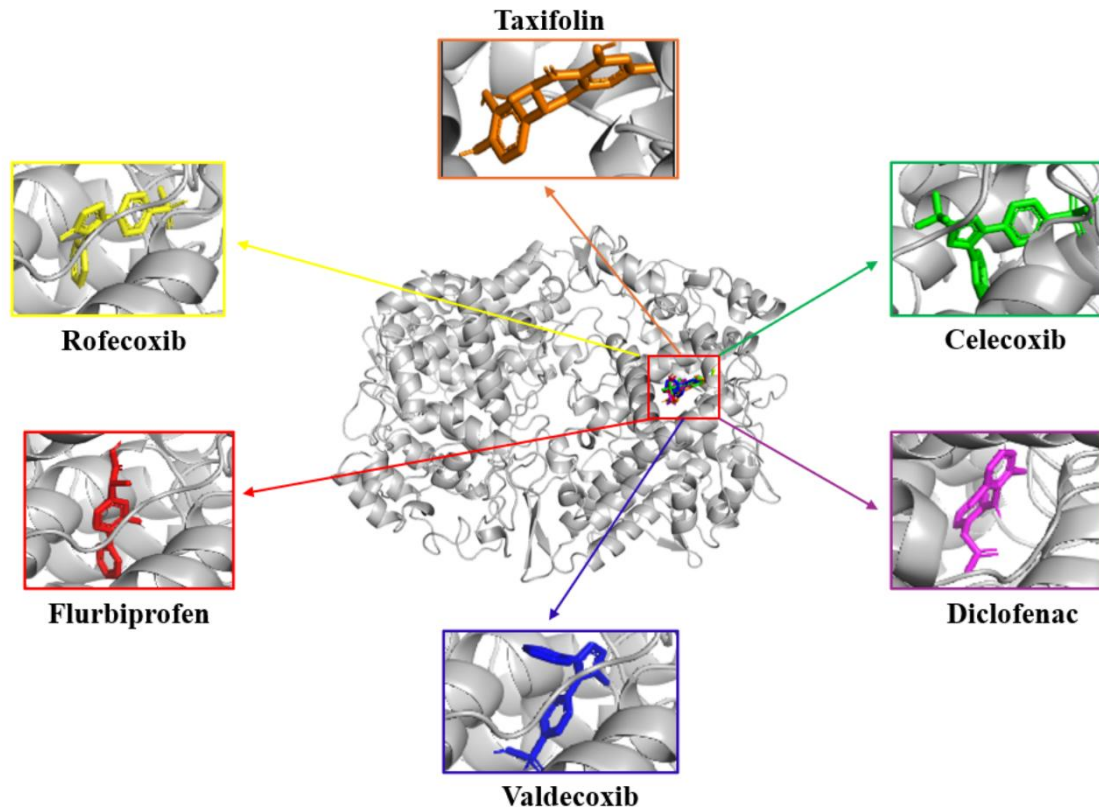


Figura 3. Visualização tridimensional da interação entre a taxifolina e a ciclooxigenase-2 (COX-2; PDB ID: 5IKQ) obtida por análise de acoplamento molecular. A taxifolina, mostrada em laranja, está acomodada no canal catalítico da COX-2, ocupando a cavidade hidrofóbica alongada característica dos inibidores da COX-2. A orientação do núcleo aromático ao longo do túnel de ligação e o posicionamento dos grupos hidroxila em direção aos resíduos polares destacam um modo de ligação compatível com a acomodação estável do ligante no sítio ativo.

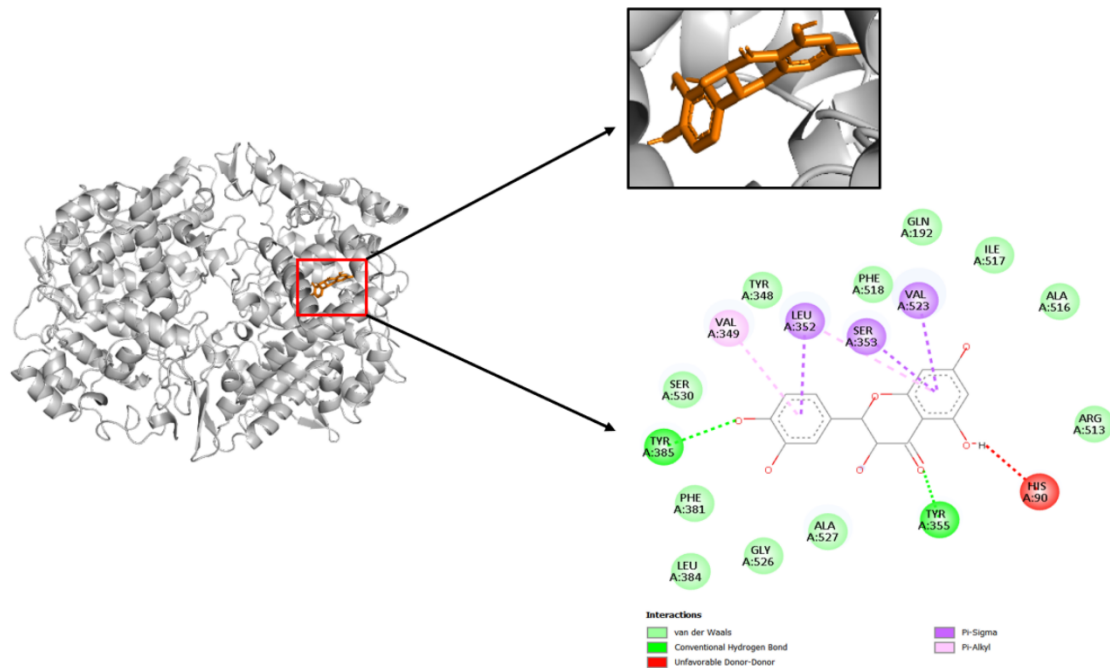


Figura 4. Mapa de interação bidimensional da taxifolina acoplada ao sítio ativo da ciclooxigenase-2 (COX-2; PDB ID: 5IKQ). O diagrama destaca a rede de interações que estabilizam a taxifolina dentro do sítio catalítico, incluindo contatos de van der Waals, ligações de hidrogênio convencionais e interações hidrofóbicas com resíduos que revestem o sítio ativo da COX-2. Interações π - σ e π -alquila contribuem para a acomodação do anel aromático dentro do canal hidrofóbico, corroborando um modo de ligação compatível com o descrito para inibidores clássicos da COX-2.

Tabela 1. Interações e energia de ligação de compostos com aminoácidos específicos da COX-1 (ID PDB: 6Y3C).

Compostos	ΔG (kcal/mol)	Dele 90	Arg 120	Gln 192	Tyr 355	Tyr 385	Dele 513	Ser 516	Phe 518	Ilha 523	Ser 530
Taxifolin	-7,5	Co.hB	Nenhu m	VW	Nenhu m	Nenhu m	VW	ChB	Nenhu m	Nenhu m	Nenhu m
Naproxeno	-7,9	Nenhu m	Co.hB	Nenhu m	VW	VW	Nenhu m	Nenhu m	Alquil	VW	VW
Ácido meclofenâmi co	-7,9	Nenhu m	VW	Nenhu m	VW	VW	Nenhu m	Nenhu m	VW	VW	Pi.dhb
Suprofen	-7,7	Nenhu m	Pi.Gat o	Nenhu m	Co.hB	VW	Nenhu m	Nenhu m	VW	VW	Co.hB
Cetoprofeno	-7,7	Nenhu m	Co.hB	Nenhu m	Co.hB	VW	Nenhu m	Nenhu m	Alquil	Pi.Sig	Co.hB
Diclofenaco	-6,6	Nenhu m	VW	Nenhu m	VW	Uaa	Nenhu m	Nenhu m	VW	Pi-Alk	VW

As interações incluem forças de van der Waals (Vw), ligações carbono-hidrogênio (ChB), interações alquila (Alkyl), ligações de hidrogênio convencionais (Co.hB), interações pi-alquila (Pi-Alk), interações pi-sigma (Pi.Sig), interações aceitador-aceitador desfavoráveis (Uaa), interações pi-cátion (Pi.Cat), ligações de hidrogênio pi-doador (Pi.dhb) ou nenhuma interação (None).

Tabela 2. Interações e energia de ligação de compostos com aminoácidos específicos da COX-2 (ID PDB: 5IKQ).

Compostos	ΔG (kcal/mol)	Dele 90	Arg 120	Gln 192	Tyr 355	Tyr 385	Arg 513	Ala 516	Phe 518	Val 523	Ser 530
Taxifolin	-8,2	Udd	Nenhum	VW	Co.hB	Co.hB	VW	VW	VW	Pi.Sig	VW
Diclofenaco	-8,3	Nenhum	Nenhum	Nenhum	VW	Udd	Nenhum	Nenhum	VW	Pi- Alk	VW
Valdecoxib	-9,1	VW	VW	Nenhum	Pi.Sig	Co.hB	Nenhum	Nenhum	Alquil	Pi.Sig	Co.hB
Flurbiprofeno	-9,1	Nenhum	Co.hB	Nenhum	Udd	VW	Nenhum	Nenhum	VW	Pi- Alk	VW
Rofecoxib	-9,3	ChB	Nenhum	VW	VW	Nenhum	VW	VW	Co.hB	Pi.Sig	VW
Celecoxib	-10,5	ChB	ChB	Co.hB	Co.hB	Alquil	Nenhum	VW	Co.hB	Pi.Sig	Nenhum

As interações incluem forças de van der Waals (Vw), ligações carbono-hidrogênio (ChB), interações alquila (Alkyl), ligações de hidrogênio convencionais (Co.hB), interações pi-alquila (Pi-Alk), interações pi-sigma (Pi.Sig), interações aceitador-aceitador desfavoráveis (Uaa), interações pi-cátion (Pi.Cat), ligações de hidrogênio pi-doador (Pi.dhb) ou nenhuma interação (None).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos e Regra dos Cinco de Lipinski para os compostos avaliados.

Molécula	HBA	Feliz aniversário!	LogP	MW	PSA	Regra dos 5
Taxifolin	7	5	1.18	304,25	127,45	0
Diclofenaco	2	2	4,36	296,15	120,33	0
Suprofen	3	1	3.16	260,31	108,70	0
Cetoprofeno	2	1	3.10	254,28	111.06	0
Naproxeno	2	1	3.03	230,26	99,64	0
Valdecoxib	4	1	2,96	314,36	127,97	0
Flurbiprofeno	1	1	3,68	244,26	104,70	0
Rofecoxib	4	0	2,55	314,36	128,51	0
Celecoxib	4	1	3,51	381,37	147,48	0
Ácido meclofenâmico	2	2	4,74	296,15	120,33	0

HBA: aceptores de ligação de hidrogênio; HBD: doadores de ligação de hidrogênio; LogP: lipofilicidade; MW (g/mol): peso molecular; PSA (Å²): área de superfície polar; Regra dos 5: regra dos cinco de Lipinski.

Tabela 4. Parâmetros farmacocinéticos previstos para compostos com base no modelo pkCSM.

Moléculas	% Absorvido	VDss	Fu	CYP	HEPT	TC
Taxifolin	69,34	-0,99	0,33	Não	Não	-0,03
Diclofenaco	91,92	-1,60	0	Não	Não	0,29
Suprofen	100	-1,87	0,11	Não	Não	0,18
Cetoprofeno	100	-1,94	0,07	Não	Não	0,28
Naproxeno	97,94	-1,61	0,13	Não	Não	0,19
Valdecoxib	94,57	-0,40	0,16	Não	Sim	0,84
Flurbiprofeno	99,60	-2,05	0,01	Não	Não	0,15
Rofecoxib	98,41	-0,61	0	Não	Sim	0,88
Celecoxib	92,99	-0,27	0,13	Sim	Sim	0,43
Ácido meclofenâmico	93,84	-2,13	0	Não	Não	0,33

Absorvido: percentagem absorvida; VDss: volume de distribuição no estado de equilíbrio ($\log L \cdot \text{kg}^{-1}$); Fu: fração não ligada; CYP: inibição do substrato do citocromo P450; Hept: hepatotoxicidade; Tc: depuração renal ($\log \text{mg/kg/dia}$).

Tabela 5. Perfis de toxicidade previstos dos compostos avaliados com potencial anti-inflamatório.

Molécula	DL	DS	Mutante	Tum.	Deputado	Irritante	LD50	Loael	MRTD
Taxifolin	0,44	0,74	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	2,00	2,07	0,88
Diclofenaco	-0,71	0,26	Nenhum	Nenhum	Alto	Nenhum	2,40	1,56	0,98
Suprofen	3,03	0,50	Nenhum	Nenhum	Baixo	Baixo	2,29	1,56	0,68
Cetoprofeno	0,41	0,64	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	2,17	1,97	0,71
Naproxeno	0,36	0,67	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	2,40	1,77	0,98
Valdecoxib	2,01	0,65	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	1,78	1,83	0,62
Flurbiprofeno	-1,12	0,46	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	2,13	1,69	0,84
Rofecoxib	4,31	0,52	Nenhum	Nenhum	Alto	Nenhum	2,38	1,65	0,39
Celecoxib	-8,10	0,36	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	1,97	1,12	0,17
Ácido meclofenâmico	-0,77	0,23	Nenhum	Nenhum	Alto	Nenhum	2,48	1,32	0,91

DL: semelhança com fármacos; DS: pontuação do fármaco; Mut: mutagenicidade; Tum: tumorigenicidade; Rep: efeitos no sistema reprodutivo; Irrit: efeitos irritantes; LD₅₀: toxicidade oral aguda em ratos (mol·kg⁻¹); LOAEL: toxicidade oral crônica em ratos (log mg·kg⁻¹·pc·dia⁻¹), nível mais baixo de efeito adverso observado; MRTD: dose máxima tolerada recomendada (log mg/kg/dia).

Tabelas suplementares. Lista de ligantes avaliados por acoplamento molecular, incluindo energias de ligação previstas ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) e SMILES canônicos usados para análise de interação com ciclooxigenase-1 (COX-1, PDB ID: 6Y3C) e ciclooxigenase-2 (COX-2, PDB ID: 5IKQ).

COX-1

Ligantes	ΔG (kcal/mol)	SORRISOS
Taxifolin	-7,5	<chem>C1=CC(=C(C=C1[C@@H]2[C@H](C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O</chem>
Ácido meclofenâmico	-7,9	<chem>CC1=C(C(=C(C=C1)Cl)NC2=CC=CC=C2C(=O)O)Cl</chem>
Diclofenaco	-6,6	<chem>C1=CC=C(C(=C1)CC(=O)O)NC2=C(C=CC=C2Cl)Cl</chem>
Bromfenaco	-7,3	<chem>C1=CC(=C(C(=C1)C(=O)C2=CC=C(C=C2)Br)N)CC(=O)O</chem>
Flurbiprofeno	-7,0	<chem>CC(C1=CC(=C(C=C1)C2=CC=CC=C2)F)C(=O)O</chem>
Fenoprofeno	-7,4	<chem>CC(C1=CC(=CC=C1)OC2=CC=CC=C2)C(=O)O</chem>
Indometacina	-6,6	<chem>CC1=C(C2=C(N1C(=O)C3=CC=C(C=C3)Cl)C=CC(=C2)OC)CC(=O)O</chem>
Cetoprofeno	-7,7	<chem>CC(C1=CC(=CC=C1)C(=O)C2=CC=CC=C2)C(=O)O</chem>
Suprofen	-7,7	<chem>CC(C1=CC=C(C=C1)C(=O)C2=CC=CS2)C(=O)O</chem>
Sulindac	-7,1	<chem>CC\C1=C(C2=C(/C1=C\C3=CC=C(C=C3)S(=O)C)C=CC(=C2)F)CC(=O)O</chem>
Piroxicam	-6,8	<chem>CN1C(=C(C2=CC=CC=C2S1(=O)=O)O)C(=O)NC3=CC=CC=N3</chem>
Oxaprozina	-6,9	<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=C(OC(=N2)CCC(=O)O)C3=CC=CC=C3</chem>
Ibuprofeno	-6,9	<chem>CC(C)CC1=CC=C(C=C1)C(C)C(=O)O</chem>
Fenilbutazona	-5,6	<chem>CCCCC1C(=O)N(N(C1=O)C2=CC=CC=C2)C3=CC=CC=C3</chem>
Naproxeno	-7,9	<chem>C[C@@H](C1=CC2=C(C=C1)C=C(C=C2)OC)C(=O)O</chem>
Nimesulida	-6,0	<chem>CS(=O)(=O)NC1=C(C=C(C=C1)[N+](=O)[O-])OC2=CC=CC=C2</chem>
Ácido mefenâmico	-7,2	<chem>CC1=C(C(=CC=C1)NC2=CC=CC=C2C(=O)O)C</chem>
Cetorolaco	-7,4	<chem>C1CN2C(=CC=C2C(=O)C3=CC=CC=C3)C1C(=O)O</chem>
Meloxicam	-6,9	<chem>CC1=CN=C(S1)NC(=O)C2=C(C3=CC=CC=C3S(=O)(=O)N2C)O</chem>
Celecoxib	-6,5	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C2=CC(=NN2C3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)N)C(F)(F)F</chem>
Paracetamol	-5,5	<chem>CC(=O)NC1=CC=C(C=C1)O</chem>
Aspirina	-6,1	<chem>CC(=O)OC1=CC=CC=C1C(=O)O</chem>

COX-2

Ligantes	ΔG (kcal/mol)	SORRISOS
Taxifolin	-8,2	<chem>C1=CC(=C(C=C1[C@@H]2[C@H](C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O</chem>
Aspirina	-6,7	<chem>CC(=O)OC1=CC=CC=C1C(=O)O</chem>
Benzquinamida	-6,1	<chem>CCN(CC)C(=O)C1CN2CCC3=CC(=C(C=C3C2CC1OC(=O)C)OC)OC</chem>
Carprofeno	-8,4	<chem>CC(C1=CC2=C(C=C1)C3=C(N2)C=CC(=C3)Cl)C(=O)O</chem>
Celecoxib	-10,5	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C2=CC(=NN2C3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)N)C(F)(F)F</chem>
Diclofenaco	-8,3	<chem>C1=CC=C(C=C1)CC(=O)O)NC2=C(C=CC=C2Cl)Cl</chem>
Eslurbiprofeno	-8,6	<chem>C[C@@H](C1=CC(=C(C=C1)C2=CC=CC=C2)F)C(=O)O</chem>
Etoricoxib	-8,9	<chem>CC1=NC=C(C=C1)C2=C(C=C(C=N2)Cl)C3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)C</chem>
Flurbiprofeno	-9,1	<chem>CC(C1=CC(=C(C=C1)C2=CC=CC=C2)F)C(=O)O</chem>
Ibuprofeno	-8,7	<chem>CC(C)CC1=CC=C(C=C1)C(C)C(=O)O</chem>
Cetoprofeno	-8,7	<chem>CC(C1=CC(=CC=C1)C(=O)C2=CC=CC=C2)C(=O)O</chem>
Lumiracoxib	-8,6	<chem>CC1=CC(=C(C=C1)NC2=C(C=CC=C2Cl)F)CC(=O)O</chem>
Ácido meclofenâmico	-8,9	<chem>CC1=C(C=C(C=C1)Cl)NC2=CC=CC=C2C(=O)O)Cl</chem>
Ácido mefenâmico	-8,6	<chem>CC1=C(C=CC=C1)NC2=CC=CC=C2C(=O)O)C</chem>
Meloxicam	-7,0	<chem>CC1=CN=C(S1)NC(=O)C2=C(C3=CC=CC=C3S(=O)(=O)N2C)O</chem>
Naproxeno	-7,9	<chem>C[C@@H](C1=CC2=C(C=C1)C=C(C=C2)OC)C(=O)O</chem>
Nimesulida	-7,9	<chem>CS(=O)(=O)NC1=C(C=C(C=C1)[N+](=O)[O-])OC2=CC=CC=C2</chem>

4.2 Artigo 2

ACS CHEMICAL NEUROSCIENCE

Título: Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do fitoterápico *taxifolina* por meio de vias opioides, glutamatérgicas e de canais iônicos sensíveis ao ácido em zebrafish adultos (*Danio rerio*).

José Calado Quilenda^{1,6}, Sanseray da Cruz Machado^{1,6}, Paulo Adenes Teixeira Coelho², João Gabriel Leite da Silva², Jonas Araújo de Sousa², Gabriela Alves do Nascimento², Francisco Bastos Cavalcante Sobrinho², Sacha Aubrey Alves Rodrigues Santos³, Luzia Débora Saldanha Marques², Daniela Braga de Souza^{2,4}, Maria Rayane Correia de Oliveira², Adriana Rolim Campos³, Antônio Eufrásio Vieira-Neto⁵, Luiz F. Wemmerson G. Moura⁴, Francisco Ernani Alves Magalhães⁴, *Wagner Rodrigues de Assis Soares^{1,6}

Affiliation

¹ Graduate Program Nurse and Health. Department of Health II. State University of Southwest Bahia. Jequié-BA, Brazil. Zip code: 45.200-000.

² Graduate Program in Nutrition and Health (PPGNS), NutriFisher Study Group (GENFISH), State University of Ceará (UECE), UNIFOR, Fortaleza, Ceará, Brazil, Zip code: 60714-903

³ Experimental Biology Center (NUBEX), Universidade de Fortaleza, UNIFOR, Fortaleza, CE, CEP 60811-905

⁴ Laboratory for Bioprospecting of Natural Products and Biotechnology (LBPNB), Universidade Estadual do Ceará, Tauá, Ceará, Brasil, Zip code 63660-000

⁵ Laboratory for Bioprospecting of Natural Products and Biotechnology (NUBEX), Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), University of Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Zip code 60.811-650, Brazil

⁶ Laboratory of Innovation and Biomedical Sciences. Department of Health II. State University of Southwest Bahia. Jequié – BA – Brazil. Zip code 45.200-000

* Corresponding Author:

Wagner Rodrigues de Assis Soares: Graduate Program in Nursing and Health (PPGES). Department of Health II. State University of Southwest Bahia. Jequié, Bahia, Brazil, Zip code 45.200-000. E-mail: wrasaores@uesb.edu.br

Resumo

Introduction/Objectives: A dor e a inflamação constituem respostas fisiológicas fundamentais, mas, quando crônicas, tornam-se condições debilitantes e de difícil manejo clínico. Os fármacos disponíveis, como opioides e AINEs, embora eficazes, apresentam limitações, incluindo toxicidade gastrointestinal e hepática, risco de dependência e redução da eficácia em tratamentos prolongados. Nesse contexto, cresce o interesse por compostos naturais com perfil farmacológico diferenciado, como a taxifolina, um flavanonol presente em diversas espécies vegetais. Este presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da taxifolina por meio de modelos *in silico* e *in vivo* em Zebrafish (*Danio rerio*) adulto. **Methods:** A metodologia integrou análises computacionais de *virtual screening* e *molecular docking* com experimentos comportamentais e de toxicidade em Zebrafish. No módulo *in silico*, a taxifolina foi avaliada quanto à interação com alvos moleculares relacionados à nocicepção e inflamação, como TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, NMDA e COX-2. Foram utilizadas ferramentas de predição ADMET para investigar propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, incluindo parâmetros da *Lipinski* e permeabilidade ao sistema nervoso central. No módulo *in vivo*, Zebrafish adultos foram expostos a diferentes concentrações de taxifolina para análise de toxicidade aguda (96 h) e atividade locomotora no *Open Field test*. **Results :** Os resultados *in silico* indicaram que a taxifolina apresenta afinidade de ligação favorável com TRPV1 (-9,1 kcal/mol) e TRPA1 (-7,0 kcal/mol), TRPM8 (-9,1 kcal/mol), ASIC (-9,1 kcal/mol), NMDA (-9,1 kcal/mol) valores comparáveis ou superiores a antagonistas de referência, como a Capsazepina (-8.4 kcal/mol), HC-030031 (-7.3 kcal/mol), Cloridrato de AMTB (-8.0 kcal/mol), Amiloride (-4.5 kcal/mol), Glutamato (-4.9 kcal/mol), e Diclofenaco de sódio (-8.3 kcal/mol). No caso da COX-2, observou-se interação estável com resíduos críticos do sítio catalítico (Arg120, Tyr355 e Ser530), sugerindo potencial de inibição da enzima. As simulações ADMET revelaram perfil compatível com absorção oral satisfatória, ausência de interações relevantes com enzimas do citocromo P450 e baixa toxicidade predita (LD_{50} de $2,007 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$). Os parâmetros de permeabilidade sugeriram limitada penetração no sistema nervoso central, compatível com ausência de efeitos sedativos. Nos experimentos *in vivo*, não houve mortalidade em nenhuma das concentrações testadas, estabelecendo CL_{50} superior a 1,0 mg/mL. Ademais, a administração oral de taxifolina não alterou significativamente a atividade locomotora, em contraste com o grupo tratado com diazepam, confirmando ausência de depressão do sistema nervoso central. A análise integrada dos resultados demonstrou convergência entre predições *in silico* e evidências experimentais *in vivo*, reforçando o perfil de segurança da taxifolina. O composto apresentou potencial modulador de alvos moleculares relacionados à nocicepção e inflamação, sem evidências de toxicidade significativa em Zebrafish. **Conclusion:** Esses achados constituem os primeiros registros da atividade farmacológica da taxifolina frente a TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, NMDA em modelos alternativos, ampliando o conhecimento sobre os mecanismos de ação deste flavonoide natural. Conclui-se que a taxifolina se apresenta como candidata promissora para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios, destacando a relevância da integração de abordagens *in silico* e *in vivo* na descoberta de terapias seguras e eficazes.

Keywords: Taxifolina; Flavonoides; Dor; Inflamação; Zebrafish; *In silico*; *In vivo*

1.0.Introdução

A dor e a inflamação são respostas fisiológicas complexas que, quando persistentes, representam um problema de saúde pública e um desafio terapêutico devido à limitada eficácia e aos efeitos adversos de muitos fármacos disponíveis. Nos últimos anos, compostos naturais, especialmente flavonoides, têm sido explorados como fontes promissoras de agentes analgésicos e anti-inflamatórios por associarem atividade antioxidante, modulação de vias inflamatórias e baixa toxicidade em modelos pré-clínicos. (Goyal *et al.*, 2023; Sunil; Xu, 2019)

A taxifolina (também chamada de dihidroquercetina) é um flavanonóide amplamente distribuído em plantas medicinais e alimentos funcionais, reconhecida por propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Estudos recentes demonstraram efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios da taxifolina em diversos modelos experimentais, incluindo inibição do eixo TXNIP-NLRP3 em microglia sob estresse glicêmico e redução de marcadores pró-inflamatórios, sugerindo potencial terapêutico em contextos neuroinflamatórios (Iwasa *et al.* 2023)

Evidências pré-clínicas indicam que a taxifolina pode atenuar fenótipos de dor neuropática: estudos em modelos de neuropatia induzida por hiperglicemia mostraram melhora de parâmetros histopatológicos e comportamentais, com redução de marcadores de estresse oxidativo e inflamação. Esses achados posicionam a taxifolina como candidata promissora para investigação em modelos de dor e inflamação (Alay *et al.* 2022).

Os mecanismos moleculares que sustentam os efeitos analgésicos de flavonoides frequentemente envolvem múltiplos alvos: canais iônicos sensoriais da família TRP (p.ex. TRPV1, TRPA1, TRPM8), receptores glutamatérgicos excitatórios (NMDA) e enzimas pró-inflamatórias como COX-2. Revisões estruturais e funcionais sobre canais TRP ressaltam seu papel central na transdução de estímulos térmicos, químicos e inflamatórios, bem como a viabilidade de modulá-los com pequenas moléculas naturais para reduzir sinais nociceptivos (Caballero, 2022; Zhang *et al.* 2023).

O uso de modelos alternativos como Zebrafish (*Danio rerio*) tem crescido na farmacologia da dor devido à sua versatilidade, economia e boa correspondência de muitos mecanismos moleculares com mamíferos. Métodos comportamentais validados em Zebrafish permitem avaliar respostas nociceptivas e inflamatórias (formalina, salina hipertônica, LPS, carragenina, entre outros), bem como testar antagonistas seletivos para investigação mecanística. Assim, o Zebrafish constitui uma plataforma adequada para triagem e investigação

mecanística de compostos bioativos como a taxifolina (Belo *et al.*, 2021; Ohnesorge; Heini; Lewejohann, 2021).

Apesar desses avanços, lacunas permanecem: faltam estudos que integrem evidência comportamental *in vivo* com análises *in silico* detalhadas (*docking*, predições ADMET) para mapear potenciais sítios de interação entre taxifolina e alvos relevantes à nociceção e inflamação. A integração entre dados comportamentais e predições estruturais fortalece a inferência mecanística e prioriza alvos para validação funcional (Mir; Khan; Khan, 2024).

Diante desse contexto, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar o perfil antinociceptivo e anti-inflamatório da taxifolina em modelos comportamentais de *Danio rerio* e correlacionar esses achados com evidências *in silico* de interação com alvos-chave da nociceção e inflamação (TRPV1, TRPA1, TRPM8, NMDA, ASIC).

2.0. Materials and Methods

2.1. Amostra

Nesse trabalho foi utilizada a taxifolina (Taxi), adquirida da Sigma-Aldrich Brasil (Lote BCCL3286) e doada gentilmente pelo Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães (PPGNS-UECE).

2.2. Zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa), selvagens, ambos os sexos com idade de 90 dias, tamanhos de $3,5 \pm 0,5$ cm e peso de $0,4 \pm 0,1$ g foram obtidos da Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, um fornecedor em Fortaleza (Ceará, Brasil). Grupos de 40–50 peixes foram aclimatados em aquário de vidro de 9 L à temperatura ambiente (26 ± 2 °C) por 24 h, contendo água desclorada (*ProtecPlus*[®]) e bombas de ar com filtros submersos, a 25 °C e pH 7.0, com ciclo circadiano de 14:10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração *ad libitum* 24 h antes dos experimentos. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), sob protocolo nº 04009489/2023 (**Anexo 1**).

2.3. Protocolo geral

Os testes foram realizados baseando-se em metodologias propostas por Magalhães et al. (2017) e Ekambaram et al. (2017). No dia dos experimentos, os ZFa foram selecionados randomicamente, transferidos para uma esponja úmida, tratados com as amostras-teste ou controles, via intraperitoneal (*i.p.*) ou via oral (*v.o.*). Em seguida foram acondicionados

individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Para os tratamentos via intraperitoneal (*i.p.*) foi utilizada seringa de insulina (0,5 mL; UltraFine® BD) com uma agulha de calibre 30G. Para os tratamentos via oral (*v.o.*) foi usada pipeta automática variável de 20 µL. O comportamento dos animais foi registrado por analisadores calibrados e cegos.

2.4. Toxicidade aguda 96h

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao Zebrafish adulto de acordo com a Organização de Cooperação Econômica e Método Padrão de Desenvolvimento (OECD, 1992) para determinar a LC₅₀-96h. Os animais (n=6/grupo) foram tratados, via oral (*v.o.*), com 20 µL de Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (DSMO 3%; controle). Após os tratamentos foi avaliada a mortalidade dos ZFa a cada 24 horas. Após 96 h, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinada a concentração letal capaz de matar 50 % dos animais (LC₅₀) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (Arellano-Aguiar *et al.*, 2015).

2.5. Teste de Campo Aberto

O Teste de Campo (Magalhães *et al.*, 2017) foi realizado para avaliar o efeito sedativo ou relaxamento muscular dos animais tratados com amostras testadas antes da exposição ao AlCl₃ (100 µg/L; pH 5,8) (Kaur *et al.*, 2022). Os animais (n=6/grupo) foram tratados, via oral (*v.o.*), com 20 µL de Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (DSMO 3%; controle). Um grupo (n=6/grupo) sem tratamentos foi utilizado como controle (Naive). Após 1 h dos tratamentos via oral, os animais foram adicionados em placas de Petri (100 x 15 mm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes, e o efeito neuroprotetor foi analisado quanto à atividade locomotora natural dos ZFa, quantificado através da contagem do número de cruzamentos de linhas (CL), durante 0-5 minutos.

2.6. Atividade antinociceptiva comportamental

Foram selecionadas as concentrações das soluções das amostras testes que não alteraram atividade locomotora dos animais (Ver Fig. 1). As concentrações das soluções dos agentes nocivos: Formalina (0,1%; 5,0 µL; agonista TRPA1) ou salina hipertônica (NaCl 5M; 3,0 µL; agonista TRPV1) ou LPS (0,0625 mg/mL; 3,0 µL; Agonista TRPA1) e antagonistas: Capsazepina (antagonista TRPV1; 0,5 mg/mL; 5 µL); HC-030031 (antagonista TRPA1; 0,1 mg/mL; *i.p.*), bem como o tempo de análise de ação nociceptiva foram utilizadas baseando-se nos testes com roedores, nos quais foram padronizados em Zebrafish conforme metodologias

de Magalhães *et al.* (2017; 2018), Batista *et al.* (2018), Soares *et al.* (2019) e de Oliveira *et al.* (2025). Para as análises comportamentais, após tratamentos com agentes nociceptivos ou antagonistas, os animais foram, individualmente, adicionados a uma placa de Petri de vidro (100 x 15 mm), divididos em quadrantes, e a resposta nociceptiva ou antinociceptiva foi quantificada em termos de atividade locomotora (AL) ou cruzamentos de linhas (CL) realizados durante um período de tempo determinado, específico para cada modelo descrito a seguir.

2.7. Comportamento nociceptivo induzido por formalina

O Zebrafish adulto foi pré-tratados (20 µL; *v.o.*) com Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou morfina (Mor; Controle positivo; 0,2 mg/mL; *i.p.*), ou veículo (Controle, DMSO 3%). Após 1 hora dos tratamentos via oral e 30 min via intraperitoneal, foi administrada uma injeção intramuscular de formalina (Agonista TRPA1; 0,1%; 5,0 µL; *i.m.*) na cauda dos animais (n=6/grupo). Um grupo sem tratamentos (Naive) também foi incluído. O efeito antinociceptivo foi caracterizado pelo aumento da AL na fase neurogênica (0-5 min), bem como na fase inflamatória (15 a 30 min), conforme metodologia proposta por Magalhães *et al.* (2017).

2.8 Comportamento nociceptivo corneal induzido por salina hipertônica

A nocicepção corneal foi induzida com solução salina hipertônica (agonista do TRPV1; NaCl 5,0 M; 5,0 µL), aplicada no olho direito dos animais (n = 6/grupo), 1 h após o pré-tratamento via oral de Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle negativo; DMSO 3%; 20 µL; *v.o.*), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,4 mg/mL; 20 µL; *i.p.*). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. O efeito antinociceptivo corneal foi caracterizado pelo aumento da AL durante 0-5 min de análise (Magalhães *et al.*, 2018).

Este teste foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos canais do TRPV1 (Ver resultados). Portanto, em um experimento subsequente, os animais (n = 6/grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com capsazepina (antagonista do TRPV1; 0,5 mg/mL; 20 µL; *i.p.*), 15 minutos antes da administração oral da menor dose eficaz de Taxi (Ver secção de resultados).

2.9. Comportamento nociceptivo abdominal induzido por Lipopolissacarídeo (LPS)

A nocicepção abdominal foi induzida com solução de Lipopolissacarídeo isolado de *Escherichia coli* (LPS; agonista TRPA1; 62,5 µg/mL; 3,0 µL), aplicada (*i.p.*) no abdômen dos animais (n = 6/grupo), 1 h após o pré-tratamento via oral com Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle negativo; DMSO 3%; 20 µL; *v.o.*), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,2 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*). Um grupo não

tratado (Naive) foi incluído. O efeito antinociceptivo abdominal foi caracterizado pelo aumento da AL durante 0-5 min de análise (de Oliveira et al., 2025).

Este teste também foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos canais do TRPA1. Portanto, em um experimento subsequente, os animais (n=6/grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com HC-030031 (HC; antagonista TRPA1; 0,1 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*), 15 minutos antes da administração oral da menor dose eficaz da amostra teste (Ver secção de resultados).

2.10. Comportamento nociceptivo induzido por glutamato

A nocicepção foi induzida com solução de glutamate (agonista NMDA; 12,5 µM; 5,0 µL), aplicada (*i.p.*) na calda dos animais (n = 6/grupo), 1 h após o pré-tratamento via oral com Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle negativo; DMSO 3%; 20 µL; *v.o.*), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,2 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. O efeito antinociceptivo foi caracterizado pelo aumento da AL durante 0-15 min de análise (Batista et al., 2018; Soares et al., 2019).

Este teste também foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos receptores glutamatérgicos (NMDA). Portanto, em um experimento subsequente, os animais (n = 6/grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com ketamina (Keta; antagonista NMDA; 0,001 %; 5,0 µL; *i.p.*), 15 minutos antes da administração oral da menor dose eficaz de Taxi (Ver secção de resultados).

2.11. Comportamento nociceptivo induzido por mentol

A nocicepção foi induzida com solução de mentol (agonista TRPM8; 1,2 mM; 5,0 µL), aplicada (*i.p.*) na calda dos animais (n=6/grupo), 1 h após o pré-tratamento via oral com Taxifolina (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL) ou veículo (Controle negativo; DMSO 3%; 20 µL; *v.o.*), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,2 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*). Um grupo não tratado (Naive) foi incluído. O efeito antinociceptivo foi caracterizado pelo aumento da AL durante 0-10 min de análise (Ribeiro et al., 2024).

Este teste também foi escolhido para avaliar o possível envolvimento dos canais iônicos TRPM8. Portanto, em um experimento subsequente, os animais (n = 6/grupo) foram pré-tratados intraperitonealmente com AMTB (antagonista TRPM8; 0,3 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*), 15 minutos antes da administração oral da menor dose eficaz de Taxifolina (Ver secção de resultados).

2.12. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi realizada sob edema abdominal induzido por carragenina, conforme descrito por Huang et al. (2014). Os animais ($n = 6/\text{grupo}$) receberam os mesmos tratamentos dos testes nociceptivos, mas o controle positivo foi diclofenaco sódico (2,5 mg/mL; *v.o.*; 20 μL). Após 1 h dos tratamentos, o ZFa recebeu, no abdômen, injeção de carragenina (1,4%; 20 μL ; *i.p.*). O efeito anti-inflamatório foi caracterizado com a diminuição do edema abdominal (EA), medindo-se o peso corporal dos animais, em miligramas (mg), antes (0h) e até 4 h após indução de inflamação (EA = PC4h-PC0h). Os animais foram sacrificados imediatamente para cessar as reações biológicas ao final do experimento.

2.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 9.0. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

3.0 Triagem virtual, acoplamento molecular e ferramentas ADMET

3.1. Pesquisa em bases de dados (DrugBank e PubChem)

Foi realizada uma pesquisa inicial na base de dados DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) utilizando as palavras-chave medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios, com o objetivo de identificar fármacos que atuam seletivamente sobre alvos moleculares envolvidos na nocicepção e na inflamação. A partir dessa triagem, foram selecionadas estruturas de fármacos inibidores e moduladores dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, NMDA.

As estruturas dos compostos de interesse Taxifolina, Capsaicina, Morfina, Capsazepina, Naloxona, Cinamaldeído, HC-030031, Mentol, Cloridrato de AMTB, Glutamato, Ketamina, Ácido acético, Amilorida e Diclofenaco de sódio foram obtidas na base de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) em formato tridimensional (3D SDF) para posterior preparo e acoplamento molecular.

3.2. Triagem virtual, acoplamento molecular e ferramentas ADMET

As estruturas moleculares dos ligantes foram baixadas em formato 3D SDF e, posteriormente, convertidas para o formato PDBQT utilizando o programa Open Babel (<https://sourceforge.net/projects/openbabel/>), para serem empregadas nos cálculos de acoplamento molecular (*docking*).

As estruturas cristalográficas dos alvos moleculares foram obtidas no Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org>): TRPV1 (PDB ID: 8JQR), TRPA1 (PDB ID: 6X2J), TRPM8 (PDB ID: 8BDC), ASIC (PDB ID: 4NTX), receptor NMDA (PDB ID: 7EOR). Os sítios ativos de cada receptor/enzima foram preditos pela ferramenta online FTSite (<https://ftsitesite.bu.edu>) e confirmados com base nos artigos de cristalografia de cada proteína disponíveis no próprio PDB.

Os receptores foram preparados e convertidos para o formato PDBQT no programa AutoDockTools, incluindo remoção de moléculas de água, adição de hidrogênios polares e cargas parciais. Em seguida, foram realizados a triagem virtual e o acoplamento molecular entre todos os ligantes selecionados Taxifolina, Capsaicina, Morfina, Capsazepina, Naloxona, Cinamaldeído, HC-030031, Mentol, Cloridrato de AMTB, Glutamato, Ketamina, Ácido acético, Amilorida e Diclofenaco de sódio e os receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, NMDA, utilizando o software AutoDock Vina.

Para cada complexo receptor-ligante, foram geradas nove poses, retornando suas respectivas energias de afinidade ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). As melhores poses, selecionadas com base na menor energia de afinidade e no posicionamento adequado no sítio ativo, foram analisadas e visualizadas no software PyMOL 2.1 (<https://www.pymol.org/>). Os mapas de interação 2D de cada complexo foram obtidos por meio do software Discovery Studio Visualizer 4.5 (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

As propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADMET) dos ligantes foram avaliadas com o auxílio dos programas DataWarrior (<https://openmolecules.org/datawarrior/>) e pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>), permitindo estimar o perfil de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade dos compostos selecionados.

4.0. Resultados

4.1. Toxicidade 96 h

Para todas as concentrações de taxifolina, sugere-se que a CL_{50} pode ser superior a 1,0 mg/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados dos testes de toxicidade aguda da amostra teste frente ao zebrafish adulto.

Amostra Teste	Mortalidades do Zebrafish Adulto				96 h de Análise CL_{50} (mg/mL) / IV
	V	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	1,0 mg/mL	
Taxifolina	0	0	0	0	> 1,0

V - Veículo – DMSO 3% (Controle; 20 μ L; v.o.). CL_{50} -concentração letal para matar 50% dos zebrafish adulto; IV – intervalo de confiança;

4.2. Atividade locomotora (Teste de Campo Aberto)

A taxifolina não apresentou efeito sedativo, pois os animais tratados com Taxifolina (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL; 20 μ L; v.o.) não alteraram a atividade locomotora do ZFa, significativamente [($q = 8,191$; $q = 8,095$; $q = 7,999$) $p < 0,0001$ vs. DZP] diferente do efeito dos animais tratados com diazepam (DZP; 10 mg/mL; 20 μ L; v.o.), utilizado como controle sedativo ($q = 11,8$, $p < 0,0001$ vs. Naive; $q = 11,04$, $p < 0,0001$ vs. Veículo). Os resultados da atividade locomotora são mostrados na Figura 1C ($F_{5, 30} = 16,75$).

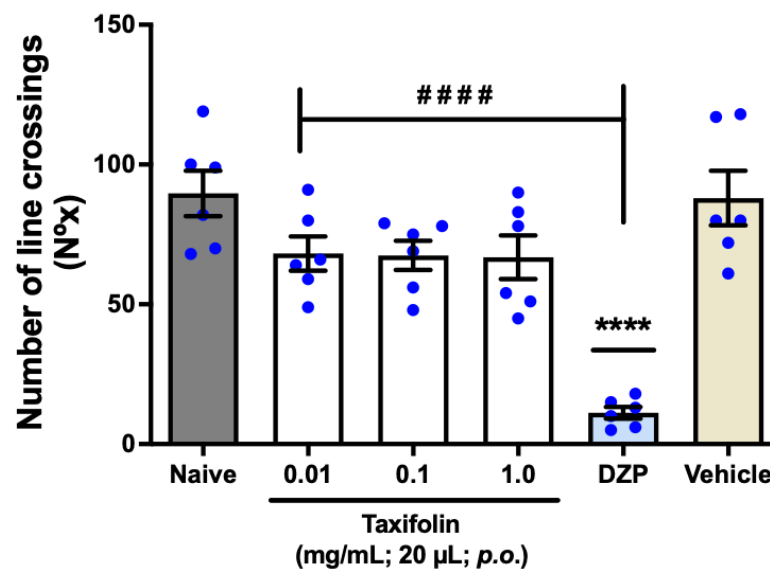


Figura 1. Efeito da taxifolina sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto, analisado no Teste de Campo Aberto (0-5 min). Naive - animais não tratados. DZP – diazepam (Controle sedativo; 10 mg/mL; 20 μ L; v.o.). V - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; v.o.). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** $p < 0,0001$ vs. Naive ou Veículo; ##### $p < 0,0001$ vs. DZP).

4.3. Comportamento nociceptivo induzido por formalina

Em relação a 1ª Fase (fase neurogênica) do Teste da Formalina Fig. 2A ($F_{5, 30} = 48,83$), a taxifolina inibiu o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pela formalina (0,1%), pois os ZFa tratados com soluções de 0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL (20 μ L; *v.o.*) apresentaram efeito significativamente [($q = 9,0006$; $q = 9,237$; $q = 8,570$) $p < 0,0001$ vs. Controle] diferente do Controle (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Porém, tal efeito da taxifolina foi significativamente [($q = 9,288$; $q = 9,058$; $q = 9,725$) $p < 0,0001$; vs. Morfina] diferente do efeito dos animais tratados com morfina (0,2 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*), utilizada como controle antinociceptivo ($q = 18,29$, $p < 0,0001$ vs. Controle ou $q = 0,3079$, $p > 0,05$ vs. Naive). Somente a maior concentração da taxifolina (1,0 mg/mL ;20 μ L; *v.o.*) inibiu significativamente ($q = 10,85$, $p < 0,0001$ vs. Controle) o comportamento nociceptivo na 2ª fase do Teste da Formalina, Fig. 2B ($F_{5, 30} = 41,57$). Esse efeito da taxifolina (1,0 mg/mL ;20 μ L; *v.o.*), nesta fase, foi significativamente ($q = 2,212$, $p > 0,05$ vs. Morfina) semelhante ao efeito da morfina (0,2 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*), utilizada como controle antinociceptivo ($q = 13,06$, $p < 0,0001$ vs. Controle ou $q = 0,4340$, $p > 0,05$ vs. Naive).

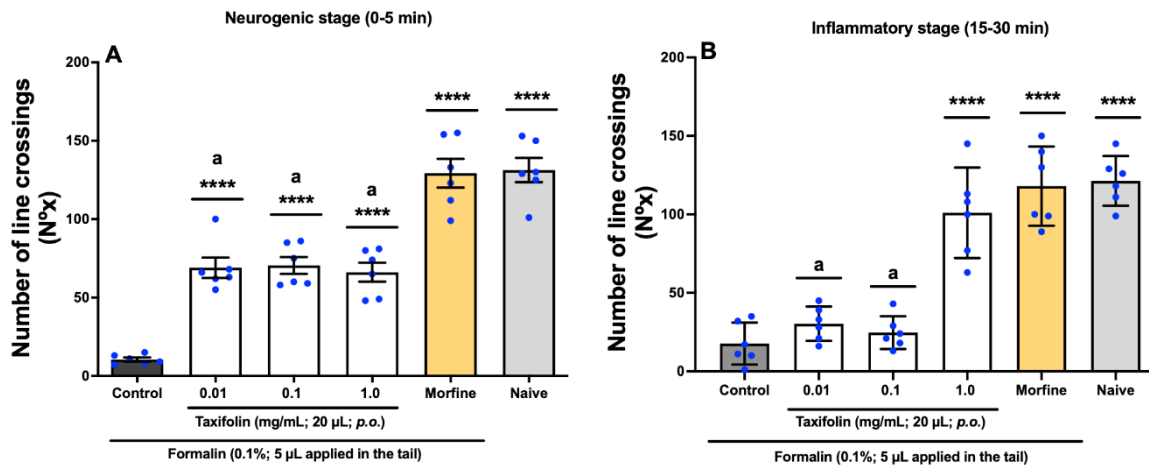


Figura 2. Efeito da taxifolina sob o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pela formalina, analisado em ambas as fases do teste. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Morfina (Controle antinociceptivo; 0,2 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** $p < 0,0001$ vs. Controle; ^a $p < 0,0001$ vs. Morfina ou Naive).

4.4. Comportamento nociceptivo corneal induzido por salina hipertônica

A taxifolina inibiu o comportamento nociceptivo corneal em ZFa induzido pela salina hipertônica (NaCl, 5 M, 5 μ L aplicado no olho direito), pois os ZFa tratados com taxifolina (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) apresentaram efeito significativamente [($q = 2,350$; q

= 2,416; $q = 2,005$) $p < 0,05$ vs. Morfina] semelhante ao efeito dos animais tratados com morfina (0,4 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*), utilizada como controle antinociceptivo ($q = 9,499$, $p < 0,0001$ vs. Controle ou $q = 0,2958$, $p > 0,05$ vs. Naive). Os resultados são ilustrados nas Figura 3A ($F_{5,30} = 11,99$).

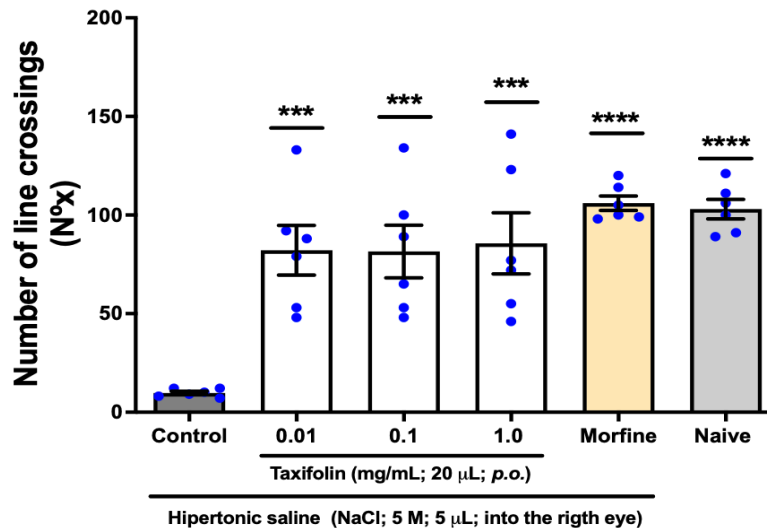


Figura 3. Efeito da taxifolina sob o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pela salina hipertônica, analisado de 0-5 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Morfina (Controle antinociceptivo; 0,4 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ vs. Controle).

4.5. Envolvimento dos canais iônicos TRPV1 sob o efeito antinociceptivo corneal

A capsazepina preveniu, significativamente ($q = 10,77$, $p < 0,0001$ vs. taxifolina + CZP), o efeito antinociceptivo corneal da taxifolina em ZFa, Figura 4A ($F_{4,25} = 42,45$).

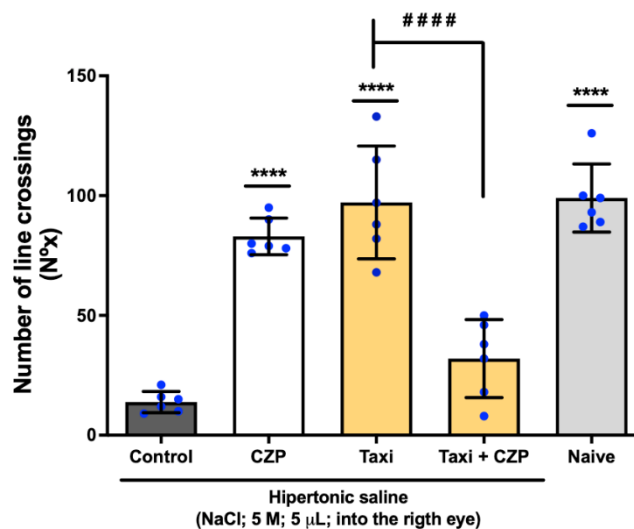


Figura 4. Efeito da capsazepina (CZP; antagonista do TRPV1; 0,5 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*) sob o efeito antinociceptivo corneal da taxifolina (Taxi; 0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em Zebrafish adulto, analisado de 0-5 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** $p < 0,0001$ vs. Controle; #### $p < 0,0001$ vs. Taxi).

4.6. Comportamento nociceptivo abdominal induzido por LPS

A taxifolina inibiu o comportamento nociceptivo abdominal em ZFa induzido pela LPS (agonista TRPA1; 62,5 µg/mL; 3,0 µL; *i.p.*), pois os ZFa tratados com Taxi (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL; 20 [L; *v.o.*) apresentou efeito significativamente [($q = 9,165$; $q = 8,802$; $q = 10,96$) $p < 0,0001$ vs. Controle] diferente do Controle (DMSO 3%; 20 [L; *v.o.*). Tal efeito da Taxi foi significativamente [($q = 0,2244$; $q = 0,1381$; $q = 2,019$) $p < 0,05$ vs. Morfina] semelhante ao efeito dos animais tratados com morfina (Mor; 0,2 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*), utilizada como controle antinociceptivo abdominal ($q = 8,940$, $p < 0,0001$ vs. Controle ou $q = 0,1381$, $p > 0,05$ vs. Naive). Os resultados são ilustrados nas Figura 5 ($F_{5,30} = 15,32$).

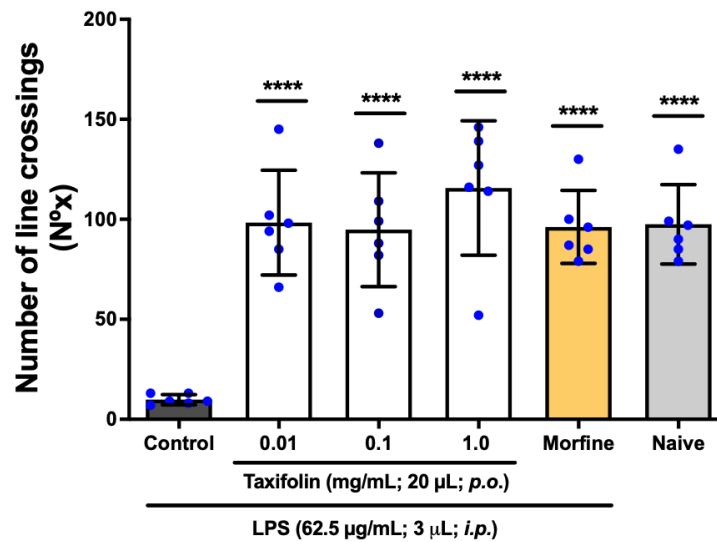


Figura 5. Efeito da taxifolina sob o comportamento nociceptivo abdominal em ZFa induzido pela LPS (agonista TRPA1; 62,5 µg/mL; 3,0 µL; *i.p.*), analisado durante 5 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 µL; *v.o.*). Morfina (Controle antinociceptivo; 0,2 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** $p < 0,0001$ vs. Controle).

4.7. Envolvimento do canal iônico TRPA1 sob o efeito antinociceptivo abdominal

O HC (HC-030031; antagonista TRPA1; 0,1 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*) preveniu, significativamente ($q = 12,57$, $p < 0,0001$ vs. Taxi + HC), o efeito antinociceptivo abdominal da Taxi em ZFa, Figura 6 ($F_{4,25} = 46,86$).

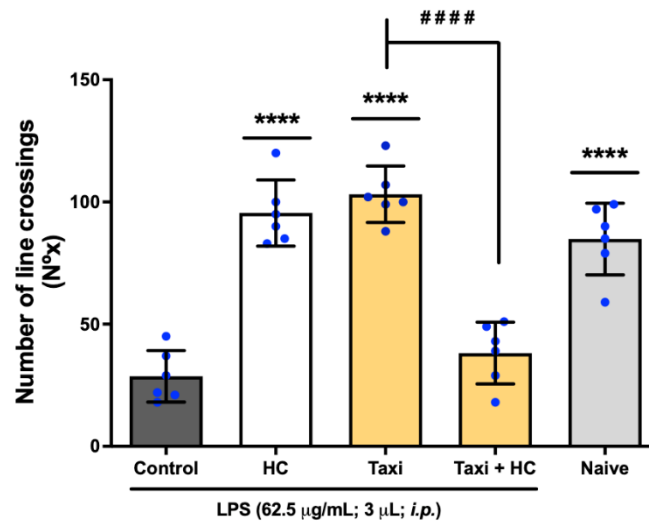


Figura 6. Efeito do HC (HC-030031; antagonista TRPA1; 0,1 mg/mL; 5,0 μ L; *i.p.*) sob o efeito antinociceptivo abdominal da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em ZFa. A nocicepção abdominal foi induzida pela LPS (agonista TRPA1; 0,0625 mg/mL; 3,0 μ L; *i.p.*), analisada durante 5 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** p <0,0001 vs. Controle; #### p <0,0001 vs. Taxi).

4.8. Comportamento nociceptivo induzido por glutamato

A taxifolina inibiu o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pelo glutamato (12,5 μ M, 5,0 μ L; *i.m.* aplicados na calda), pois os ZFa tratados com taxifolina (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) apresentaram efeito significativamente [($q = 2,855$; $q = 2,678$; $q = 2,804$) p <0,05 vs. Morfina] semelhante ao efeito dos animais tratados com morfina (0,2 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*), utilizada como controle antinociceptivo ($q = 13,49$, p <0,0001 vs. Controle ou $q = 0,1768$, p >0,05 vs. Naive). Os resultados são ilustrados nas Figura 7 ($F_{5,30} = 24,90$).

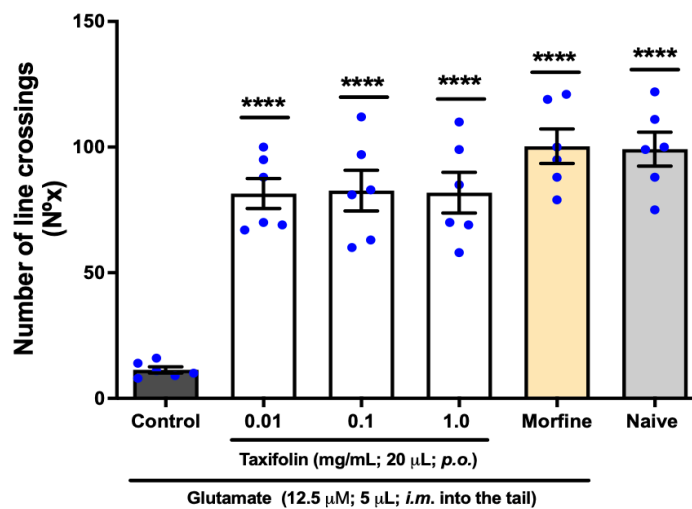


Figura 7. Efeito da taxifolina sob o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pelo glutamato (12,5 μ M, 5,0 μ L aplicado na calda), analisado durante 0-15 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Morfina (Controle antinociceptivo; 0,2 mg/mL; 5,0 μ L; *i.p.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** p <0,0001 vs. Controle)

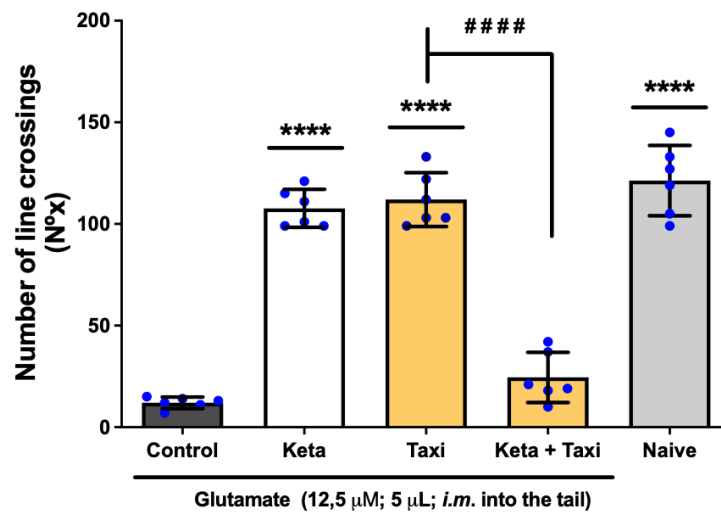


Figura 8. Efeito da ketamina (Keta; antagonista NMD) sob o efeito antinociceptivo da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μL; *v.o.*) em ZFa. A nocicepção foi induzida pela ketamina (0,001%; 5,0 μL; *i.p.* aplicada na calda), analisada durante 0-15 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μL; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** $p < 0,0001$ vs. Controle; #### $p < 0,0001$ vs. Taxi).

4.9. Envolvimento dos receptores glutamatérgicos (NMDA)

A ketamina (Keta; antagonista NMDA; 0,001%; 5,0 μL; *i.p.*) preveniu, significativamente ($q = 10,32$, $p < 0,0001$ vs. Keta + Taxi), o efeito antinociceptivo da Taxi em ZFa, Figura 9 ($F_{4,25} = 44,65$).

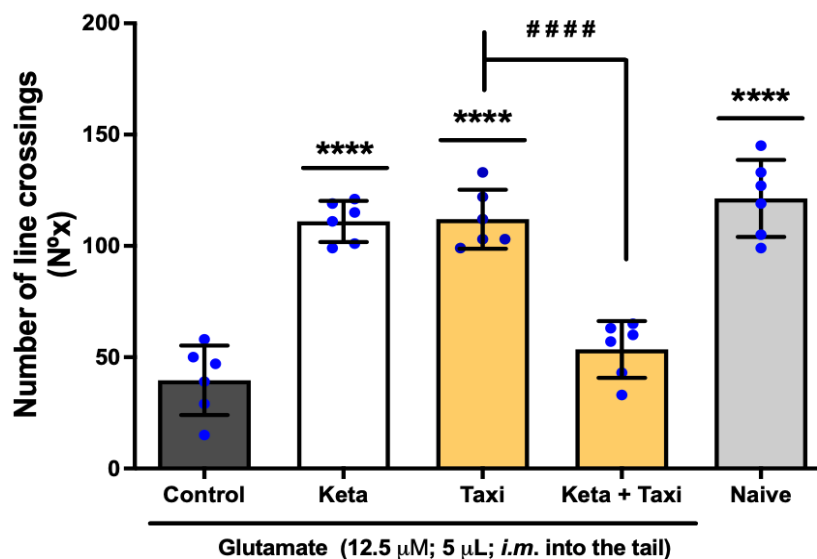


Figura 9. Efeito da ketamina (Keta; antagonista NMDA; 0,001%; 5,0 μL; *i.p.*) sob o efeito antinociceptivo da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μL; *v.o.*) em ZFa, analisado durante 0-15 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μL; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** $p < 0,0001$ vs. Controle; #### $p < 0,0001$ vs. Taxi).

4.10. Comportamento nociceptivo induzido por mentol

A taxifolina inibiu o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pelo mentol (agonista TRPM8; 1,2 mM; 5,0 μ L; *i.m.* aplicados na calda), pois os ZFa tratados com taxifolina (0,01 ou 0,1 ou 1,0 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) apresentaram efeito significativamente [($q = 2851$; $q = 2,471$; $q = 2,091$) $p < 0,05$ vs. Morfina] semelhante ao efeito dos animais tratados com morfina (0,2 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*), utilizada como controle antinociceptivo ($q = 16,12$, $p < 0,0001$ vs. Controle ou $q = 0,5068$, $p > 0,05$ vs. Naive). Os resultados são ilustrados nas Figura 9 ($F_{5,30} = 38,08$).

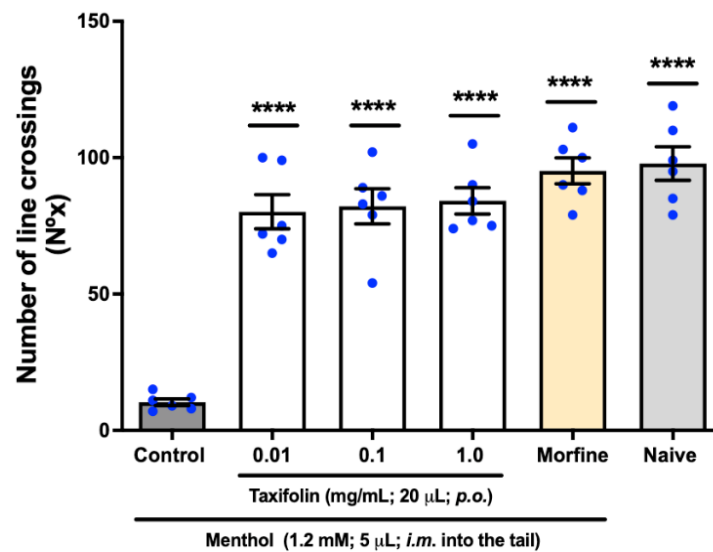


Figura 10. Efeito do mentol (agonista TRPM8) sob o efeito antinociceptivo da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em ZFa, analisada durante 0-10 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** $p < 0,0001$ vs. Controle).

4.11. Envolvimento do canal iônico TRPM8

O AMTB (antagonista TRPM8; 0,3 mg/mL; 5,0 μ L; *i.p.*) preveniu, significativamente ($q = 17,96$, $p < 0,0001$ vs. Taxi + Taxi), o efeito antinociceptivo da Taxi em ZFa, Figura 11 ($F_{4,25} = 130,4$).

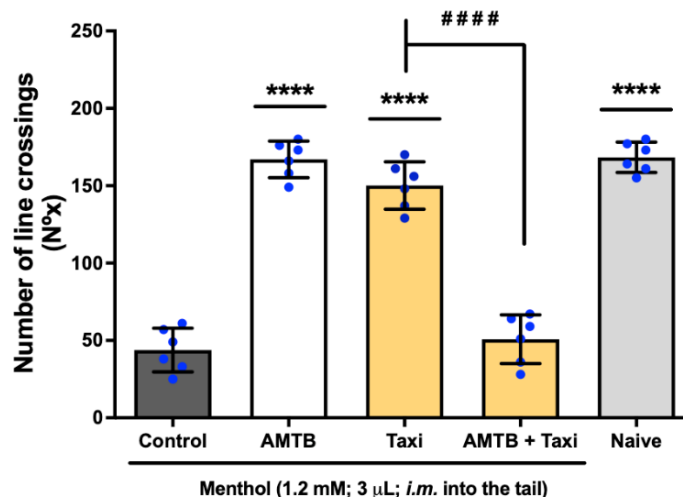


Figura 11. Efeito AMTB (antagonista TRPM8; 0,3 mg/mL; 5,0 μ L; *i.p.*) sob o efeito antinociceptivo da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em ZFa, analisado durante 0-10 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** p <0,0001 vs. Controle; ### p <0,0001 vs. Taxi).

4.12. Atividade anti-inflamatória

O pré-tratamento com taxifolina (Taxi; 0,01 ou 0,1 ou 1,0 ppm; 20 μ L; *v.o.*) reduziu o edema abdominal em ZFa induzido pela carragenina (1,4%; 20 μ L; *i.p.*), significativamente [($q = 17,49$; $q = 17,36$; $q = 17,43$) p <0,0001 vs. Controle] diferente do Controle (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Tal efeito do EFM foi significativamente [($q = 0,8647$; $q = 0,9977$; $q = 0,9312$) p <0,05 vs. DS] semelhante ao efeito dos animais tratados com diclofenaco de sódio (DS; 2,5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*), utilizado como controle anti-inflamatório ($q = 18,36$, p <0,0001 vs. Controle). Os resultados são ilustrados nas Figura 12 ($F_{4,25} = 62,53$).

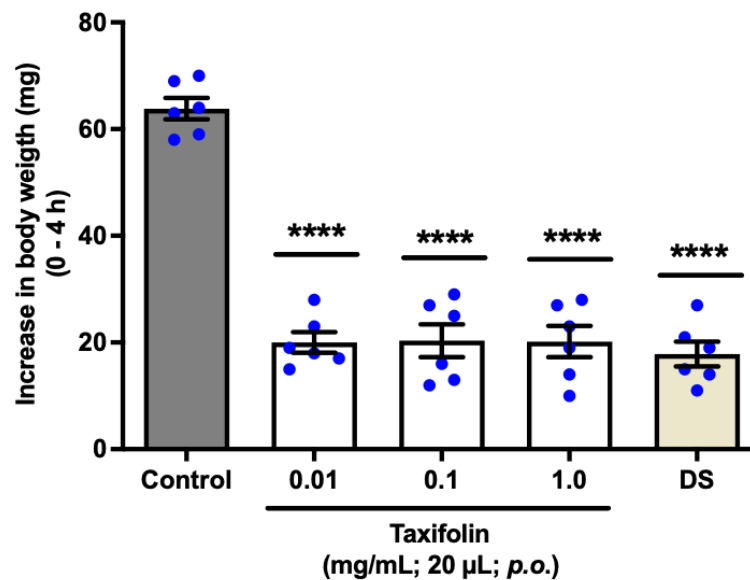


Figura 12. Efeito da taxifolina sob o edema abdominal em ZFa induzido pela carragenina (1,4%; 20 μ L; *i.p.*), analisado individualmente (0-4 h). Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). DS - diclofenaco de sódio (controle anti-inflamatório; 2,5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*). Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (**** p <0,0001 vs. Controle).

5.0. Triagem virtual (Screening virtual), acoplamento molecular e ferramentas ADMET

5.1. Acoplamento molecular da taxifolina e alvo molecular (TRPV1)

Na **Figura 13**, as poses de taxifolina, capsaicina, morfina, capsazepina e naloxona aparecem sobrepostas no vanilloid binding pocket (VBP) do TRPV1 (8JQR), sugerindo ocupação de um mesmo bolso de ligação. Esse enquadramento é compatível com descrições estruturais do TRPV1 em que antagonistas se acomodam no VBP e podem se associar a mudanças (ou restrições) no movimento de hélices envolvidas no canal. A taxifolina apresentou o ΔG mais negativo (-9,1 kcal/mol), seguida por capsazepina e naloxona (-8,4 kcal/mol), enquanto morfina (-7,8 kcal/mol) e capsaicina (-7,1 kcal/mol) ficaram com valores menos negativos no mesmo alvo. O padrão de contatos listados (predomínio de Van der Waals e interações hidrofóbicas, com contribuições pontuais de ligações de hidrogênio e interações π) envolve resíduos como Tyr511, Ser512, Leu515, Leu553, Ala566, Glu570, Arg557 e Asn551, que também aparecem descritos como componentes do VBP e participantes de interações relevantes em complexos estruturais do TRPV1.

Figura 13. Complexo formado entre o receptor TRPV1 (PDB ID: 8JQR) e os ligantes taxifolina (amarelo), capsaicina (vermelho), morfina (verde), capsazepina (laranja) e naloxona (roxo) com o sítio ativo do receptor)

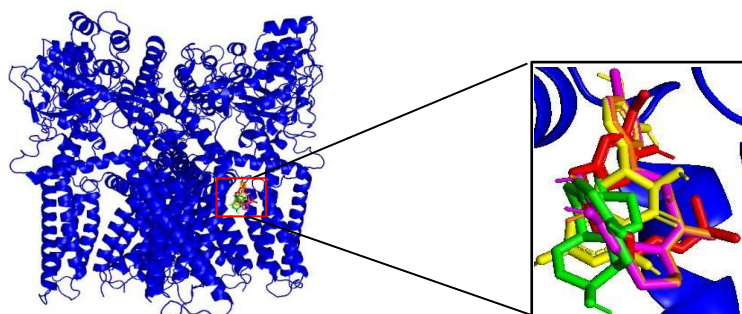


Tabela 2. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes taxifolina, capsaicina, morfina, capsazepina e naloxona com o receptor TRPV1 (PDB ID:8JQR).

Compostos	ΔG (kcal/mol)	Tyr 511	Ser 512	Leu 515	Leu 553	Ala 566	Glu 570	Arg 557	Asn 551
Taxifolina	-9.1	Vw	Vw	Vw	Pi. S	Pi. S	Vw	Co.h. B	Vw
Capsazepina	-8.4	Co.h. B	Vw	Alkyl	Vw	Pi. S	Vw	Pi-ca	C.h. B
Naloxona	-8.4	Co.h. B	Vw	Alkyl	Vw	Pi. S	Vw	Pi-ca	C.h. B
Morfina	-7.8	Vw	---	Vw	Alkyl	C.h. B	Vw	---	---
Capsaicina	-7.1	Vw	Vw	Vw	Vw	Pi. S	C.h. B	Vw	Vw

Interações: **Vw:** Forças de Van der Waals; **C.h.B:** Ligação hidrogênio-carbono; **PI. S:** Interação pi-sigma; **Alkyl:** Interação alquila; **Co.h. B:** Ligação de hidrogênio convencional; **Pi-ca:** interação pi-cátion.

5.2. Acoplamento molecular da taxifolina e alvo molecular (TRPA1)

Na análise *in silico* do TRPA1 (PDB: 6X2J), Na Figura 14 é possível observar que as poses de taxifolina, cinamaldeído, morfina e do composto de referência HC-030031 ficaram acomodadas em um bolsão transmembranar descrito na literatura como uma fenda entre o domínio tipo sensor de voltagem (VSLD) e o módulo do poro, inserida na fase hidrofóbica da membrana. Nesse tipo de sítio, costuma predominar um ambiente majoritariamente apolar, com poucas interações polares se destacando.

Considerando os valores de afinidade previstos (ΔG), o HC-030031 apresentou o resultado mais favorável (-7,3 kcal), seguido de perto pela taxifolina (-7,0 kcal), enquanto morfina (-6,7 kcal) e cinamaldeído (-5,4 kcal) ficaram com valores menos negativos. Em termos de contatos, as interações descritas na tabela sugere que a taxifolina se mantém principalmente por Van der Waals com Ala836, Tyr840, Ser887 e Gln940, além de um empilhamento π - π com Phe841 e contato adicional com Phe947, o que se encaixa bem na ideia de um bolso dominado por interações apolares, com poucos pontos mais específicos.

Figura 14. Complexo formado entre o receptor TRPA1 (PDB ID: 6X2J) e os ligantes Taxifolina (amarelo), Cinamaldeído (vermelho), Morfina (verde), e HC-030031 (laranja) no sítio ativo do receptor.

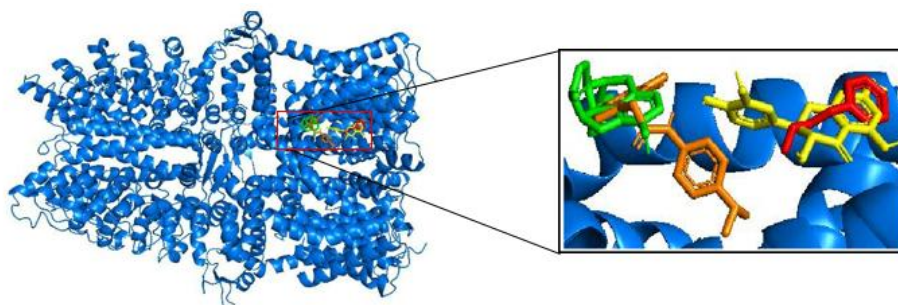


Tabela 3. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes taxifolina, Cinamaldeído, Morfina, e HC-030031 com o receptor TRPA1 (PDB ID: 6X2J).

Compostos	ΔG (kcal)	Ala 836	Tyr 840	Ser 887	Gln 940	Phe 841	Met 844	Leu 847	Ile 863	Leu 867	Leu 871	Phe 947
HC-030031	-7.3	---	---	---	---	---	C.h. B	Vw	Alkyl	Pi. S	Alkyl	Pi- T
Taxifolina	-7.0	Vw	Vw	Vw	Vw	Pi-Pi	---	---	---	---	---	Vw
Morfina	-6.7	---	---	---	---	---	---	---	Vw	Pi. S	Vw	Vw
Cinamaldeído	-5.4	Vw	Vw	Vw	Vw	Vw	---	---	---	---	---	---

Interações: Vw: Forças de Van der Waals, C.h.B: Ligação de hidrogênio-carbono, Pi.S: Interação pi-sigma, Alkyl: Interação alquila, Co.h.B: Ligação de hidrogênio convencional, Pi-ca: Interação pi-cátion, Pi-Alk: Interação pi-alquila, Pi-Pi: Empilhamento pi-pi (paralelo), Pi-T: Interação pi-pi em forma de T.

5.3. Acoplamento molecular da taxifolina e alvo molecular (TRPM8)

Na figura 15 observamos que no complexo com o TRPM8 (PDB: 8BDC), a taxifolina aparece acomodada no bolso de ligação descrito para esse canal, associado ao domínio tipo sensor de voltagem (VSLD) e à hélice TRP.

Considerando os valores de afinidade (ΔG) obtidos, a taxifolina apresentou energia mais favorável (-8,1 kcal/mol), muito próxima do antagonista AMTB (-8,0 kcal/mol) e da morfina (-7,9 kcal/mol), enquanto o mentol mostrou menor favorabilidade (-6,0 kcal/mol). Na inspeção das interações, a taxifolina manteve contatos de Van der Waals com Tyr745 e Tyr1005 e incluiu ligação do tipo hidrogênio-carbono com Arg842 e Asn741, além de uma interação π -ânion com Asp802, sugerindo um padrão de ancoragem que envolve resíduos já apontados como relevantes para a cavidade VSLD e para a resposta a ligantes como o mentol.

Figura 15. Complexo formado entre o receptor TRPM8 (PDB ID: 8bdc) e os ligantes Mentol (vermelho), Morfina (verde), Taxifolina (amarelo) e Cloridrato de AMTB (laranja) no sítio ativo do receptor.

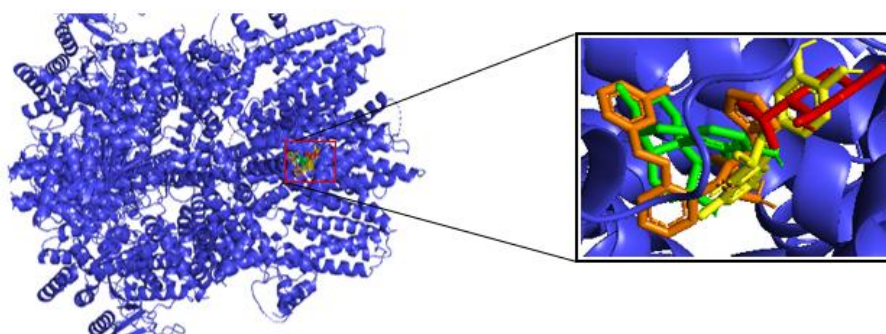


Tabela 4. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes Mentol, Morfina, Taxifolina e Cloridrato de AMTB com o receptor TRPM8 (PDB ID: 8bdc).

Compostos	ΔG (kcal/mol)	Arg 842	Lys 856	Tyr 745	Tyr 1005	Asn 741	Asn 799	Asp 802	Glu 782
Taxifolina	-8.1	Co.h. B	---	Vw	Vw	Co.h. B	Vw	Pi-an	---
Cloridrato de AMTB	-8.0	Vw	---	---	Vw	Vw	C.h. B	Co.h. B	---
Morfina	-7.9	Co.h. B	---	---	VW	---	Co.h. B	---	---
Mentol	-6.0	Vw	---	Alkyl	Pi-Alk	Co.h. B	---	---	---

Interações: Vw: Forças de Van der Waals; C.h.B: Carbon Hydrogen Bond; PI. S: Pi.sigma; Alkyl; Co.h.B: Conventional hydrogen bond; Pi-ca: Pi-cation; Pi-Alk: Pi-Alkyl; Pi-Pi: Pi-Pi Stacked; Pi-Pi T: Pi-Pi T- Shaped; Pi-na: Pi-Anion.

5.4. Acoplamento molecular da taxifolina e alvo molecular (ASIC)

A figura 16 referente ao *docking* com ASIC (PDB: 4NTX), foi possível observar na figura a sobreposição dos ligantes (ácido acético, morfina, taxifolina e amiloride) em uma mesma região do receptor, compatível com o fato de que os ASICs funcionam como sensores de prótons extracelulares, frequentemente discutidos no contexto de acidose tecidual associada a inflamação/isquemia, e apresentam sensibilidade a amiloride como bloqueador clássico.

Na tabela, os valores de afinidade previstos (ΔG) ficaram mais negativos para morfina (-5,1 kcal/mol), seguidos por taxifolina (-4,7 kcal/mol) e amiloride (-4,5 kcal/mol), enquanto o ácido acético (-2,0 kcal/mol) mostrou menor favorabilidade. Em termos de contatos, o padrão listado sugere predominância de Van der Waals, com participação pontual de ligação de hidrogênio (no meu quadro, sobretudo para amiloride, ácido acético em Ala444/Ser445). Esse recorte conversa com discussões estruturais de ASIC em que a seletividade e regiões do TM2 (incluindo a área do motivo GAS) e resíduos próximos são relevantes para a condução/seleção iônica e também aparecem associados a sítios relacionados ao bloqueio por amiloride, embora o encaixe exato do bloqueador possa variar conforme estado conformacional e modelo usado.

Figura 16. Complexo formado entre o receptor ASIC (PDB ID: 4ntx) e os ligantes Ácido acético (Vermelho), Morfina (Verde), Taxifolina (Amarelo) e Amiloride (Laranja) no sítio ativo do receptor.

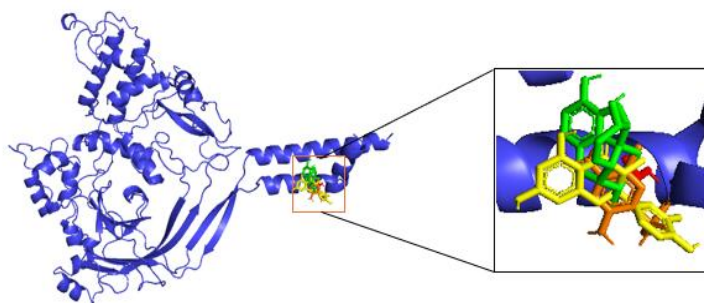


Tabela 5. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes Ácido acético, Morfina, Taxifolina e Amiloride com o receptor ASIC (PDB ID: 4ntx).

Compostos	ΔG (kcal/mol)	Gly 436	Gly 439	Asp 433	Gly 443	Ala 444	Ser 445	Thr 448	Glu 451
Morfina	-5.1	---	---	---	---	---	---	---	---
Taxifolina	-4.7	Vw	Vw	---	---	Vw	Vw	---	---
Amiloride	-4.5	Vw	Vw	---	---	Co.h.B	Vw	---	---
Ácido acético	-2.0	---	Vw	---	---	Co.h.B	Vw	---	---

Interações: Vw: Forças de Van der Waals; Co.h.B: Coventional hydrogen bond

5.5. Acoplamento molecular da taxifolina e alvo molecular (NMDA)

A figura 17 referente ao *docking* com o receptor NMDA (PDB: 7EOR), os ligantes apresentaram valores de afinidade (ΔG) na faixa aproximada de -6,1 a -4,0 kcal/mol, com a taxifolina exibindo o menor ΔG entre os compostos testados. Na inspeção das poses e da tabela de contatos, não ficaram registradas interações específicas com os aminoácidos definidos no sítio ativo para esse modelo, o que pode sugerir um encaixe mais superficial, um posicionamento fora do bolso ortostérico.

Esse padrão é coerente com a ideia de que, no NMDA, a região de acoplamento funcional envolve o núcleo de gating formado por domínios de ligação ao ligante (LBDs) e o domínio transmembranar (TMD), com mudanças conformacionais dependentes do tipo de ligante modulador. outrossim, estruturas recentes descrevem sítios alternativos relevantes, como a interface entre LBDs e uma cavidade na região de ligação LBD-TMD. Nesse contexto, a ausência de contatos no sítio ativo do 7EOR pode ser discutida como compatível com a possibilidade de ação por regiões moduladoras, em vez de um bloqueio competitivo clássico, mantendo o resultado alinhado com uma interpretação mais cautelosa e mecanisticamente plausível.

Figura 17. Complexo formado entre o receptor NMDA (PDB ID: 7EOR) e os ligantes Glutamato (vermelho), Morfina (verde), Taxifolina (amarelo), ketamina (laranja) e Naloxona (Roxo) no sítio ativo do receptor.

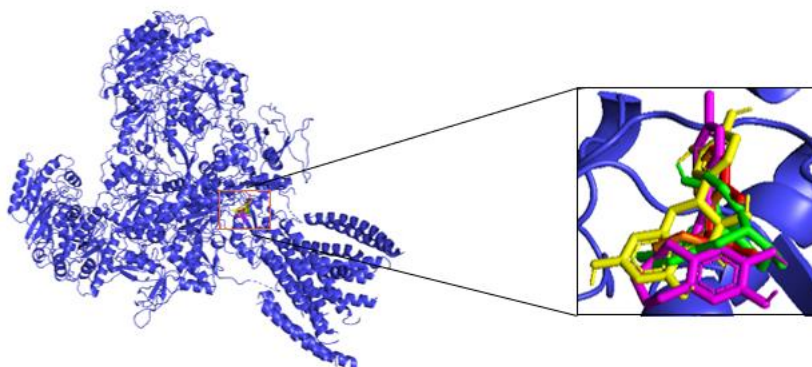


Tabela 6. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes Glutamato, Morfina, Taxifolina, ketamina e Naloxona com o receptor NMDA (PDB ID: 7EOR).

Compostos	ΔG (kcal/mol)	Ser 511	His 485	Leu 512	Gly 688	Ser 689	Tyr 730	Thr 690
Taxifolina	-6.1	---	---	---	---	---	---	---
Naloxona	-5.9	---	---	---	---	---	---	---
Glutamato	-4.9	---	---	---	---	---	---	---
ketamina	-4.9	---	---	---	---	---	---	---
Morfina	-4.0	---	---	---	---	---	---	---

Interações: nenhum dos compostos apresentou interação com os aminoácidos do sítio ativo da proteína (PDB ID: 7EOR).

5.6. Acoplamento molecular da taxifolina e alvo molecular (COX-2)

A figura 18 referente ao *docking* com o alvo COX (PDB: 6COX), eu observei na figura que taxifolina e diclofenaco aparecem ocupando a mesma cavidade catalítica. Na tabela, o diclofenaco apresentou um ΔG mais negativo (-8,3 kcal/mol) do que a taxifolina (-7,5 kcal/mol), enquanto o padrão de contatos listado sugere predominância de interações hidrofóbicas/Van der Waals, com participação de resíduos clássicos do canal de ligação de AINEs, como Arg120, Tyr355, Tyr385, Val523, Gly526, Ala527 e Ser530.

Esse recorte conversa com descrições estruturais de COX em que Arg120 e Tyr355 aparecem associados à ancoragem de inibidores, e Tyr385, Ser530 e a região de Gly526, Ala527 são frequentemente citadas como pontos de contato no canal hidrofóbico que acomoda esses ligantes.

5.7. Avaliação das características ADMET

Os compostos foram caracterizados quanto a descritores físico-químicos (HBA, HBD, LogP, MW e PSA) com o objetivo de apoiar a análise de drug-likeness em etapa de triagem, utilizando a Regra de Lipinski como critério orientativo.

Observou-se predominância de 0 violações no conjunto avaliado, enquanto capsazepina, HC-030031 e cloridrato de AMTB apresentaram 1 violação. A taxifolina exibiu MW =304,3 g/mol, LogP = 1,186 e PSA =123,8 Å², configurando um perfil relativamente polar quando comparada a ligantes como mentol e cinamaldeído. Em contraste, o cloridrato de AMTB apresentou LogP =5,048 e PSA =182,3 Å², sugerindo maior hidrofobicidade combinada a elevada área polar.

Em conjunto, esses descritores foram empregados como suporte à priorização dos compostos, considerando que a afinidade prevista em *docking* não contempla, isoladamente, limitações farmacocinéticas e de segurança, e que a incorporação de estimativas físico-químicas/ADMET em fase inicial tende a reduzir incertezas na seleção de candidatos.

Tabela 8- Parâmetros Físico-Químicos e Regra de Lipinski para Compostos Avaliados.

Molécula	HBA	HBD	LogP	MW	PSA	Rule of 5
Taxifolina	7	5	1.186	304.254	123.82	0
Cinamaldeído	1	0	1.898	132.162	59.99	0
Capsaicina	3	2	3.789	305.418	132.74	0
Morfina	4	2	1.198	285.343	123.19	0
Capsazepina	3	3	3.616	376.909	157.59	1
Naloxona	5	2	1.301	327.38	140.08	0
HC-030031	7	1	1.195	355.398	159.25	1
Mentol	1	1	2.439	156.269	69.81	0
Cloridrato de AMTB	4	1	5.048	431.001	182.26	1
Ácido acético	1	1	0.090	60.052	24.06	0
Amiloride	5	4	-1.292	229.63	89.32	0
Glutamato	3	3	-0.739	212.52	76.33	0
ketamina	2	1	2.897	237.73	100.99	0

HBA: Aceptores de ligação de hidrogênio, **HBD:** Doadores de ligação de hidrogênio, **LogP:** Lipossolubilidade, **MW (g/mol):** Peso molecular, **PSA (Å²):** Área de superfície polar, **Rule of 5:** Regra de Lipinski.

5.8. Avaliação dos Parâmetros farmacocinéticos

No conjunto avaliado, a taxifolina apresentou absorção prevista intermediária (69,34%), inferior à observada para ligantes com alta absorção estimada (por exemplo, mentol 96,54%, cinamaldeído 95,01%, cetamina 93,12% e capsaicina 90,07%), porém superior a compostos com baixa absorção prevista, como glutamato (25,42%) e amiloride (51,34%). Em distribuição, a taxifolina exibiu $VD_{ss} = -0,992$ e fração não ligada (F_u) = 0,338, situando-se em faixa intermediária de F_u quando comparada, por exemplo, ao ácido acético (0,767) e naloxona (0,548), e acima de compostos com F_u reduzida, como diclofenaco de sódio (0,10) e capsazepina (0,125). Quanto a risco metabólico/toxicológico no painel, a taxifolina foi classificada como Não para CYP e hepatotoxicidade (HEPT), contrastando com moléculas que apareceram como Sim nesses desfechos, incluindo morfina, capsaicina, capsazepina, HC-030031 e cloridrato de AMTB. Em conjunto, esses resultados *in silico* sugerem que a taxifolina combina um perfil ADME previsto moderado (absorção intermediária e F_u intermediária) com sinalizações de menor alerta no painel CYP/HEPT em comparação com alguns ligantes de referência testados, devendo ser interpretados como evidência de triagem que requer confirmação experimental.

Tabela 9- Parâmetros farmacocinéticos previstos para compostos com base no modelo pkCSM

Moleculas	% Absorbed	VDss	Fu	CYP	HEPT	TC
Taxifolin	69.34	-0.992	0.338	Não	Não	-0.039
Cinamaldeído	95.01	0.266	0.3	Não	Não	0.203
Capsaicin	90.07	0.391	0.156	Não	Sim	1.298
Morfina	70.03	0.899	0.473	Sim	Sim	0.857
Capsazepina	86.23	0.512	0.125	Sim	Sim	-0.455
Naloxona	75.65	1.42	0.548	Não	Não	1.284
HC-030031	75.73	0.523	0.376	Sim	Sim	0.496
Mentol	96.54	0.321	0.44	Não	Não	0.97
Cloridrato de AMTB	91.21	0.81	0	Sim	Sim	1.408
Ácido acético	95.46	-0.619	0.767	Não	Não	0.595
Amiloride	51.34	0.041	0.807	Não	Sim	0.273
Glutamato	25.42	-0.293	0.412	Não	Não	0.962
Ketamina	93.12	0.743	0.373	Não	Não	0.874

Absorbed: porcentagem absorvida, **VDss:** volume de distribuição em estado estacionário ($\log L \cdot kg^{-1}$), **Fu:** fração não ligada, **CYP:** inibição de substrato do citocromo P450, **Hept:** hepatotoxicidade, **Tc:** depuração renal ($\log mg/kg/dia$).

5.9. Avaliação das Predições de toxicidade

No conjunto avaliado, a taxifolina apresentou DS = 0,745 e foi classificada como None para mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos reprodutivos e irritação, associando-se a LD50 (oral, rato) = 2,007, LOAEL = 2,074 e MRTD = 0,886. Em comparação, cinamaldeído exibiu marcações High em múltiplos desfechos (Mut/Tum/Rep/Irrit) e mentol apresentou classificação High para mutagenicidade e tumorigenicidade, enquanto diclofenaco de sódio foi sinalizado como High em efeitos sobre o sistema reprodutivo. Por outro lado, compostos como capsaicina, morfina, capsazepina, naloxona, HC-030031, amiloride, glutamato e cetamina permaneceram predominantemente como None nas mesmas categorias qualitativas.

Em conjunto, esse painel de predição sugere que a taxifolina se posiciona com menor carga de alertas qualitativos quando comparada aos compostos marcados como High, além de apresentar métricas numéricas (LD50/LOAEL/MRTD) no mesmo intervalo de grandeza observado para parte dos comparadores, devendo tais achados ser interpretados como evidência de triagem a ser confirmada por ensaios experimentais.

Tabela 10: Predições de toxicidade dos compostos avaliados com potencial analgésico e anti-inflamatório.

Molécula	DL.	DS.	Mut.	Tum.	Rep.	Irrit.	LD50	LOAEL	MRTD
Cinamaldeído	-5.389	0.061	High	high	High	high	1.88	1.944	0.876
Capsaicin	-10.37	0.389	None	none	None	none	2.065	1.827	0.46
Morfina	5.088	0.912	None	none	None	none	2.438	2.282	0.176
Taxifolin	0.444	0.745	None	none	None	none	2.007	2.074	0.886
Capsazepina	1.129	0.626	None	none	None	none	2.46	1.904	-0.026
Naloxona	0.780	0.741	None	none	None	none	2.403	1.638	-1.494
HC-030031	4.094	0.848	None	none	None	none	2.689	1.263	1.123
Mentol	-1.652	0.203	High	High	None	None	2.062	1.852	1.32
Cloridrato de AMTB	3.433	0.630	None	None	None	None	2.275	2.46	0.234
Ácido acético	-2.262	0.116	High	None	High	High	1.774	2.555	1.372
Amiloride	0.181	0.730	None	none	None	none	2.062	1.229	0.935
Glutamato	-18.651	0.493	None	None	None	None	2.443	2.415	0.897
Ketamina	-6.052	0.434	None	None	None	None	2.763	1.121	0.249

DL: Druglikeness, DS: Drugscore, Mut: mutagenicity, Tum: tumorigenicity, Rep: effects on reproductive system
Irrit: irritating effects, LD₅₀: oral rat acute toxicity (mol.kg⁻¹), LOAEL: oral rat chronic toxicity (log mg.kg⁻¹
_bw.day⁻¹), MRTD: maximum recommended tolerated dose (log mg/kg/day).

6.0. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a taxifolina apresenta um perfil antinociceptivo e anti-inflamatório robusto em Zebrafish adulto (*Danio rerio*), sem evidências de toxicidade aguda até a concentração de 1,0 mg/mL. A ausência de mortalidade e de alterações locomotoras sugere que o composto não exerce efeitos sedativos ou deletérios sobre o sistema nervoso central, reforçando sua segurança inicial para uso experimental. Esses achados são consistentes com estudos prévios que apontam a baixa toxicidade da taxifolina e sua capacidade de modular vias inflamatórias sem comprometer funções fisiológicas essenciais (Zhang *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2021).

No teste da formalina, a taxifolina reduziu significativamente o comportamento nociceptivo tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória, com efeito semelhante ao da morfina em concentrações mais elevadas. Esse resultado sugere que o flavonoide pode atuar em múltiplos mecanismos de dor, incluindo modulação periférica e central. A literatura indica que flavonoides com estrutura polifenólica são capazes de interagir com receptores opioides e canais iônicos, modulando a excitabilidade neuronal e a liberação de mediadores inflamatórios (Maciel *et al.*, 2023; Castro *et al.*, 2024).

A análise dos modelos de nocicepção corneal e abdominal revelou que a taxifolina exerce efeito comparável ao da morfina, sendo este efeito prevenido por antagonistas seletivos de TRPV1 (capsazepina) e TRPA1 (HC-030031). Esses dados reforçam a hipótese de que a taxifolina interage diretamente com canais sensíveis a estímulos químicos e térmicos, modulando a transmissão nociceptiva. Estudos recentes confirmam que a ativação ou bloqueio desses canais é central para o desenvolvimento de novos analgésicos de origem natural (Basílio *et al.*, 2023).

De forma semelhante, os testes envolvendo glutamato e receptores NMDA mostraram que a taxifolina reduz a nocicepção induzida, efeito revertido pela ketamina. Isso sugere uma participação relevante da via glutamatérgica, corroborando evidências de que flavonoides podem atuar como moduladores alostéricos ou competidores em receptores excitatórios, reduzindo a hiperexcitabilidade neuronal (Ju *et al.*, 2022).

Nos modelos induzidos por mentol e TRPM8, a taxifolina também apresentou efeito antinociceptivo, prevenido pelo antagonista AMTB. Essa interação amplia o espectro de ação do composto, indicando que sua atividade não se restringe a um único canal, mas envolve múltiplos alvos relacionados à nocicepção. Essa característica de inibidor dual/multi-isoforma é particularmente relevante, pois pode explicar a eficácia ampla observada em diferentes modelos de dor (Bello-Vargas *et al.*, 2023).

Além dos efeitos antinociceptivos, a taxifolina reduziu significativamente o edema abdominal induzido por carragenina, com eficácia semelhante ao diclofenaco de sódio. Esse resultado confirma sua atividade anti-inflamatória, já descrita em modelos murinos e celulares, e sugere que o composto pode atuar como modulador da via da ciclooxigenase (COX), conforme evidenciado pelas análises de *docking* que mostraram afinidade de ligação comparável à de AINEs clássicos (Ju *et al.*, 2022; Bello-Vargas *et al.*, 2023).

Do ponto de vista farmacocinético e toxicológico, as análises *in silico* reforçam a segurança da taxifolina, com boa absorção oral prevista, ausência de hepatotoxicidade e perfil favorável segundo a regra de Lipinski. Esses parâmetros são fundamentais para a translação dos achados experimentais, uma vez que indicam viabilidade para desenvolvimento como candidato a fármaco. Em contraste, compostos como capsaicina e mentol, embora eficazes, apresentam maior risco de irritação ou toxicidade em doses elevadas (Castro *et al.*, 2024).

Em síntese, os resultados demonstram que a taxifolina atua de forma integrada sobre múltiplos alvos nociceptivos e inflamatórios, incluindo canais TRPV1, TRPA1, TRPM8, receptores NMDA e vias da COX. Essa multimodalidade de ação é um diferencial importante, pois pode reduzir a necessidade de combinações farmacológicas e minimizar efeitos adversos associados a inibidores seletivos. A literatura recente reforça que compostos naturais com perfil *multitarget* representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de analgésicos e anti-inflamatórios mais seguros e eficazes (Maciel *et al.*, 2023; Castro *et al.*, 2024).

7.0. Conclusão

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a taxifolina possui um perfil antinociceptivo e anti-inflamatório consistente em zebrafish adulto, atuando de forma integrada sobre múltiplos alvos moleculares relevantes para a fisiopatologia da dor e da inflamação. A ausência de toxicidade aguda até 1,0 mg/mL e a não interferência na atividade locomotora reforçam sua segurança inicial, enquanto os efeitos observados em diferentes modelos de nocicepção formalina, salina hipertônica, glutamato, mentol e LPS evidenciam uma ação multimodal comparável à de fármacos clássicos como morfina e diclofenaco. A reversão dos efeitos pela administração de antagonistas seletivos de TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA confirma o envolvimento direto desses canais e receptores na atividade da taxifolina, sugerindo que o composto pode modular vias centrais e periféricas da nocicepção. Além disso, os resultados de *docking* e análises *in silico* corroboram sua afinidade com sítios ativos de receptores iônicos e da ciclooxigenase, indicando potencial de interação estrutural relevante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

O perfil farmacocinético previsto, associado à ausência de hepatotoxicidade e conformidade com a regra de Lipinski, reforça sua viabilidade como candidato a fármaco. Estudos futuros, incluindo ensaios clínicos e análises translacionais, serão fundamentais para validar esses resultados e consolidar a taxifolina como uma estratégia inovadora no campo da farmacologia de produtos naturais.

8.0. Referências bibliográficas

Alay, m.; sonmez, m. G.; sakin, a.; atmaca, m.; suleyman, h.; yazici, g. N.; COBAN, A.; SULEYMAN, B.; BULUT, S.; ALTUNER, D. The effects of taxifolin on neuropathy related with hyperglycemia and neuropathic pain in rats: A biochemical and histopathological evaluation. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, v. 31, n. 4, p. 427-435, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.17219/acem/144002>.

Arellano-Aguiar, O., Solis-Angeles, S., Serrano-Garcia, L., Morales-Sierra, E., Mendez-Serrano, A., Montero-Montoya, R., 2015. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. *Journal of Fisheries Sciences*.com 9 (4), 052-062.

BASÍLIO, S. R.; MACHADO, H. S.; PEREIRA, M. A. S. S.; et al. Envolvimento dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e NMDA no efeito antinociceptivo de derivados diterpênicos em zebrafish adulto. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

Bello-vargas, j.; martínez, a.; garcía, c.; et al. Virtual screening and molecular dynamics approaches for identifying novel COX-2 inhibitors. *Computational Biology and Chemistry*, v. 104, p. 107–118, 2023.

Belo, m. A. A.; oliveira, m. F.; oliveira, s. L.; aracati, m. F.; rodrigues, l. F.; costa, c. C.; conde, g; gomes, j. M. M.; prata, m. N. L.; b, a; valverde, melo, d. C. De; eto, s. F.; fernandes, d. C.; romero, m. G. M. C.; corrêa júnior, d.; silva, j. O.; barros, a. L. B.; perez, a. C.; charlie-silva, I. Zebrafish as a model to study inflammation: A tool for drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 144, p. 112310, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112310>.

Benneh, C.K., Biney, R.P., Mante, P.K., Tandoh, A., Adongo, D.W., Woode, E., 2017. *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish-Involvement of GABAergic and 5-HT systems. *Journal of Ethnopharmacology* 207:129-145.

Caballero, Julio. A new era for the design of TRPV1 antagonists and agonists with the use of structural information and molecular *docking* of capsaicin-like compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 37, n. 1, p. 2169-2178, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2110089>.

Castro, K. K. A.; Ferreira, M. K. A.; Silva, P. T. Síntese e avaliação da atividade antinociceptiva em zebrafish de um composto heterocíclico derivado de flavonoides. *Revista Virtual de Química*, v. 16, n. 5, p. 1023-1038, 2024.

de Oliveira, M. R. C.; Santos, S. A. A. R.; do Nascimento, G. A.; da Silva, J. G. L.; Moura, L. F. W. G.; Coelho, P. A. T.; Lima, L. S.; de Oliveira, K. A.; Batista, F. L. A.; de Sousa, D. B.; Cavalcante Sobrinho, F. B.; de Araújo, S. M. B.; de Batista, A. G. A.; de Azevedo, D. V.; Bezerra, F. S.; da Silva, L. M. R.; Guedes, M. I. F.; Coutinho, H. D. M.; Farias-Pereira, R.; Raposo, R. S.; Campo, A. R.; Magalhães, F. E. A.; Lipopolysaccharide-induced abdominal nociception model in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 107748, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2025.107748>.

Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E. Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38-44, 2009.

Ekambaram, S.P., Perumal, S.S., Pavadai, S., 2017. Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model. *Inflammopharmacology* 25 (1):147-158.

Gebauer, D.L.; Pagnussat, N.; Piato, A. L.; Schaefer, I. C.; Bonan, C. D.; Lara, D. R.; Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 99, 480-486, 2011.

Goyal, Sachin; GOYAL, Shivali; GOINS, Aleyah E.; ALLES, Sascha R. A. Plant-derived natural products targeting ion channels for pain. *Neurobiology of Pain*, v. 13, 100128, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2023.100128>.

Gupta, P.; Khobragade, S. B.; Shingatgeri, V. M.; Rajaram, S. M.; Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. *Drug Development and Therapeutics* 5(2): 127-133, 2014.

Huang S.; Feng, C.W.; Hung, H.C.; Chakraborty, C.; Che, 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:e104414.

Iwasa, m.; kato, h.; iwashita, k.; yamakage, h.; kato, s.; saito, s.; ihara, m.; nishimura, h.; kawamoto, a.; suganami, t.; Taxifolin suppresses inflammatory responses of high-glucose-stimulated mouse microglia by attenuating the TXNIP–NLRP3 axis. *Nutrients*, v. 15, n. 12, p. 2738, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/12/2738>

JU, X.; LI, Y.; ZHANG, H.; et al. Structural insights into COX-2 selective inhibition: implications for rational drug design. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1867, n. 2, p. 159–170, 2022.

Kalueff, A.V., Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhaus, S.C., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., Zebrafish Neuroscience Research Consortium. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* 10 (1):70–86, 2013.

Liu, Y.; Wang, R.; Li, J.; et al. Protective effects of taxifolin against hepatic fibrosis through regulation of PI3K/Akt signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 133, p. 110993, 2021.

Maciel, J. B.; Liberato, H. R.; Silva, A. W.; et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of Nicandrin B isolated from *Datura ferox* in zebrafish. *Chemistry & Biodiversity*, v. 20, n. 7, p. e202300123, 2023.

Magalhães, F. E. A.; Batista, F. L. A.; Lima, L. M. G.; Abrante, I. A.; Baista, F. L. A.; Abrante, I. A.; de Araújo, J. I. F.; Santos, S. A. A. R.; Oliveira, B. A.; Raposo, R. S.; Campos, A. R. Adult Zebrafish (*Danio rerio*) As a Model for the Study of Corneal Antinociceptive Compounds. *Zebrafish* 15(6): 566-574, 2018.

Magalhães, F.E.A., de Sousa, C.A.P.B., Santos, S.A.A.R., Menezes, R.B., Batista, F.L.A., Abreu, A.O., de Oliveira, M.V., Moura, L.F.W.G., Raposo, R.S., Campos, A.R., Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish* 4 (5), 422-429. 2017.

Mani, R. J.; Mittal, K.; Katare, D. P.; Protective Effects of Quercetin in Zebrafish Model of Alzheimer's Disease. *Asian Journal of Pharmaceutics (Suppl)* 12 (2):S661, 2018.

Mir, M.; Khan, A.; Khan, A. Pharmacological investigation of taxifolin for its therapeutic potential in depression. *Heliyon*, v. 10, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30467>.

OECD guideline for testing acute toxicity in fishes, Test No. 1992. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Acesso em 17 de julho de 1992.

Ohnesorg E, Nils; Heintz, Céline; Lewejohann, Lars. Current Methods to Investigate Nociception and Pain in Zebrafish. *Frontiers in Neuroscience*, v. 15, p. 632634, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.632634>.

Ribeiro, S. R. L.; Santos, S. A. A. R.; Rodrigues, A. L. O.; de Sena, G. M.; Vieira-Neto, A. E.; Campos, A. R.; Bromelain regulates TRP channels to induce orofacial nociception relief in adult zebrafish. *Biochemistry and Biophysics Reports* 37:101598, 2024.

Shenoy, A.; Banerjee, A.; Upadhyay, A.; Bagwe-Parab, S.; Kaur, G.; The Brilliance of the Zebrafish Model: Perception on Behavior and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 16(861155), 2022.

Soares, I. C.; Santos, S. A. A. R.; Coelho, R. F.; Alves, Y. A.; Vieira-Neto, A. E.; Tavares, K. C. S.; Magalhães, F. E. A.; Campo, A. R.; Oleonic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors. *Chemico-Biological Interactions* 299: 37-43, 2019.

Sunil, Christudas; Xu, Baojun. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry*, v. 166, p. 112066, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112066>.

Zhang, M.; Li, X.; Wang, Y.; Wu, Z.; Liu, L. TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, n. 1, p. 261, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01464-x>.

Zhang, Y.; Zhou, X.; Li, Y.; et al. Taxifolin attenuates inflammation and oxidative stress via modulation of MAPK and NF- κ B pathways. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 894562, 2022.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da taxifolina em modelo alternativo (zebrafish adulto), integrando predições *in silico* e evidências *in vivo*. No conjunto, os resultados indicam um perfil farmacológico consistente, com ação multimodal sobre alvos associados à nocicepção e à inflamação incluindo canais TRPV1, TRPA1, TRPM8, receptores ASIC, NMDA e vias relacionadas à ciclooxigenase, o que reforça a plausibilidade de um efeito integrado em diferentes etapas da sinalização dolorosa e do processo inflamatório.

No componente *in vivo*, a taxifolina não apresentou toxicidade aguda nas condições testadas, e não interferiu na atividade locomotora, o que sugere segurança inicial e reduz a possibilidade de que os efeitos comportamentais observados sejam explicados por sedação.

As análises *in silico* corroboram esse panorama ao indicarem afinidade de ligação favorável com TRPV1, TRPA1, TRPM8, ASIC, NMDA e interação com resíduos críticos do sítio catalítico da COX-1 e COX-2, além de um perfil ADMET compatível com absorção oral satisfatória e baixa toxicidade predita.

A convergência entre predições computacionais e achados experimentais reforça a robustez do desenho integrado adotado e sustenta a taxifolina como candidata promissora no contexto da farmacologia de produtos naturais voltada ao manejo da dor e da inflamação. considerando o caráter translacional da temática e a necessidade de escalonamento de evidências, o estudo destaca a importância de estudos futuros, incluindo ensaios clínicos e análises translacionais, como etapa necessária para validar e consolidar o potencial terapêutico observado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAGID, Ahmed F. **Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists may provide a superior treatment for pain and migraine.** *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, n. 8, p. 1193-1195, 2021. DOI: 10.1021/acsmchemlett.1c00333.

ADHISH, Mazumder; MANJUBALA, I. **Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases-A review of models.** *Heliyon*, v. 9, n. 3, e14557, 2023. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14557.

AKILI, Abd Wahid Rizaldi; HARDIANTO, Ari; LATIP, Jalifah; PERMANA, Afri; HERLINA, Tati. **Virtual Screening and ADMET Prediction to Uncover the Potency of Flavonoids from Genus *Erythrina* as Antibacterial Agent through Inhibition of Bacterial ATPase DNA Gyrase B.** *Molecules*, Basel, v. 28, n. 24, art. 8010, 2023. DOI: 10.3390/molecules28248010.

ALAWI, Khadija M.; AUBDOOL, Aisah A.; LIANG, Lihuan; WILDE, Elena; VEPA, Abhinav; PSEFTELI, Maria-Paraskevi; BRAIN, Susan D.; KEEBLE, Julie E. **The sympathetic nervous system is controlled by transient receptor potential vanilloid 1 in the regulation of body temperature.** *The FASEB Journal*, v. 29, n. 10, p. 4285-4298, 2015. DOI: 10.1096/fj.15-272526.

AL-KHAYRI, Jameel M.; SAHANA, Gandasi Ravikumar; NAGELLA, Praveen; JOSEPH, Biljo V.; ALESSA, Fatima M.; AL-MSSALLEM, Muneera Q. **Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review.** *Molecules*, Basel, v. 27, art. 2901, 2022. DOI: 10.3390/molecules27092901.

ANSARI, W. A.; KHAN, M. A.; RIZVI, F.; ALI, K.; HUSSAIN, M. K.; SAQUIB, M.; KHAN, M. F. **Computational Screening of Plant-Derived Natural Products against SARS-CoV-2 Variants.** *Future Pharmacology*, Basel, v. 2, n. 4, p. 558-578, 2022. DOI: 10.3390/futurepharmacol2040034.

ARELLANO-AGUILAR, Omar; SOLIS-ANGELES, Soledad; SERRANO-GARCÍA, Luis; MORALES-SIERRA, Eduardo; MENDEZ-SERRANO, Alejandra; MONTERO-MONTOYA, Regina. **Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose: Case Study.** *Journal of Fisheries Sciences.com*, v. 9, n. 4, p. 52-62, 2015

BALDE, Akshad; RAMYA, Cunnathur Saravanan; NAZEER, Rasool Abdul. **A review on current advancement in zebrafish models to study chronic inflammatory diseases and**

their therapeutic targets. *Heliyon*, v. 10, n. 11, e31862, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e31862.

BEHRENDT, Marc. Transient receptor potential channels in the context of nociception and pain-recent insights into TRPM3 properties and function. *Biological Chemistry*, v. 400, n. 7, p. 917-926, 2019. DOI: 10.1515/hsz-2018-0455.

BRAGA, Ana Paula Andrade; SOUZA, Leticia Rosa de; LIMA, Maria Gabriela Franco; CRUZ, Jaqueline Matos; SOUZA, Ana Cristina Zullo de; COSTA, Mariana Santos; CASTRO, Vera Lucia Scherholz Salgado de; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. **The Zebrafish as an Alternative Animal Model for Ecotoxicological Research and Testing.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 67, e24220968, 2024. DOI: 10.1590/1678-4324-2024220968.

CANEDO, Aryelle; SAIKI, Patrícia; LIBERAL SANTOS, Andressa; CARNEIRO, Karla da Silva; SOUZA, Andreza Martins de; QUALHATO, Gabriel; BRITO, Rafaella da Silva; MELLO-ANDRADE, Francielli; ROCHA, Thiago Lopes. **O peixe-zebra (*Danio rerio*) encontra a bioética: os princípios éticos dos 10Rs na pesquisa.** *Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science*, Goiânia, v. 23, e70884, 2022. DOI: 10.1590/1809-6891v22e-70884.

CHOI, Tae-Young; CHOI, Tae-Ik; LEE, Yu-Ri; CHOE, Seong-Kyu; KIM, Cheol-Hee. **Zebrafish as an animal model for biomedical research.** *Experimental & Molecular Medicine*, v. 53, p. 310-317, 2021. DOI: 10.1038/s12276-021-00571-5.

DAS, Abhijit; BAIDYA, Ratna; CHAKRABORTY, Tania; SAMANTA, Akash Kumar; ROY, Souvik. **Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 142, art. 112004, out. 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112004.

DUBIN, Adrienne E.; PATAPOUTIAN, Ardem. **Nociceptors: the sensors of the pain pathway.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010. DOI: 10.1172/JCI42843.

EKAMBARAM, Sanmuga Priya; PERUMAL, Senthamil Selvan; PAVADAI, Selvaranjani. **Anti-inflammatory effect of *Naravelia zeylanica* DC via suppression of inflammatory mediators in carrageenan-induced abdominal oedema in zebrafish model.** *Inflammopharmacology*, v. 25, n. 1, p. 147-158, 2017. DOI: 10.1007/s10787-016-0303-2.

EL AISSOUQ, Abdellah; BOUACHRINE, Mohammed; OUAMMOU, Abdelkrim; KHALIL, Fouad. **Homology modeling, virtual screening, molecular docking, molecular dynamic**

(MD) simulation, and ADMET approaches for identification of natural anti-Parkinson agents targeting MAO-B protein. *Neuroscience Letters*, v. 786, art. 136803, 2022. DOI: 10.1016/j.neulet.2022.136803.

FAN, Junping; KE, Han; LEI, Jing; WANG, Jin; TOMINAGA, Makoto; LEI, Xiaoguang. **Structural basis of TRPV1 inhibition by SAF312 and cholesterol.** *Nature Communications*, v. 15, n. 1, art. 6689, 2024. DOI: 10.1038/s41467-024-51085-3.

FEIZERFAN, A.; SHEH, G. **Transition from acute to chronic pain.** *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2015. DOI: 10.1093/bjaceaccp/mku044.

FERRAZ, Camila R.; CARVALHO, Thacyana T.; MANCHOPE, Marília F.; ARTERO, Nayara A.; RASQUEL-OLIVEIRA, Fernanda S.; FATTORI, Victor; CASAGRANDE, Rubia; VERRI JR., Waldiceu A. **Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation: mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development.** *Molecules*, v. 25, 762, 2020. DOI: 10.3390/molecules25030762.

FERREIRA, Diego Q.; FERRAZ, Thamara O.; ARAÚJO, Raquel S.; CRUZ, Rodrigo Alves Souza; FERNANDES, Caio Pinho; SOUZA, Gisele C.; ORTIZ, Brenda L. S.; SARQUIS, Rosangela S. F. R.; MIRANDA, Jemima C. M. M.; GARRETT, Rafael; CARVALHO, José C. Tavares; OLIVEIRA, Anna Eliza M. de Faria Mota. **Libidibia ferrea (jucá), a traditional anti-inflammatory: a study of acute toxicity in adult and embryos zebrafish (*Danio rerio*).** *Pharmaceuticals*, Basel, v. 12, n. 4, art. 175, 2019. DOI: 10.3390/ph12040175.

FILLINGIM, Roger B. **Individual differences in pain: understanding the mosaic that makes pain personal.** *Pain*, v. 158, suppl. 1, p. S11-S18, abr. 2017. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000775.

FINNERUP, Nanna Brix; KUNER, Rohini; JENSEN, Troels Staehelin. **Neuropathic pain: from mechanisms to treatment.** *Physiological Reviews*, v. 101, p. 259-301, 2021. DOI: 10.1152/physrev.00045.2019.

FITZCHARLES, Mary-Ann; COHEN, Steven P.; CLAUW, Daniel J.; LITTLEJOHN, Geoffrey; USUI, Chie; HÄUSER, Winfried. **Nociplastic pain: towards an understanding of prevalent pain conditions.** *The Lancet*, v. 397, n. 10289, p. 2098-2110, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00392-5.

HARGREAVES, K. M.; RUPAREL, S. **Role of Oxidized Lipids and TRP Channels in Orofacial Pain and Inflammation.** *Journal of Dental Research*, v. 95, n. 10, p. 1117-1123, 2016. DOI: 10.1177/0022034516653751.

HAROUN, Michelyne; FESATIDOU, Maria; PETROU, Anthi; TRATRAT, Christophe; ZAGALLOTIS, Panagiotis; GAVALAS, Antonis; VENUGOPALA, Katharigatta N.; KOCHKAR, Hafedh; EMEKA, Promise M.; YOUNIS, Nancy S.; ELMAGHRABY, Dalia Ahmed; ALMOSTAFA, Mervt M.; CHOCHAN, Muhammad Shahzad; VIZIRIANAKIS, Ioannis S.; PAPANIMITRIOU-TSANTARLIOTOU, Aliko; GERONIKAKI, Athina. **Identification of Novel Cyclooxygenase-1 Selective Inhibitors of Thiadiazole-Based Scaffold as Potent Anti-Inflammatory Agents with Safety Gastric and Cytotoxic Profile.** *Molecules*, Basel, v. 28, n. 8, art. 3416, 2023. DOI: 10.3390/molecules28083416.

HOWE, Kerstin *et al.* **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.** *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498-503, abr. 2013. DOI: 10.1038/nature12111.

HSU, Joseph R.; MIR, Hassan; WALLY, Meghan K.; SEYMOUR, Rachel B.; ORTHOPAEDIC TRAUMA ASSOCIATION MUSCULOSKELETAL PAIN TASK FORCE. **Clinical practice guidelines for pain management in acute musculoskeletal injury.** *Journal of Orthopaedic Trauma*, v. 33, n. 5, p. e158-e182, maio 2019. DOI: 10.1097/BOT.0000000000001430.

HUANG, Shi-Ying; FENG, Chien-Wei; HUNG, Han-Chun; CHAKRABORTY, Chiranjib; CHEN, Chun-Hong; CHEN, Wu-Fu; JEAN, Yen-Hsuan; WANG, Hui-Min David; SUNG, Chun-Sung; SUN, Yu-Min; WU, Chang-Yi; LIU, Wangta; HSIAO, Chung-Der; WEN, Zhi-Hong. **A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema.** *PLOS ONE*, v. 9, n. 8, e104414, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0104414.

IFTINCA, Mircea; DEFAYE, Manon; ALTIER, Christophe. TRPV1-targeted drugs in development for human pain conditions. *Drugs*, v. 81, n. 1, p. 7-27, 2021. DOI: 10.1007/s40265-020-01429-2.

JANSEN, C.; SHIMODA, L. M. N.; KAWAKAMI, J. K. *et al.* **Myrcene and terpene regulation of TRPV1.** *Channels (Austin)*, v. 13, n. 1, p. 344-366, dez. 2019. DOI: 10.1080/19336950.2019.1654347.

KAUR, Baljit; SINGH, Palwinder. **Inflammation: Biochemistry, cellular targets, anti-inflammatory agents and challenges with special emphasis on cyclooxygenase-2.** *Bioorganic Chemistry*, v. 121, art. 105663, 2022. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.105663.

KAUR, Hardeep; KAUSHIK, Ujjwal; CHOUDHARY, Neeraj. **Therapeutics Effects of the Genus Citrus in Anxiety Disorder.** *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, v. 15, n. 4, p. 373-388, 2024. DOI: 10.1177/0976500X241278037.

KHAN, Amna; KHAN, Salman; KIM, Yeong Shik. **Insight into Pain Modulation: Nociceptors Sensitization and Therapeutic Targets.** *Current Drug Targets*, v. 20, n. 7, p. 775-788, 2019. DOI: 10.2174/1389450120666190131114244.

KOGA, Rosemary de Carvalho Rocha; SOUZA, Agerdânio Andrade de; SALES, Priscila Faimann; FERREIRA, Adriana Maciel; SOUZA, Gisele Custódio de; CARVALHO, José Carlos Tavares. **Anti-inflammatory and antinociceptive potential of hydroeth-anolic extract of Bauhinia guianensis Aubl. in Zebrafish (*Danio rerio*).** *Preprints.org*, 19 jul. 2023. Preprint. DOI: 10.20944/preprints202307.1340.v1.

KOIVISTO, Ari; JALAVA, Niina; BRATTY, Raymond; PERTOVAARA, Antti. **TRPA1 antagonists for pain relief.** *Pharmaceuticals* (Basel), v. 11, n. 4, art. 117, 2018. DOI: 10.3390/ph11040117.

KOIVISTO, Ari; JALAVA, Niina; RANTANEN, Marja; CHAPMAN, Hugh; HOLM, Patrik; PERTOVAARA, Antti. **TRPA1 antagonists for pain relief. In: SZALLASI, Arpad (Ed.). TRP Channels as Therapeutic Targets: Advances in Basic Science and Clinical Use.** 2. ed. London: Academic Press, 2024. p. 185-202. DOI: 10.1016/B978-0-443-18653-0.00032-0.

KUNER, Rohini; KUNER, Thomas. **Cellular circuits in the brain and their modulation in acute and chronic pain.** *Physiological Reviews*, v. 101, n. 1, p. 213-258, jan. 2021. DOI: 10.1152/physrev.00040.2019

LANKA, Goverdhan; BEGUM, Darakhshan; BANERJEE, Suvankar; ADHIKARI, Nilanjan; YOGESWARI, P.; GHOSH, Balam. **Pharmacophore-based virtual screening, 3D QSAR, Docking, ADMET, and MD simulation studies: An in silico perspective for the identification of new potential HDAC3 inhibitors.** *Computers in Biology and Medicine*, v. 166, p. 107481, 2023. DOI: 10.1016/j.combiomed.2023.107481.

LEE, Hye Eun; YANG, Gabsik; HAN, Sin-Hee; LEE, Jeong-Hoon; AN, Tae-Jin; JANG, Jae-Ki; LEE, Joo Young. **Anti-obesity potential of *Glycyrrhiza uralensis* and licochalcone A**

through induction of adipocyte browning. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 503, n. 3, p. 2117-2123, 2018. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.168.

LIU, Chang; REESE, Rebecca; VU, Simon; ROUGÉ, Lionel; SHIELDS, Shannon D.; KAKIUCHI-KIYOTA, Satoko; CHEN, Huifen; JOHNSON, Kevin; SHI, Yu Patrick; CHERNOV-ROGAN, Tania; GREINER, Demi Maria Zabala; KOHLI, Pawan Bir; HACKOS, David; BRILLANTES, Bobby; TAM, Christine; LI, Tianbo; WANG, Jianyong; SAFINA, Brian; MAGNUSON, Steve; VOLGRAF, Matthew; PAYANDEH, Jian; ZHENG, Jie; ROHOU, Alexis; CHEN, Jun. **A Non-covalent Ligand Reveals Biased Agonism of the TRPA1 Ion Channel.** *Neuron*, v. 109, n. 2, p. 273-284.e4, 2021. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.10.014.

LIU, Jing; WU, Yingxue; XU, Yanni; HAN, Ying; KANG, Shuai; DAI, Zhong; JIN, Hongyu; WEI, Feng; MA, Shuangcheng. **Toxicity Study on Crude Alkaloid Extracts of *Houttuynia herba* Based on Zebrafish and Mice.** *Molecules*, Basel, v. 29, n. 5, art. 1107, 2024. DOI: 10.3390/molecules29051107.

LIU, Yang; SHI, Xiaolu; TIAN, Ye; ZHAI, Shaobo; LIU, Yuyan; XIONG, Zhengrong; CHU, Shunli. **An insight into novel therapeutic potentials of taxifolin.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 14, art. 1173855, 2023. DOI: 10.3389/fphar.2023.1173855.

LUO, Lianxiang; ZHONG, Ai; WANG, Qu; ZHENG, Tongyu. **Structure-Based Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, Molecular Docking, ADMET, and Molecular Dynamics (MD) Simulation of Potential Inhibitors of PD-L1 from the Library of Marine Natural Products.** *Marine Drugs*, Basel, v. 20, n. 1, art. 29, 2022. DOI: 10.3390/md20010029.

LUO, Yuhui; SUTTLE, Abbie; ZHANG, Qiaojuan; WANG, Peng; CHEN, Yong. **Transient Receptor Potential (TRP) Ion Channels in Orofacial Pain.** *Molecular Neurobiology*, v. 58, n. 6, p. 2836-2850, 2021. DOI: 10.1007/s12035-021-02284-2.

MACPHERSON, Lindsey J.; XIAO, Bailong; KWAN, Kelvin Y.; PETRUS, Matt J.; DUBIN, Adrienne E.; HWANG, SunWook; CRAVATT, Benjamin; COREY, David P.; PATAPOUTIAN, Ardem. **An ion channel essential for sensing chemical damage.** *The Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 42, p. 11412-11415, 2007. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3600-07.2007.

MAGALHÃES, Francisco Ermani Alves; BATISTA, Francisco Lucas Alves; LIMA, Luiza Michelly Gonçalves; ABRANTE, Izamar de Araújo; BATISTA, Francisca Leividânia Alves; ABRANTE, Izabel de Araújo; ARAÚJO, José Ismael Feitosa de; SANTOS, Sacha Aubrey

Alves Rodrigues; OLIVEIRA, Breytiner Amaro de; RAPOSO, Ramon da Silva; CAMPOS, Adriana Rolim. **Adult Zebrafish (*Danio rerio*) As a Model for the Study of Corneal Antinociceptive Compounds.** *Zebrafish*, v. 15, n. 6, p. 566-574, 2018. DOI: 10.1089/zeb.2018.1633.

MAGALHÃES, Francisco Ernani Alves; SOUSA, Caio Átila Prata Bezerra de; SANTOS, Sacha Aubrey Alves Rodrigues; MENEZES, Renata Barbosa; BATISTA, Francisco Lucas Alves; ABREU, Ângela Oliveira; OLIVEIRA, Messias Vital de; MOURA, Luiz Francisco Wemmenson Gonçalves; RAPOSO, Ramon da Silva; CAMPOS, Adriana Rolim. **Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception.** *Zebrafish*, v. 14, n. 5, p. 422-429, 2017. DOI: 10.1089/zeb.2017.1436.

MCNAMARA, Colleen R.; MANDEL-BREHM, Josh; BAUTISTA, Diana M.; SIEMENS, Jan; DERANIAN, Kari L.; ZHAO, Michael; HAYWARD, Neil J.; CHONG, Jayhong A.; JULIUS, David; MORAN, Magdalene M.; FANGER, Christopher M. **TRPA1 mediates formalin-induced pain.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0705924104.

MESSIAS, Cátia Regina; CUNHA, Felipe Augusto; CREMASCO, Gabriela da Silva; BAPTISTA, Makilim Nunes. **Dor crônica, depressão, saúde geral e suporte social em pacientes fibromiálgicos e oncológicos.** *Revista Psicologia e Saúde*, Campo Grande, v. 12, n. 4, p. 41-51, out./dez. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.20435/pssa.vi.819>.

MILI, Chiranjib; DOWARAH, Bhaskar; DUTTA, Champak; LASKAR, Rafiul Amin; TAYUNG, Kumanand; BORUAH, Tridip. **A comprehensive review on traditional uses, phytochemical, and pharmacological properties of the genus *Antidesma* L.** *Fitoterapia*, v. 176, p. 106023, jul. 2024. DOI: 10.1016/j.fitote.2024.106023.

MOCcia, Francesco; MONTAGNA, Daniela. **Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as a Sensor of Oxidative Stress in Cancer Cells.** *Cells*, Basel, v. 12, n. 9, art. 1261, 2023. DOI: 10.3390/cells12091261.

MOGI, Muneto; MENDONZA, Anisha E.; CHASTAIN, James; DEMIRS, John T.; MEDLEY, Quintus G.; ZHANG, Qin; PAPILLON, Julien P. N.; YANG, Junzheng; GAO, Yan; XU, YongYao; STASI, Kalliopi. **Ocular Pharmacology and Toxicology of TRPV1 Antagonist SAF312 (Libvatrep).** *Translational Vision Science & Technology*, v. 12, n. 9, art. 5, 2023. DOI: 10.1167/tvst.12.9.5.

MORGAN, Michael; NENCINI, Sara; THAI, Jenny; IVANUSIC, Jason J. **TRPV1 activation alters the function of A δ and C fiber sensory neurons that innervate bone.** *Bone*, v. 123, p. 168-175, jun. 2019. DOI: 10.1016/j.bone.2019.03.040.

MUNSTER, Vincent J.; FELDMANN, Friederike; WILLIAMSON, Brandi N.; VAN DOREMALEN, Neeltje; PÉREZ-PÉREZ, Lizzette; SCHULZ, Jonathan; MEADE-WHITE, Kimberly; OKUMURA, Atsushi; CALLISON, Julie; AVANZATO, Victoria A.; DE WIT, Emmie; ROSENKE, Rebecca; HANLEY, Patrick W.; SATURDAY, Greg; SCOTT, Dana; BRUMBAUGH, Beniah; FISCHER, Elizabeth R. **Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2.** *Nature*, v. 585, n. 7824, p. 268-272, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2324-7.

OECD guideline for testing acute toxicity in fishes, Test No. 1992. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>.

OLIVEIRA, Breytiner Amaro de; SANTOS, Sacha Aubrey Alves Rodrigues; PEREIRA, Erik Willyame Menezes; NOGUEIRA, Andressa Barros; VIEIRA NETO, Antônio Eufrásio; MELO JÚNIOR, José de Maria de Albuquerque de; DAMASCENO, Marina de Barros Mamede Vidal; QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo José; SESSLE, Barry John; MAGALHÃES, Francisco Ernani Alves; CAMPOS, Adriana Rolim. **Orofacial Antinociceptive Effect of Nifedipine in Rodents Is Mediated by TRPM3, TRPA1, and NMDA Processes.** *Journal of Oral & Facial Pain and Headache*, v. 34, n. 2, p. 174-186, 2020. DOI: 10.11607/ofph.2491.

OLIVEIRA, Maria Rayane Correia de; SANTOS, Sacha Aubrey Alves Rodrigues; NASCIMENTO, Gabriela Alves do; SILVA, João Gabriel Leite da; MOURA, Luiz Francisco Wemmenson Gonçalves; COELHO, Paulo Adenes Teixeira; LIMA, Lorena Silva; OLIVEIRA, Kecianny Alves de; BATISTA, Francisco Lucas Alves; SOUSA, Daniela Braga de; SOBRINHO, Francisco Bastos Cavalcante; ARAÚJO, Sandra Maria Barbosa de; BATISTA, Antonio Gustavo de Almeida; AZEVEDO, Djane Ventura de; BEZERRA, Franciglauber Silva; SILVA, Larissa Morais Ribeiro da; GUEDES, Maria Izabel Florindo; COUTINHO, Henrique Douglas Melo; FARIAS-PEREIRA, Renalison; RAPOSO, Ramon da Silva; CAMPOS, Adriana Rolim; MAGALHÃES, Francisco Ernani Alves. **Lipopolysaccharide-induced abdominal nociception behavioral model in adult zebrafish (*Danio rerio*).** *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 135, art. 107748, 2025. DOI: 10.1016/j.vascn.2025.107748.

PAIVA, Cristiane Félix de. Estudo químico e farmacológico de plantas da caatinga: *Cenostigma pyramidale* e *Libidibia ferrea*. 2021. 114 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

PARISI, J. R. Participação dos receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1) no controle da dor neuropática. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

PATHAN, Sameer A.; MITRA, Biswadev; CAMERON, Peter A. **A systematic review and meta-analysis comparing the efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, opioids, and paracetamol in the treatment of acute renal colic.** *European Urology*, v. 73, n. 4, p. 583-595, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.11.001.

PAUL, Alok K.; SMITH, Craig M.; RAHMATULLAH, Mohammed; NISSAPATORN, Veeranoot; WILAIRATANA, Polrat; SPETEA, Mariana; GUEVEN, Nuri; DIETIS, Nikolas. **Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review.** *Pharmaceuticals*, Basel, v. 14, n. 11, art. 1091, 2021. DOI: 10.3390/ph14111091.

PEREIRA, W. B. Relação dos canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) e a dor: uma revisão. 2013. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)- Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

PÉREZ DE VEGA, M. Jesús et al. Transient Receptor Potential Melastatin 8 Channel (TRPM8) Modulation: Cool Entryway for Treating Pain and Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, n. 22, p. 10006-10029, 2016. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00305.

PRATA, M. N. L.; et al. Anti-inflammatory and immune properties of the peltatoside, isolated from the leaves of *Annona crassiflora* Mart., in a new experimental model zebrafish. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 101, p. 234-243, 2020. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.03.044.

RAJA, Srinivasa N.; CARR, Daniel B.; COHEN, Milton; FINNERUP, Nanna B.; FLOR, Herta; GIBSON, Stephen; KEEFE, Francis J.; MOGIL, Jeffrey S.; RINGKAMP, Matthias; SLUKA, Kathleen A.; SONG, Xue-Jun; STEVENS, Bonnie; SULLIVAN, Mark D.; TUTELMAN, Perri R.; USHIDA, Takahiro; VADER, Kyle. **The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises.** *Pain*, v. 161, n. 9, p. 1976-1982, 2020. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001939.

RAO, Prashant N.; MAINKAR, Ojas; BANSAL, Nitin; RAKESH, Neal; HAFHEY, Paul; URITS, Ivan; ORHURHU, Vwaire; KAYE, Alan D.; URMAN, Richard D.; GULATI, Amitabh; JONES, Mark. **Flavonoids in the Treatment of Neuropathic Pain.** *Current Pain and Headache Reports*, v. 25, n. 7, art. 43, 2021. DOI: 10.1007/s11916-021-00959-y.

RIBEIRO, Saulo Rodrigo Lucas; SANTOS, Sacha Aubrey Alves Rodrigues; RODRIGUES, Ana Livia Oliveira de Sousa; SENA, Gabriella Mesquita de; VIEIRA-NETO, Antônio Eufrásio; CAMPOS, Adriana Rolim. **Bromelain regulates TRP channels to induce orofacial nociception relief in adult zebrafish.** *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 37, art. 101598, mar. 2024. DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101598.

RUCHIKA; SHARMA, Amit; SANEJA, Ankit. **Zebrafish as a powerful alternative model organism for preclinical investigation of nanomedicines.** *Drug Discovery Today*, v. 27, n. 5, p. 1513-1522, maio 2022. DOI: 10.1016/j.drudis.2022.02.011.

SAHA, Asmita; DESAI, Belaguppa Manjunath Ashwin; BISWAS, Pronama. **Multi-Ligand Simultaneous Docking Analysis of *Moringa oleifera* Phytochemicals Reveals Enhanced BCL-2 Inhibition via Synergistic Action.** *arXiv*, 2025. arXiv:2505.12073. DOI: 10.48550/arXiv.2505.12073.

SANTIAGO, Magda Regina; FÉLIX, Mariana Sandes. **Bioethical and practical aspects of experimentation with zebrafish embryos and adults.** *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 91, p. 1-5, e00012024, 2024. DOI: 10.1590/1808-1657000012024.

SANTOS, Wagner Barbosa Da Rocha; GUIMARÃES, Juliana Oliveira; PINA, Lícia Tairiny Santos; SERAFINI, Mairim Russo; GUIMARÃES, Adriana Gibara. **Antinociceptive effect of plant-based natural products in chemotherapy-induced peripheral neuropathies: A systematic review.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, art. 1001276, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.1001276.

SHI, Xuan-Zheng; LINDHOLM, Paul F.; SARNA, Sushil K. **NF- κ B activation by oxidative stress and inflammation suppresses contractility in colonic circular smooth muscle cells.** *Gastroenterology*, v. 124, p. 1369-1380, 2003. DOI: 10.1016/S0016-5085(03)00263-4.

SHOAIB, Tagyedeem H.; ABDELMONIEM, Nihal; MUKHTAR, Rua M.; ALQHTANI, Amal Th.; ALALAWI, Abdullah L.; ALAWAJI, Razan; ALTHUBYANI, Mashael S.; MOHAMED, Shaimaa G. A.; MOHAMED, Gamal A.; IBRAHIM, Sabrin R. M.; HUSSEIN, Hazem G. A.; ALZAIN, Abdulrahim A. **Molecular Docking and Molecular Dynamics Studies Reveal the**

Anticancer Potential of Medicinal-Plant-Derived Lignans as MDM2-P53 Interaction Inhibitors. *Molecules*, Basel, v. 28, n. 18, art. 6665, 2023. DOI: 10.3390/molecules28186665.

SMITH, S. R.; DESHPANDE, B. R.; COLLINS, J. E.; KATZ, J. N.; LOSINA, E. **Comparative pain reduction of oral non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids for knee osteoarthritis: systematic analytic review.** *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 24, n. 6, p. 962-972, 2016. DOI: 10.1016/j.joca.2016.01.135.

SNEDDON, Lynne U.; SCHROEDER, Paul; ROQUE, Ana; FINGER-BAIER, Karin; FLEMING, Angeleen; TINMAN, Simon; COLLET, Bertrand. **Pain management in zebrafish: Report from a FELASA Working Group.** *Laboratory Animals*, v. 58, n. 3, p. 261-276, 2024. DOI: 10.1177/00236772231198733.

SOARES, Isabel Cristina R.; SANTOS, Sacha Aubrey A. R.; COELHO, Regina F.; ALVES, Yuri A.; VIEIRA-NETO, Antônio E.; TAVARES, Kaio César S.; MAGALHÃES, Francisco Ernani A.; CAMPOS, Adriana R. **Oleanolic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 299, p. 37-43, 2019. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.11.018.

SOUZA, Agerdânio Andrade de; SÁNCHEZ ORTÍZ, Brenda Lorena; FERREIRA BORGES, Swanny; PENA PINTO, Andria Vanessa; RAMOS, Ryan da Silva; COLARES PENA, Igor; ROCHA KOGA, Rosemary de Carvalho; BATISTA, Carla Estefani; SOUZA, Gisele Custódio de; FERREIRA, Adriana Maciel; DUVOISIN JUNIOR, Sergio; CARVALHO, José Carlos Tavares. **Acute Toxicity and Anti-Inflammatory Activity of *Trattinnickia rhoifolia* Willd (Sucuruba) Using the Zebrafish Model.** *Molecules* (Basel), v. 27, n. 22, art. 7741, 2022. DOI: 10.3390/molecules27227741.

SUNIL, Christudas; XU, Baojun. **An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin).** *Phytochemistry*, v. 166, art. 112066, out. 2019. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112066.

TOPAL, Fevzi; NAR, Meryem; GOCER, Hulya; KALIN, Pınar; KOCYIGIT, Umit M.; GÜLÇİN, İlhami; ALWASEL, Saleh H. **Antioxidant activity of taxifolin: an activity-structure relationship.** *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 31, n. 4, p. 674-683, 2016. DOI: 10.3109/14756366.2015.1057723.

VARDHAN, Seshu; SAHOO, Suban K. **In silico ADMET and molecular docking study on searching potential inhibitors from limonoids and triterpenoids for COVID-19.** *Computers in Biology and Medicine*, v. 124, p. 103936, 2020. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2020.103936.

VISHWAKARMA, Rahul Kumar; NEGI, D. S. **The development of COX-1 and COX-2 inhibitors: a review.** *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 11, n. 8, p. 3544-3555, 2020. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(8).3544-55.

VITALE, Rosa Maria; DE PETROCELLIS, Luciano; AMODEO, Pietro. **An updated patent review of TRPA1 antagonists (2020-present).** *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 34, n. 5, p. 315-332, maio 2024. DOI: 10.1080/13543776.2024.2364798.

YANG, Huaqiang; WU, Zhenfang. **Genome Editing of Pigs for Agriculture and Biomedicine.** *Frontiers in Genetics*, v. 9, art. 360, 2018. DOI: 10.3389/fgene.2018.00360.

YSRAFIL, Ysrafil; SAPIUN, Zulfiayu; SLAMET, Nangsih Sulastri; MOHAMAD, Fihrina; HARTATI, Hartati; DAMITI, Sukmawati A.; ALEXANDRA, Francisca Diana; RAHMAN, Sudarman; MASYENI, Sri; HARAPAN, Harapan; MAMADA, Sukamto S.; EMRAN, Talha Bin; NAINU, Firzan. **Anti-inflammatory activities of flavonoid derivates.** *ADMET and DMPK*, v. 11, n. 3, p. 331-359, 2023. DOI: 10.5599/admet.1918.

ZAHRA, Mehak; ABRAHAMSE, Heidi; GEORGE, Blassan P. **Flavonoids: Antioxidant Powerhouses and Their Role in Nanomedicine.** *Antioxidants*, Basel, v. 13, n. 8, art. 922, 2024. DOI: 10.3390/antiox13080922.

ZAREI, Mohammad Mahdi; ABDOLMALEKI, Zohreh; SHAHIDI, Siamak. **Bioflavonoid exerts analgesic and anti-inflammatory effects via transient receptor potential 1 channel in a rat model.** *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 80, n. 9, p. 900-907, 2022. DOI: 10.1055/s-0042-1755321.

ZHANG, Xingyan; LIAN, Xiaoyan; LI, Huling; ZHAO, Wenjing; LI, Xin; ZHOU, Fujun; ZHOU, Yutong; CUI, Tao; WANG, Yuli; LIU, Changxiao. Taxifolin attenuates inflammation via suppressing MAPK signal pathway in vitro and in silico analysis. *Chinese Herbal Medicines*, v. 14, p. 554-562, 2022. DOI: 10.1016/j.chmed.2021.03.002.

ZHANG, Yun; XIA, Qing; WANG, Jiabo; ZHUANG, Kaiyan; JIN, Hongtao; LIU, Kechun. **Progress in using zebrafish as a toxicological model for traditional Chinese medicine.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 282, art. 114638, 2022. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114638.

ZHAO, Guanghai; SHI, Yongqiang; GONG, Chaoyang; LIU, Taicong; NAN, Wei; MA, Lin; WU, Zuolong; DA, Chaoming; ZHOU, Kaisheng; ZHANG, Haihong. **Curcumin exerts antinociceptive effects in cancer-induced bone pain via an endogenous opioid mechanism.** *Frontiers in Neuroscience*, v. 15, art. 696861, 2021. DOI: 10.3389/fnins.2021.696861.

ANEXOS 1



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO CEARÁ

Comissão de Ética para o Uso de Animais
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Itaperi
CEP 60740-903 – fone 3101-9890
ceua.uece@uece.br – www.uece.br/ceua



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria de Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Bioprospecção de atividades biológicas e farmacológicas de produtos naturais e/ou sintéticos de plantas medicinais em zebrafish (*Danio rerio*) adulto", registrado sob o número 04009489/2023, tendo como pesquisador principal Francisco Ernani Alves Magalhães, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE). Este certificado expira-se em 31 de Julho de 2026.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled "Bioprospecting of biological and pharmacological activities of natural and/or synthetic medicinal plant products in adult zebrafish (*Danio rerio*)" registered with the protocol 04009489/2023, under the supervision of Francisco Ernani Alves Magalhães, is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE). This certificate will expire on July 31st, 2026.

RESUMO

Vigência do projeto	Início	06/09/2023	Fim	31/07/2026	
Espécie/Linhagem	Danio rerio - Zebrafish – peixe paulistinha				
Número de animais	15.000	Peso	0,3 a 0,5 gr	Idade	60-90 dias
Sexo	X	Feminino	X	Masculino	
Origem: AGROQUÍMICA – Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda – Reg MMA – 614677 – CNPJ - 73.899.502/0001-70. Verificar validade do registro regularmente.					
Metodologia	X	Adequada		Não adequada	
Cronograma	X	Adequado		Ausente/ Não adequado	
Ofício de encaminhamento	X	Presente		Ausente/ Não adequado	
Orçamento	X	Adequado		Ausente/ Não adequado	
Protocolo Sisgen/Ibama/outras autorizações	Revendedor autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente, com registro Reg MMA – 614677.				
Financiamento	Órgão de fomento	Recursos de pesquisa e parcerias			
	Edital ou N. processo	-			

Fortaleza, 06 de Setembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br VANIA MARILANDE CECCATTO
Data: 06/09/2023 08:40:25-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Vania Marilande Ceccatto
Presidente CEUA-UECE