

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 *Danio rerio* (Zebrafish) 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 nocicepção 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 nocicepção e inflamação (TRPV1, TRPA1, TRPM8, NMDA, ASIC e COX-2).

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 μ L; *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 μ L; *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 μ L), 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 μ L; *v.o.*), bem como 30 min após administração via intraperitoneal de morfina (Mor; Controle positivo; 0,4 mg/mL; 20 μ L; *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 μ L; *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 μ g/mL; 3,0 μ L), 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 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 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 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.

3.2. 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, 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 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.

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 ($F_{5, 30} = 16,75$).

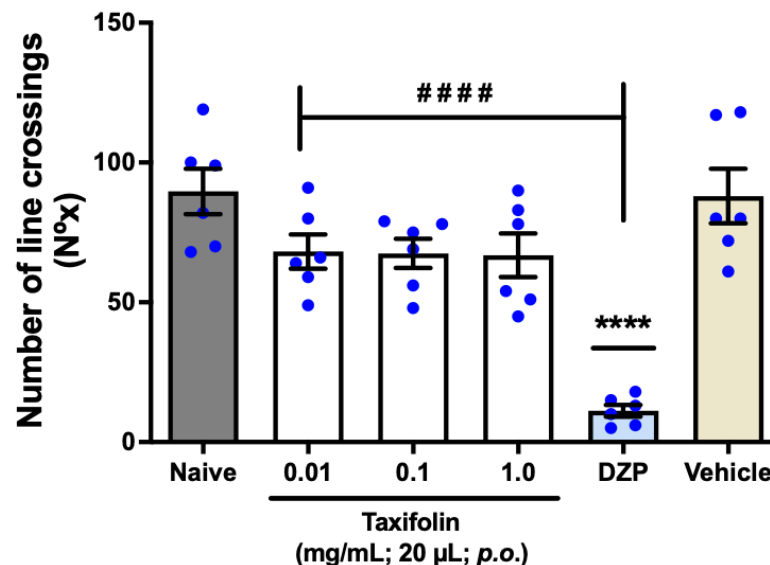


Figura 1. Efeito da taxifolina sob a atividade locomotora do zebrafish (*Danio rerio*) adulto, analisado no Teste de Campo Aberto (0-5 min). Naive - animais não tratados. DZP – diazepam (Controle sedativo; 10 mg/mL; 20 μ L; v.o.). V - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; v.o.). Os valores representam a média \pm 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).

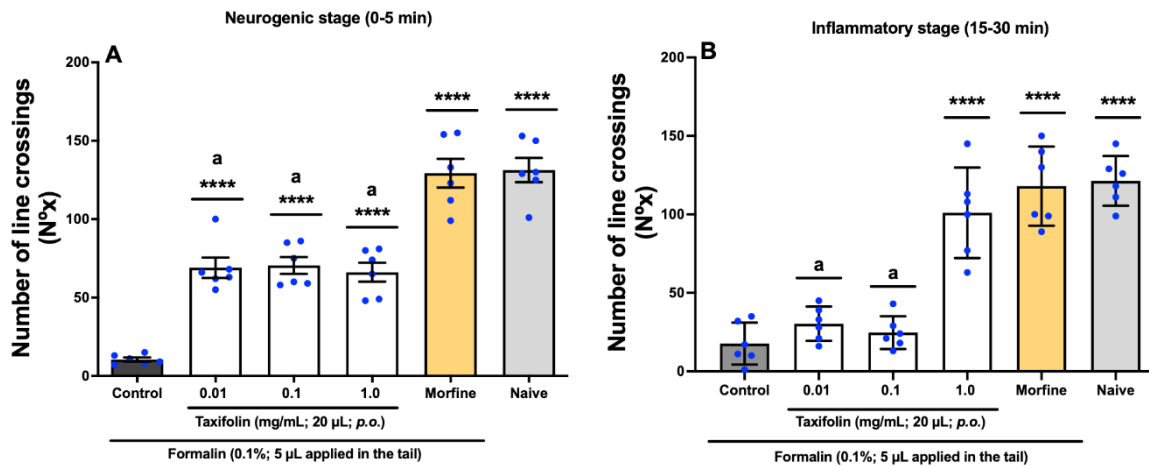


Figura 2. Efeito da taxifolina sob o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pela formalina, analisado em ambas as fases do teste. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Morfina (Controle antinociceptivo; 0,2 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \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 ($F_{5,30} = 11,99$).

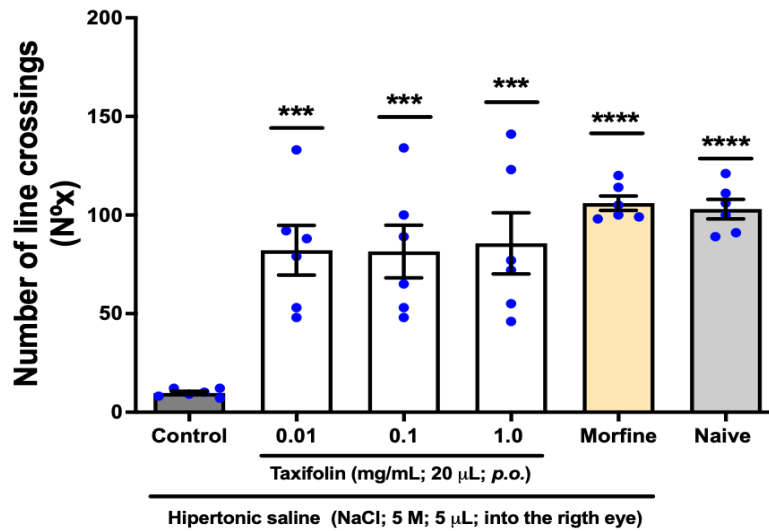


Figura 3. Efeito da taxifolina sob o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pela salina hipertônica, analisado de 0-5 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Morfina (Controle antinociceptivo; 0,4 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro 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 ($F_{4,25} = 42,45$).

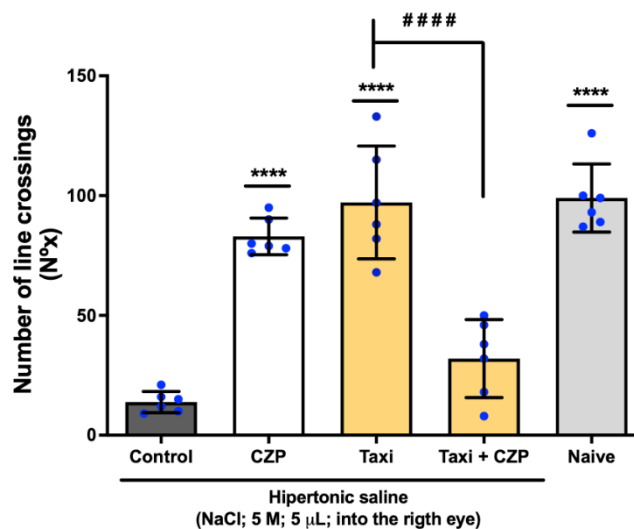


Figura 4. Efeito da capsazepina (CZP; antagonista do TRPV1; 0,5 mg/mL; 20 μ L; *i.p.*) sob o efeito antinociceptivo corneal da taxifolina (Taxi; 0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em Zebrafish adulto, analisado de 0-5 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores 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 ($F_{5,30} = 15,32$).

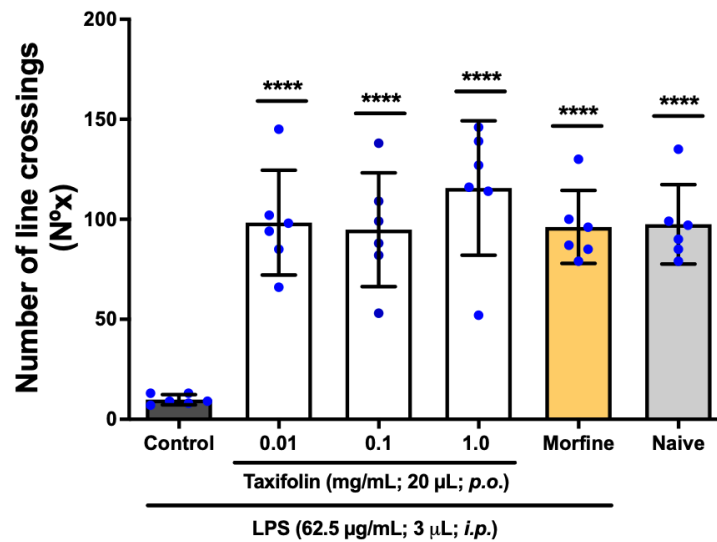


Figura 5. Efeito da taxifolina sob o comportamento nociceptivo abdominal em ZFa induzido pela LPS (agonista TRPA1; 62,5 µg/mL; 3,0 µL; *i.p.*), analisado durante 5 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 µL; *v.o.*). Morfina (Controle antinociceptivo; 0,2 mg/mL; 5,0 µL; *i.p.*). Naive - animais não tratados. 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 ($F_{4,25} = 46,86$).

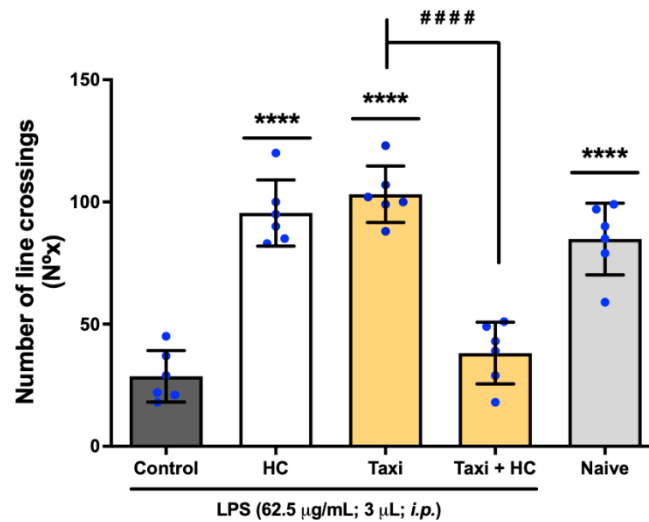


Figura 6. Efeito do HC (HC-030031; antagonista TRPA1; 0,1 mg/mL; 5,0 μ L; *i.p.*) sob o efeito antinociceptivo abdominal da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em ZFa. A nocicepção abdominal foi induzida pela LPS (agonista TRPA1; 0,0625 mg/mL; 3,0 μ L; *i.p.*), analisada durante 5 min. Controle - 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 ($F_{5,30} = 24,90$).

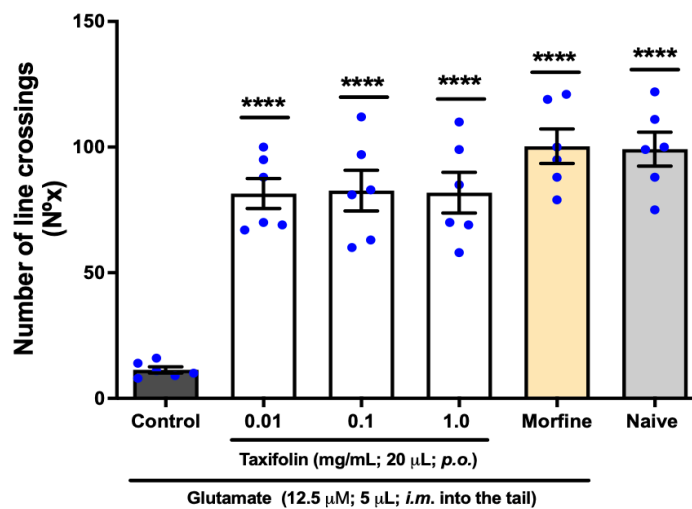


Figura 7. Efeito da taxifolina sob o comportamento nociceptivo em ZFa induzido pelo glutamato (12,5 μ M, 5,0 μ L aplicado na calda), analisado durante 0-15 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Morfina (Controle antinociceptivo; 0,2 mg/mL; 5,0 μ L; *i.p.*). Naive - animais não tratados. 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)

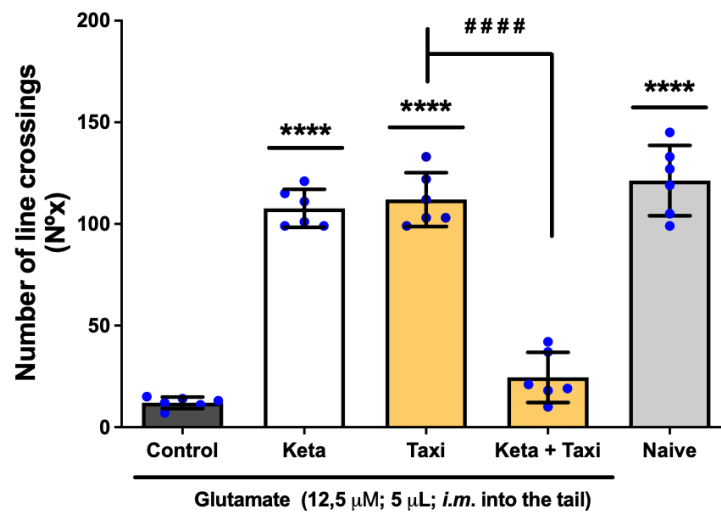


Figura 8. Efeito da ketamina (Keta; antagonista NMD) sob o efeito antinociceptivo da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em ZFa. A nociceção foi induzida pela ketamina (0,001%; 5,0 μ L; *i.p.* aplicada na calda), analisada durante 0-15 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais 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).

4.9. Envolvimento dos receptores glutamatérgicos (NMDA)

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

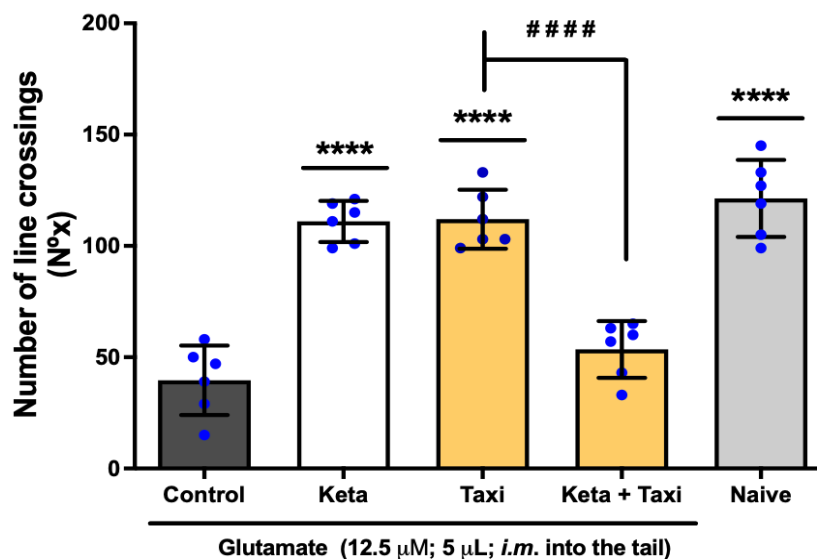


Figura 9. Efeito da ketamina (Keta; antagonista NMDA; 0,001%; 5,0 μ L; *i.p.*) sob o efeito antinociceptivo da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em ZFa, analisado durante 0-15 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro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

4.10. 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 ($F_{5,30} = 38,08$).

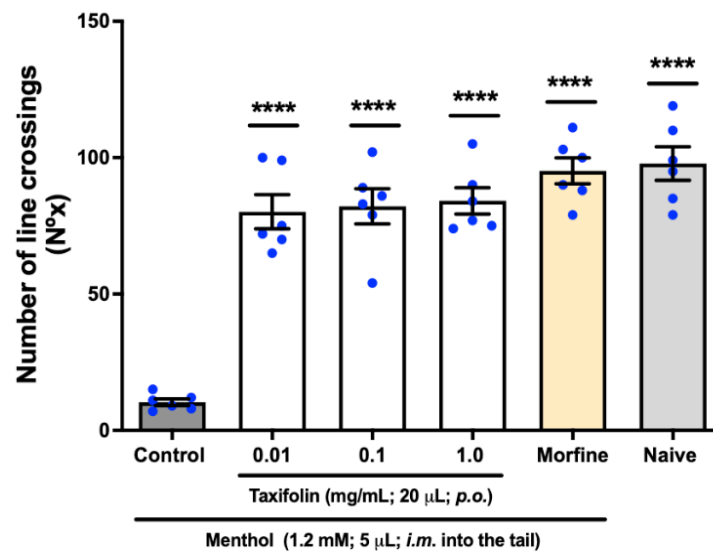


Figura 10. Efeito do mentol (agonista TRPM8) sob o efeito antinociceptivo da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em ZFa, analisada durante 0-10 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para 6 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 ($F_{4,25} = 130,4$).

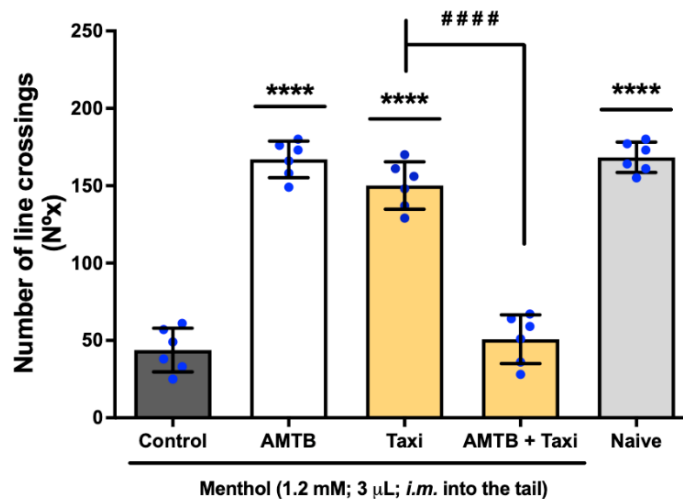


Figura 11. Efeito AMTB (antagonista TRPM8; 0,3 mg/mL; 5,0 μ L; *i.p.*) sob o efeito antinociceptivo da taxifolina (0,01 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*) em ZFa, analisado durante 0-10 min. Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). Naive - animais não tratados. Os valores representam a média \pm erro padrão 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 ($F_{4,25} = 62,53$).

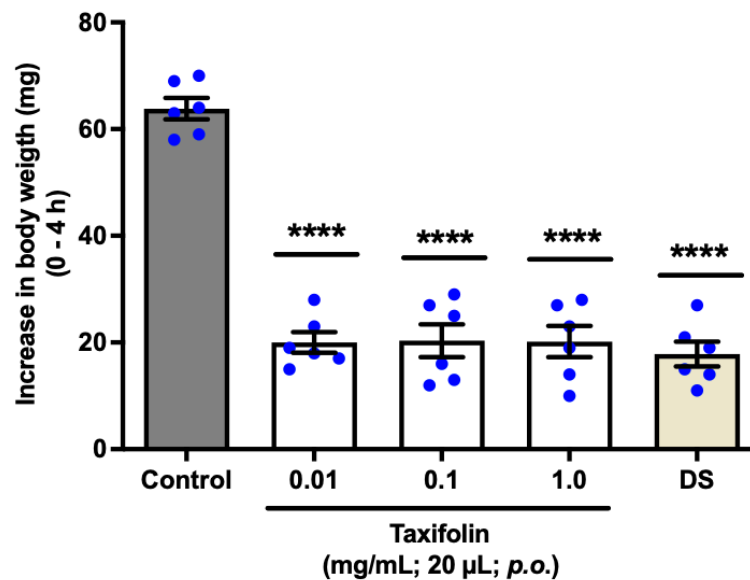


Figura 12. Efeito da taxifolina sob o edema abdominal em ZFa induzido pela carragenina (1,4%; 20 μ L; *i.p.*), analisado individualmente (0-4 h). Controle - veículo (DMSO 3%; 20 μ L; *v.o.*). DS - diclofenaco de sódio (controle anti-inflamatório; 2,5 mg/mL; 20 μ L; *v.o.*). Os valores representam a média \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)

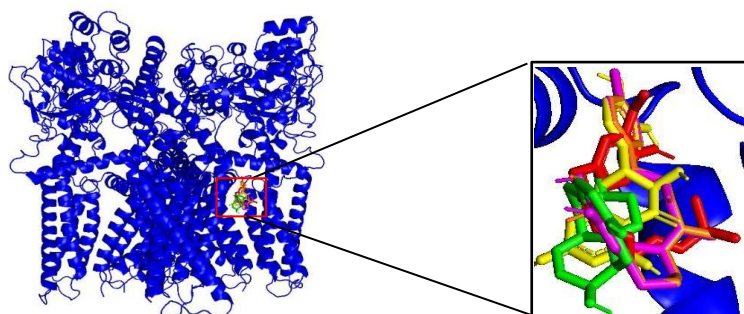


Tabela 2. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes taxifolina, capsaicina, morfina, capsazepina e naloxona com o receptor TRPV1 (PDB ID:8JQR).

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.

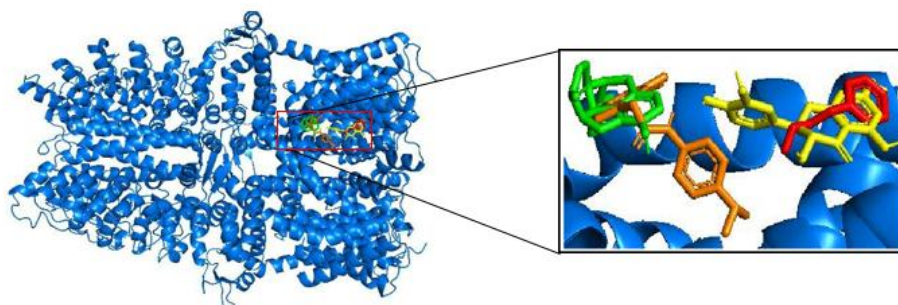


Tabela 3. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes taxifolina, Cinamaldeído, Morfina, e HC-030031 com o receptor TRPA1 (PDB ID: 6X2J).

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.

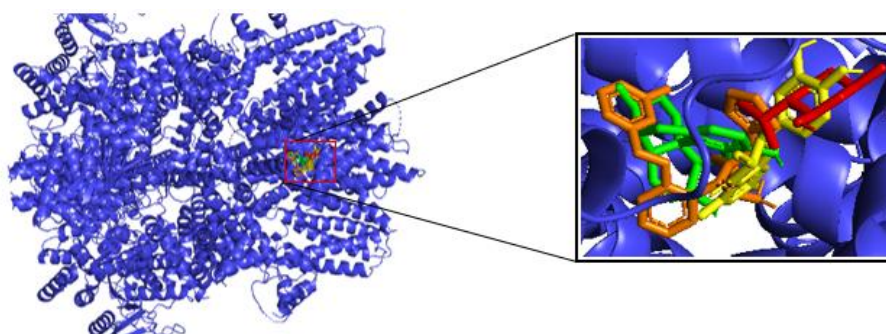


Tabela 4. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes Mentol, Morfina, Taxifolina e Cloridrato de AMTB com o receptor TRPM8 (PDB ID: 8bdc).

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: Coventional 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.

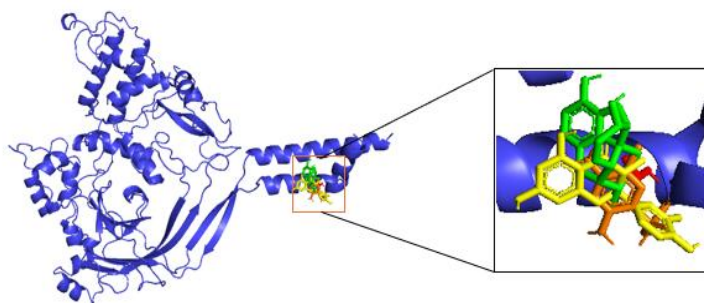


Tabela 5. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes Ácido acético, Morfina, Taxifolina e Amiloride com o receptor ASIC (PDB ID: 4ntx).

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: Conventional 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.

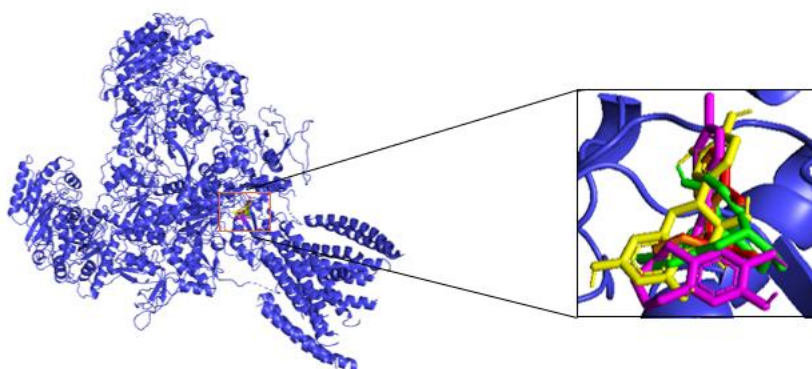


Tabela 6. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes Glutamato, Morfina, Taxifolina, ketamina e Naloxona com o receptor NMDA (PDB ID: 7EOR).

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.

Figura 18. Complexo formado entre o receptor de inflamação (PDB ID: 6COX) e os ligantes taxifolina (Vermelho) e diclofenaco de sódio (Amarelo) no sítio ativo do receptor.

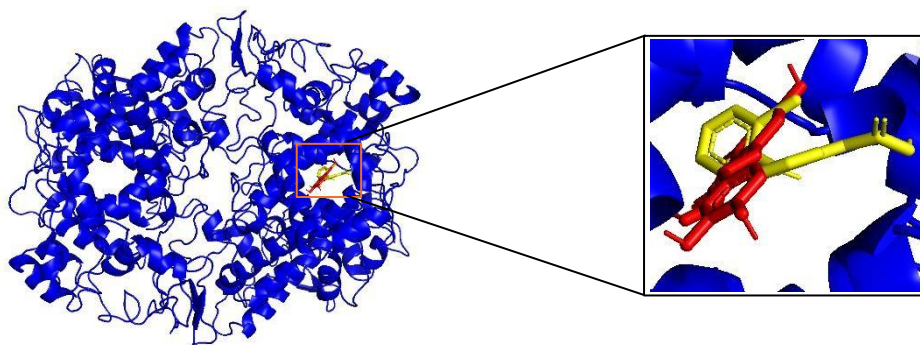


Tabela 7. Interações e afinidade de ligação (ΔG) ligantes Taxifolina e diclofenaco de sódio com o receptor de inflamação (PDB ID: 6COX).

Compostos	ΔG (kcal/mol)	Arg 120	Tyr 355	Tyr 385	Val 523	Gly 526	Ala 527	Ser 530
Taxifolina	-7.5	Pi-ca	Vw	Vw	Pi. Alk	Pi.pi	Pi. Alk	Co.h. B
Diclofenaco de sódio	-8.3	Vw	Vw	Vw	C.h. B	Vw	Pi. Alk	Vw

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

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.

Molecule	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
Diclofenaco de sódio	3	1	0.033	318.13	148.74	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

Moléculas	% Absorbed	VD_{ss}	F_u	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
Diclofenaco de sódio	77.73	-1.41	0.10	Não	Não	-0.83

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
Diclofenaco de sódio	-0.714	0.266	None	none	High	None	2.162	1.602	0.681

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
l_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. Em conjunto, esses achados posicionam a taxifolina como um fitofármaco promissor, capaz de oferecer alternativas seguras e eficazes para o manejo da dor e da inflamação, especialmente em cenários onde os efeitos adversos de opioides e AINEs limitam seu uso. 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., 2017. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish* 4 (5), 422-429.

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.; Oleanolic 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.

ANEXO/ MATERIAL SUPLEMENTAR



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

Vania Marilande Ceccatto
Presidente CEUA-UECE

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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, com estimativa de CL50 superior a 1,0 mg/mL, 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.

CASTAÑEDA-CORRAL, Gabriela; CEDILLO-CORTEZANO, Mayra; AVILES-FLORES, Magdalena; LÓPEZ-CASTILLO, Misael; ACEVEDO-FERNÁNDEZ, Juan José; PETRICEVICH, Vera L. **Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Acetonic Extract from *Bougainvillea x buttiana* (var. Rose).** *Pharmaceuticals* (Basel), v. 17, n. 8, art. 1037, 2024. DOI: 10.3390/ph17081037.

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; ZAGALIOTIS, 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.; PAPADIMITRIOU-TSANTARLIOTOU, Alik; 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; YOGEEESWARI, 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 *Houttuyniae 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 Ernani Alves; BATISTA, Francisco Lucas Alves; LIMA, Luiza Michelly Gonçalves; ABRANTE, Izamar de Araújo; BATISTA, Francisca Leidivânia 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 Wemmenon 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.

MCMANARA, 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.

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.

TADEGE, Getnet; SIRAK, Betelhem; ABEBE, Dehnnet; NUREYE, Dejen. **Antinociceptive and antiinflammatory activities of crude leave extract and solvent fractions of *Commelina***

latifolia Hochst. ex C.B.Clarke (Commelinaceae) leaves in murine model. *Frontiers in Pharmacology*, v. 14, art. 1284087, 2023. DOI: 10.3389/fphar.2023.1284087.

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.