



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
PPGCF

MARCELLY DO NASCIMENTO SOUSA DIAS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ESTERUBINA EM MODELOS
ALTERNATIVOS

TERESINA-PI

2025

MARCELLY DO NASCIMENTO SOUSA DIAS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ESTERUBINA EM MODELOS
ALTERNATIVOS**

Exame de defesa de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Piauí, como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Luciano da Silva
Lopes

TERESINA-PI

2025

MARCELLY DO NASCIMENTO SOUSA DIAS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ESTERUBINA EM MODELOS
ALTERNATIVOS**

Exame de defesa de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Piauí, como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Aprovado em 13/06/2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 LUCIANO DA SILVA LOPES
Data: 04/07/2025 16:30:36-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

Presidente da banca e orientador

Documento assinado digitalmente
 MAURICIO PIRES DE MOURA DO AMARAL
Data: 04/07/2025 15:20:58-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Maurício Pires de Moura do Amaral

Examinador interno

Documento assinado digitalmente
 ADRIANA MARIA VIANA NUNES
Data: 06/07/2025 08:26:02-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Adriana Maria Viana Nunes

Examinador externo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edmilson Miranda de Moura

PRO-REITOR DE PESQUISA E INOVAÇÃO

Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz

PRÓ-REITOR DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Carlos Sait Pereira Andrade

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Arquimedes Cavalcante Cardoso

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui e conseguir chegar à finalização desse trabalho fruto de muita dedicação e esforço. Agradecer ao meu orientador Prof Dr. Luciano da Silva Lopes, por ser sempre muito dedicado e atencioso com seus orientandos, por sua disponibilidade, sempre ajudando, orientando de fato, com dicas e ideias e sempre melhorando o trabalho, além de sua calma e paciência fundamentais para que nós como alunos consigamos ficar mais tranquilos e desenvolver o trabalho. Aos membros da banca, obrigada pela disponibilidade por estarem nesse dia e suas valorosas contribuições e a todos os professores que marcaram minha vida acadêmica obrigada por me incentivarem e contribuir cada um do seu modo a ser a farmacêutica, estudante e profissional que sou hoje.

Agradecer também aos laboratórios, professores parceiros e mestrandos e doutorandos que muito contribuíram e permitiram que esse trabalho fosse construído e ao aluno de IC Antônio Guilherme, que muito ajudou em várias etapas e me ensinou muito, muito obrigada por tudo!

Esse mestrado dedico aos meus pais Maria das Dores do Nascimento Sousa e Célio Antônio Ribeiro de Sousa, que mesmo não concluindo seus estudos, com toda simplicidade e esforço sabiam o valor dos mesmos e muito me incentivaram desde o início da minha jornada escolar a estudar e ter um futuro a partir disso. Ao meu marido Lucas Lindberg, por todo apoio e incentivo que sempre me deu em todas as minhas decisões e jornadas, obrigada por tudo!

DIAS, MARCELLY DO NASCIMENTO SOUSA. **AValiação DA TOXICIDADE DA ESTERUBINA EM MODELOS ALTERNATIVOS.** Defesa (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Teresina - PI, 2025.

RESUMO

As plantas desde muito tempo são utilizadas na medicina popular, substâncias purificadas e isoladas a partir da matéria-prima vegetal, com estrutura química definida e atividade farmacológica, são denominadas fitofármacos e podem ser usados como ativos em medicamentos com propriedade profilática, paliativa ou curativa. Têm-se aumentado o interesse em explorar propriedades bioquímicas dos metabólitos secundários (MS), os flavonoides são exemplos desses metabólitos e possuem inúmeras propriedades como antioxidantes, antiinflamatórias, anticancerígenas, antivirais e analgésicas. Além de serem responsáveis pela ação farmacológica da planta, alguns desses MS, também podem ser tóxicos, assim testes de toxicidade são de extrema importância e nesse contexto o estudo teve objetivo de avaliar a toxicidade da esterubina em modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Para avaliação *in silico* foi utilizada a plataforma ADMETLab 3.0, onde o smile da substância foi adicionado e a partir disso dados físico-químicos e de toxicidade foram coletados. Para avaliação *in vitro* da toxicidade foi realizado o teste de hemólise, onde foram utilizados eritrócitos de *Canis lupus familiaris*, com análise em triplicata as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e quantificada a presença de hemoglobina, na análise *in vitro* da toxicidade pelo método MTT foram utilizadas linhagens celulares L929 (fibroblastos de camundongos) e B16F10 (melanoma murino) e avaliados quanto a viabilidade celular. Para realização dos testes *in vivo* foram utilizadas larvas de *Zophobas morio* a análise foi feita em duplicata com diluição da substância para obtenção das doses de 3, 30 e 300 mg/kg, que são doses já preconizadas para o teste de toxicidade, e foram administradas na hemocele do tenébrio sendo verificadas a melanização e sobrevivência. A previsão de toxicidade pelo ADMETLab 3.0 trouxe resultados promissores, mostrando a molécula de esterubina com valores favoráveis de propriedades como genotoxicidade, mutagenicidade no teste AMES, irritação ocular, e valores com toxicidade média que não impedem seu uso, mas merecem atenção especial como carcinogenicidade. No teste de hemólise os resultados foram positivos apresentando porcentagem menor que 10%. Na avaliação de citotoxicidade pelo método MTT, a molécula teve eficácia em reduzir a viabilidade quando comparadas ao controle negativo assim como também o valor de IC₅₀ de 15,07 µg/mL (12,55 a 18,10 µg/mL) em células B16F10, mostrando também um bom potencial em reduzir a viabilidade nessa linhagem celular. No teste *in vivo* com larvas de *Zophobas morio* apresentou boa taxa de sobrevivência em doses maiores de 30 e 300 mg/kg, demonstrando segurança. Com base nos resultados a esterubina se mostra uma molécula promissora com bom perfil de segurança demonstrado nos testes *in silico*, *in vitro* e *in vivo* se mostrando segura para futuros testes *in vivo* que possam vir a serem realizados para evidenciar suas possíveis atividades farmacológicas.

Palavras chaves: Esterubina; Toxicidade; *In silico*; *Zophobas morio*; Métodos Alternativos.

DIAS, MARCELLY DO NASCIMENTO SOUSA. **EVALUATION OF STERUBIN TOXICITY IN ALTERNATIVE MODELS.** Defense (Master's in Pharmaceutical Sciences), Federal University of Piauí, Center for Health Sciences, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Teresina - PI, 2025.

ABSTRACT

Plants have long been used in folk medicine. Purified substances isolated from plant raw materials, with a defined chemical structure and pharmacological activity, are called phytopharmaceuticals and can be used as active ingredients in medicines with prophylactic, palliative or curative properties. There has been increasing interest in exploring the biochemical properties of secondary metabolites (SM). Flavonoids are examples of these metabolites and have numerous properties such as antioxidants, anti-inflammatory, anticancer, antiviral and analgesics. In addition to being responsible for the pharmacological action of the plant, some of these SM can also be toxic, so toxicity tests are extremely important and in this context the study aimed to evaluate the toxicity of sterubin in *in silico*, *in vitro* and *in vivo* models. For *in silico* evaluation, the ADMETLab 3.0 platform was used, where the substance's smile was added and from this, physicochemical and toxicity data were collected. For *in vitro* toxicity evaluation, the hemolysis test was performed, where *Canis lupus familiaris* erythrocytes were used, with analysis in triplicate. The samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and the presence of hemoglobin was quantified. In the *in vitro* toxicity analysis by the MTT method, L929 (mouse fibroblasts) and B16F10 (murine melanoma) cell lines were used and evaluated for cell viability. To perform the *in vivo* tests, *Zophobas morio* larvae were used. The analysis was performed in duplicate with dilution of the substance to obtain doses of 3, 30 and 300 mg/kg, which are doses already recommended for the toxicity test, and were administered in the hemocoel of the tenebrio, verifying melanization and survival. The toxicity prediction by ADMETLab 3.0 brought promising results, showing the sterubin molecule with favorable values of properties such as genotoxicity, mutagenicity in the AMES test, eye irritation, and values with medium toxicity that do not prevent its use, but deserve special attention as carcinogenicity. In the hemolysis test, the results were positive, with a percentage lower than 10%. In the cytotoxicity evaluation by the MTT method, the molecule was effective in reducing viability when compared to the negative control, as well as the IC₅₀ value of 15.07 µg/mL (12.55 to 18.10 µg/mL) in B16F10 cells, also showing good potential in reducing viability in this cell line. In the *in vivo* test with *Zophobas morio* larvae, it showed a good survival rate at doses higher than 30 and 300 mg/kg, demonstrating safety. Based on the results, sterubin is a promising molecule with a good safety profile demonstrated in *in silico*, *in vitro* and *in vivo* tests, proving safe for future *in vivo* tests that may be performed to demonstrate its possible pharmacological activities.

Keywords: Sterubin; Toxicity; *In silico*; *Zophobas morio*; Alternative Methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química básica dos flavonoides	18
Figura 2 - Fórmula estrutural da esterubina.....	23
Figura 3 - Preparo das concentrações de esterubina para incubação e posterior leitura em espectrofotômetro para avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> através de teste de hemólise	37
Figura 4 - Preparo da solução de esterubina para obtenção das diferentes doses utilizadas para avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> em larvas de <i>Zophobas morio</i>	39
Figura 5 - Gráfico radar obtido através do ADMETlab 3.0 que evidencia propriedades físico químicas da esterubina e os limites de cada propriedade.....	40
Figura 6 - Corte do gráfico radar com foco em logS	41
Figura 7 - Visualização das amostras da solução de eritrócitos e esterubina após centrifugação no teste de hemólise <i>in vitro</i>	55
Figura 8 - Verificação da toxicidade da esterubina no teste <i>in vitro</i> de hemólise em eritrócitos de mamíferos <i>Canis lupus familiaris</i>	56
Figura 9 - Efeitos da citotoxicidade de Esterubina sobre as linhagens celulares B16F10 e L929. *p <0,05 comparado ao controle negativo.....	58
Figura 10 - Registro fotográfico de larvas de <i>Zophobas morio</i> para verificação de melanização.....	60
Figura 11 -. Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> da esterubina através do teor de melanina em larvas de <i>Zophobas morio</i>	61
Figura 12 - Percentual de sobrevivência de larvas de <i>Zophobas morio</i> expostas a diferentes doses de esterubina através de teste de toxicidade <i>in vivo</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Interpretação das faixas de valores apresentadas pelo ADMETlab 3.0 para propriedades de toxicidade.....	34
Tabela 2. Significado das cores apresentadas nos resultados da avaliação de toxicidade pelo programa ADMETlab 3.0.....	36
Tabela 3 - Análise da Toxicidade <i>in silico</i> da esterubina através do programa computacional ADMETlab 3.0.....	44
Tabela 4 - Mecanismo molecular de efeitos tóxicos da esterubina em interação com receptores através da avaliação <i>in silico</i> pelo programa computacional ADMETlab 3.0.....	51

ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
AC	Aberrações cromossômicas
AchE	Acetilcolinesterase
ATF4	Fator de transcrição ativador 4
AR	Receptor de androgênio
CAT	Catalase
CEUA	Comissões de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal
DA	Dopamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
fChar	Carga formal
GSH	Glutathiona reduzida
Hex: AcOEt	Hexano: Acetato de etila
IG	Índice germinativo índice mitótico
IM	Índice mitótico
IL-6	Interleucina 6
IL1β	Interleucina 1 β
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LogD	Coeficiente de distribuição
LogS	Logaritmo de solubilidade
LogP	Coeficiente de partição
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
LTA	Ácido lipoteicóico
MaxRing	Número de átomos no maior anel
MDA	Malondialdeído
MeOH	Metanol

MN	Micronúcleo
MN	Mostarda de nitrogênio
MS	Metabólitos secundários
MW	Peso molecular
NDA	Número de doadores de ligação de hidrogênio
NHA	Números de aceitadores de ligação de hidrogênio
NHet	Número de heteroátomos
NE	Norepinefrina
NO	Óxido nítrico
NP-PEG	NP/Polietilenoglicol
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
NR-Aromatase	Receptor Aromatase
NR- ER	Receptores de estrogênio
nRing	Número de anéis
NR-AhR	Receptor aril- hidrocarboneto
NRot	Número de ligações rotativas
nRig	Número de ligações rígidas
QSAR	Estrutura-atividade quantitativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAR	Relação estrutura-atividade
SOD	Enzima superóxido desmutase
SR-ARE	Elemento de resposta antioxidante
TPSA	Área Superficial Polar Total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Plantas medicinais	15
2.2 Flavonoides	17
2.3 Família Boraginaceae	20
2.4 Gênero <i>Eriodictyon</i> e espécie <i>Eriodictyon californicum</i>	21
2.4.1 Esterubina	21
2.5 Ensaio de Toxicidade	23
2.5.1 Modelos <i>in silico</i> para avaliação de toxicidade	24
2.5.2 Modelos de toxicidade <i>in vitro</i>	25
2.5.3 Testes de toxicidade <i>in vivo</i>	29
2.5.3.1 Teste de toxicidade com larvas de <i>Zophobas morio</i>	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Material vegetal	33
4.2 Drogas e reagentes	33
4.3 Avaliação <i>in silico</i> dos parâmetros físico-químicos e toxicidade através do programa computacional ADMETlab 3.0	33
4.4 Avaliação <i>in vitro</i> da esterubina	36
4.4.1 Teste de Hemólise	36
4.4.2 Teste de citotoxicidade pelo método MTT	38
4.5 Avaliação <i>in vivo</i> da esterubina	38
4.5.1 Teste de toxicidade <i>in vivo</i> com larvas de <i>Zophobas morio</i> - Tenebrio Gigante	38
4.6 Análise estatística	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Análise <i>in silico</i> de parâmetros físico-químicos pelo programa ADMETlab 3.0	40
5.2 Análise da toxicidade <i>in silico</i> pelo programa ADMETlab 3.0	44
5.3 Efeitos da esterubina no teste <i>in vitro</i> de hemólise	55

5.4 Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT.....	57
5.5 Teste de toxicidade <i>in vivo</i> com larvas de <i>Zophobas morio</i> , <i>Tenebrio Gigante</i>	59
6 CONCLUSÃO	64
REFERENCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As plantas desde muito tempo são utilizadas na medicina popular, como fonte de alimentos e medicamento para tratar várias doenças. Seus compostos bioativos são atualmente bastante pesquisados para se descobrir e desenvolver, novos produtos farmacêuticos (Bozac et al., 2024). A biodiversidade do país e também a rica e vasta composição de muitas plantas, fazem com que elas possam ter diversas propriedades diferentes e mereçam uma atenção especial em se saber qual composto está desempenhando uma ação específica de interesse (Caccia-Bava et al., 2017).

Substâncias purificadas e isoladas a partir da matéria-prima vegetal, com estrutura química definida e atividade farmacológica, são denominadas fitofármacos e podem ser usados como ativos em medicamentos com propriedade profilática, paliativa ou curativa (BRASIL, 2011). Muitas substâncias isoladas são consideradas metabólitos secundários (MS), e têm-se aumentado interesse em explorá-los. Como exemplo destes metabólitos estão uma grande variedade de compostos orgânicos como terpenóides, flavonoides, alcaloides e ácidos orgânicos que são importantes no desenvolvimento da planta, na sustentação das mesmas e consequentemente no papel terapêutico que esses compostos são capazes de desempenhar (Li et al., 2023).

Os flavonoides são exemplos de MS e possuem inúmeras propriedades como antioxidantes, antiinflamatórias, (Moraes et al., 2022) anticancerígenas, antivirais, analgésicas, antimicrobianas e também atividade neuroprotetora (Dias; Pinto; Silva, 2021). Alguns estudos mostram que uma dieta rica em flavonoides pode prevenir algumas doenças (Janabi et al., 2020). Frutas cítricas, chás, azeite de oliva, leguminosas e alguns vegetais estão entre as principais fontes (Panche; Diwan; Chadra, 2016). Sua absorção e biodisponibilidade vão diferir conforme estrutura, peso molecular e para melhor atividade farmacêutica, essa biodisponibilidade pode ser melhorada com diferentes técnicas como por exemplo formulação de nanopartículas que cada vez mais vem ganhando espaço na formulação de novos fármacos (Al-Khayri et al., 2022).

Entretanto, a utilização das plantas e dos compostos naturais no desenvolvimento de novos medicamentos encontram diversos desafios, principalmente no que diz respeito a escassez de recursos. Apesar da extensa biodiversidade, o conhecimento acerca de cada planta e do composto que desempenha a atividade biológica necessita de muito investimento e estudos envolvidos para explorar principalmente o mecanismo de ação, e também para que se possa isolar um composto presente em um extrato, por exemplo. Além dos desafios relacionados ao cultivo que podem impactar diretamente na composição da planta (Li et al., 2023).

Além de serem responsáveis pela ação farmacológica da planta, alguns desses metabólitos secundários também podem ser tóxicos, e a toxicidade de uma planta medicinal pode depender de diversos fatores, como quantidade consumida, diferentes partes da planta, tempo de exposição e diferenças genéticas entre uma mesma espécie (Dhiany et al., 2021). Assim, os testes de toxicidade são de extrema importância para que se possa conhecer melhor aquele composto que se pretende trabalhar, estes podem ser *in vitro* e *in vivo*, e podem avaliar se a substância possui toxicidade aguda, subcrônica ou crônica, ou se podem ser propostas algumas modificações de modo que diminua essa toxicidade (Mounanga; Mewono; Angone, 2015).

A esterubina é um flavonóide obtido da *Eriodictyon californicum* (erva santa), pertencente à família Boraginaceae, é um composto com boa penetrabilidade em tecidos e um potente candidato a ação neuroprotetora, mas sobre sua toxicidade as informações são escassas e necessita de mais estudos e evidências para que se possa conhecer as especificidades desse composto e para que o mesmo possa ser utilizado com mais segurança em possíveis estudos que mostrem seu potencial para alguma atividade ou doença em modelos *in vivo* (Kazmi et al., 2023).

Diante da escassez de informações sobre sua toxicidade e da importância desse tipo de estudo para se conhecer e prever possíveis efeitos tóxicos do composto, a esterubina foi utilizada no presente trabalho para estudos em toxicidade em modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

O Brasil apresenta uma rica biodiversidade principalmente na região amazônica, porém grande parte das propriedades terapêuticas ainda são desconhecidas (Vargas et al., 2016). O crescente uso da fitoterapia tem acontecido em virtude do fator econômico e também dos frequentes efeitos colaterais relacionados ao uso de medicamentos sintéticos, que por muitas vezes pode acarretar na não adesão a farmacoterapia ou até mesmo abandono da mesma. No entanto, mesmo sendo naturais e apresentando menos efeitos adversos devem ser usados com cautela, uma vez que também pode apresentar intoxicação ou até mesmo interações com outros medicamentos que podem estar em uso (Caboclo et al., 2022).

Diferentes compostos fazem parte das plantas medicinais e estes ativam diferentes receptores e fazem isso por meio de diferentes mecanismos de ação. O uso dessas plantas se dá no tratamento e também prevenção e não se limita somente a países em desenvolvimento ou de classe socioeconômica mais baixa, os medicamentos fitoterápicos que são desenvolvidos a partir das plantas e seus compostos se tornou uma grande indústria abrangendo inclusive países extremamente desenvolvidos (Nyakudya et al., 2020).

As plantas desempenham papel fundamental na medicina tradicional e moderna e são fontes ricas de compostos que desempenham importante papel farmacológico. Esses compostos com propriedades terapêuticas e de cura variam conforme espécie, local de cultivo, mudanças climáticas e ambientes específicos e muitas vezes extremos como montanhas, desertos e florestas tropicais podem fazer com que a planta desenvolva propriedades únicas que podem inclusive alterar composição e provocar algumas mudanças como diminuição de acúmulo de biomassa, mas pode também aumentar o acúmulo de metabólitos secundários (Zhu et al., 2024).

Os diversos constituintes fitoquímicos são provenientes do metabolismo secundário das plantas e estão relacionados com sistema de defesa contra agressões de insetos e patógenos e radiações ultravioletas, estes, vão ter função fisiológica de proteção contra radicais livres e conseguem proteger o organismo contra estresse oxidativo, reduzindo risco de

desenvolvimento de várias doenças por meio de sua atividade antioxidante e antiinflamatória (Oliveira et al., 2018).

Os metabolitos secundários são altamente específicos e pertencem a três classe principais de moléculas, terpenos, nitrogenados e compostos fenólicos. Os terpenos servem de base para muitas estruturas com diversas funções no metabolismo e variam desde moléculas pequenas e voláteis a hormônios, os óleos essenciais estão dentro dessa classe e são compostos por uma mistura complexa de monoterpenos e sesquiterpenos apresentando um amplo espectro de atividade, os compostos fenólicos incluem cerca de 10000 compostos e como apresentam grande diversidade química podem desempenhar diversas funções, dessa classe participam, taninos, flavonoides e lignina e no grupo dos compostos nitrogenados incluem os alcaloides, glicosídeos cianogênicos e aminoácidos não proteicos, são compostos importantes podendo repelir insetos e animais, mas principalmente os alcaloides tem aplicação principal em medicamentos (Borges; Amorim, 2020).

Dentro dessas classes de metabólitos diversas substâncias foram descobertas ao longo do tempo e suas propriedades as tornaram importantes, pois possibilitaram desenvolvimento de novos medicamentos e/ou seu uso de diversas formas em diferentes tipos de situações e patologias. Um exemplo é a Azadiractina, terpenoide encontrado na planta neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) que tem demonstrado várias atividades biológicas altamente eficientes no controle de pragas, como inibir o crescimento, interferir na fecundidade do inseto e assim ressalta o uso de formulações contendo o neem em diversos ensaios experimentais o controle de ecto e endoparasitas (Fonseca et al., 2019).

A morfina é outro exemplo, é um alcaloide e um dos medicamentos mais antigos e conhecidos isolado a partir da resina da papoula *Papaver somniferum*. Apesar de antiga, continua sendo uma das drogas mais utilizadas para controle de dores severas, padrão para redução de dor antes e pós cirurgia e sua descoberta impulsionou a pesquisa, onde nos anos seguintes novos alcaloides também foram descobertos e isolados como a cafeína, nicotina, escopolamina (Brook; Bennett; Desai, 2017).

A curcumina é um polifenol hoje bastante difundido, e com diversas propriedades, é encontrada na raiz da cúrcuma ou açafrão da terra (*Curcuma longa*) e hoje vários suplementos alimentares estão disponíveis no mercado a base dessa planta devido ao seu potencial terapêutico como antioxidante, antiinflamatória, propriedades digestivas, cicatrização de feridas e artrite apoiado em vários ensaios *in vitro* e *in vivo*. Além disso, ela consegue modular vários alvos biológicos, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios, citocinas, proteínas e vias celulares e podem agir modulando o crescimento de tumor por meio da regulação de várias vias de sinalização (Kotha; Luthria, 2019).

O resveratrol é outro exemplo de composto fenólico hoje amplamente difundido e comercializado. Foi isolado de *Veratrum grandiflorum* e está presente em uvas, vinho, amendoim e frutas vermelhas. É muito conhecido por suas propriedades antioxidantes sendo eliminador de espécies reativas de oxigênio (ROS) e seus efeitos anticâncer e antienvhecimento (Breuss; Atanasov; Uhrin, 2019).

2.2 Flavonoides

Os flavonoides são MSs sintetizados pelas plantas, são encontrados em diversas espécies e atuam principalmente com função de defesa contra patógenos, predadores e fatores externos. São encontrados principalmente na forma glicosídica e sua estrutura química conta com 15 átomos de carbono arranjados em dois anéis fenólicos (A e B) e um anel de pirona (C) e suas diferentes classes se dá por meio da substituição desse anel de pirona podendo ser classificados como isoflavonoide, flavona, biflavonoide, flavan-3-ol, flavan-4-ol, hidroflavonois e antocianinas (Martinez; Campos, 2022).

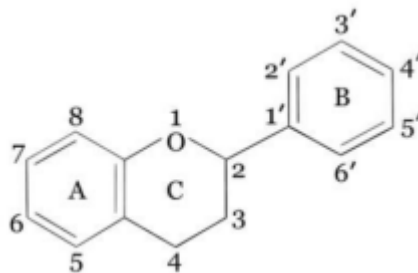


Figura 1. Estrutura química básica dos flavonoides

Fonte: Moraes et al, 2022.

Estes metabólitos secundários são substâncias complexas e estão diversificados em diferentes partes da planta, ou seja, em uma mesma planta pode ter quantidades diferentes desses metabólitos no caule, nas raízes ou folhas por exemplo. Dessa maneira, fatores externos também podem influenciar diretamente no crescimento e inibição da planta e nas vias dos MSs e sua regulação já que os genes envolvidos nessas vias são alterados por diferentes situações de estresse e susceptíveis a variações ambientais, podendo afetar qualitativamente e quantitativamente MS das plantas e otimizar esses fatores podem influenciar diretamente no seu controle de qualidade (Li et al., 2020).

Seu potencial terapêutico é diverso, apresentando diferentes atividades biológicas como antiviral (Badshah et al., 2021), antibacteriana (Shamsudin et al., 2022), antifúngica (Al Aboody e Mickymaray, 2020), antiinflamatória, antioxidante, e essa última vem sendo bastante estudada e evidenciada pois pode apresentar um grande potencial para desenvolvimento de futuros fármacos para doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson, e outras como câncer e doenças cardiovasculares (Moraes et al., 2022), além disso ingestão diária desses metabólitos através de dieta alimentar implica diretamente em benefícios à saúde podendo impactar diretamente em benefícios ao sistema imunológico (Martinez e Campos, 2022).

Dentre as ações dos flavonoides, uma bastante estudada é sua atividade anticâncer, pois podem agir inibindo o crescimento celular, como exemplos a hesperidina, aurona e a quercetina que é amplamente presente em chás, frutas vermelhas e grãos e tem sido usada para câncer colorretal, agindo induzindo apoptose, regulando vias de sinalização, fazendo replicação

antioxidante e inibindo metástase, que para o tratamento de câncer é importante para reduzir tamanho de tumores ou impedir seu crescimento, as isoflavonas de soja também são eficazes contra câncer de próstata e reduz risco de câncer de pulmão, estando presente em alimentos como maçã e cebola (Ullah et al., 2020).

Alguns flavonoides também podem ser usados como medicamentos alternativos para prevenir e tratar osteoporose. Nesse processo várias células, hormônios, citocinas e vias de sinalização podem estar envolvidas na remodelação óssea, os osteoblastos e osteoclastos estão envolvidos respectivamente na nova formação óssea e na reabsorção. Estudos mostram que a quercetina tem efeitos farmacológicos positivos no metabolismo ósseo, como por exemplo prevenção da perda óssea e efeito osteogênico, e a naringina pode promover formação dos osteoblastos por meio de ativação de genes osteogênicos e assim os flavonoides ganham ainda mais espaço nas pesquisas e aplicações clínicas no que diz respeito a tecido ósseo (Cao et al., 2022).

Outra ação dos flavonoides está relacionada com seu efeito antidepressivo, a exemplo, uma fração flavonoide obtida de extrato do *Hypericum perforatum* (erva de são joão) mostrou efeito antidepressivo, sendo essa planta considerada uma alternativa eficaz aos antidepressivos sintéticos aumentando os níveis de serotonina (5-HT), noradrenalina (NE) e dopamina (DA) (Guan; Liu, 2016), em outro estudo feito por Zheng e colaboradores (2012), foi explorado o efeito antidepressivo e mecanismo dos flavonoides extraídos de folhas de *Apocymum venetum* que mostrou atividade antidepressiva no teste de suspensão de cauda e no teste de nado forçado, provavelmente devido ao aumento de NE e DA.

Atuam ainda promovendo tratamento de lesões cutâneas, nesse processo, ocorre aceleração da taxa de contração de feridas, promoção de vasculogênese, modulação de citocinas inflamatórias, aumento da taxa de epitelização e auxilia principalmente nas doenças crônicas que as causam, como diabetes mellitus. Nesse caso os flavonoides agem diminuindo mediadores inflamatórios e aumentando os antiinflamatórios, inibindo vias de cicloxigenase e lipoxigenase e podem ainda promover a formação de um novo epitélio

aumentando migração de queratinócitos e suas respectivas fixações epiteliais para a ferida (Carvalho et al., 2021).

2.3 Família Boraginaceae

Os representantes da família Boraginaceae distribuem-se principalmente nas regiões tropicais, temperadas e áridas com alguns centros de dispersão localizados em regiões mediterrâneas e nos Estados Unidos, possuindo cerca de 134 gêneros e 2650 espécies. No Brasil, são 9 gêneros e cerca de 125 espécies, sendo o *Cordia*, *Varronia* e *Tournefortia*, os mais numerosos (Vieira et al., 2013).

Geograficamente a ampla distribuição de plantas dessa família, mostra sua adaptabilidade a vários ecossistemas e climas e consiste em ervas, arbustos e raramente árvores, algumas espécies tem sido utilizadas há muito tempo como corante alimentar e até mesmo têxtil, além de apresentar um amplo uso na esfera medicinal, principalmente relacionado aos pigmentos naftoquinonas. Dentro da família Boraginaceae, algumas espécies, porém, são consideradas tóxicas e podem causar doenças graves ao serem consumidas. Essa toxicidade pode estar relacionada à presença de alcaloides pirrolizidínicos que podem ser mutagênicos, cancerígenos e hepatotóxicos (Gautam; Lapcik; Lapicková, 2024).

O efeito terapêutico das plantas relacionadas a essa família, está relacionado a muitos compostos biologicamente ativos como naftoquinonas, terpenoides, flavonoides e fenóis e seus constituintes isolados podem ter atividade como antiinflamatória, antiviral, antitumoral, antimicrobiana, contraceptiva, cardiotônica e antiplaquetária e algumas plantas dessa família têm sido relatadas como boas fontes de ácidos graxos, ácido γ -linolênico e ácido estearidônico como *Borago officinalis* L. ou *Echium vulgare* L (Tavarati; Masoudian; Gholamian, 2014). Apesar da variedade de propriedades, em algumas plantas o uso farmacológico ainda não foi evidenciado trazendo uma necessidade de um maior reconhecimento fitoquímico das espécies, para que consequentemente, se possa oferecer mais informações sobre compostos bioativos naturais que possam ser isolados dessas diferentes espécies (Dresler; Szymczak; Wójcik, 2017).

2.4 Gênero *Eriodictyon* e espécie *Eriodictyon californicum*

O gênero *Eriodictyon* compreende várias espécies popularmente conhecida com “yerba santa” que vem do espanhol e significa erva sagrada ou erva santa. Esse gênero está dentro da família Boraginaceae e as três espécies mais abundantes e comumente usadas são *E. californicum*, *E. angustifolium* e *E. trichocalyx*, seu uso vem desde os povos indígenas e eram utilizadas para tratar várias enfermidades como febre, tosse, asma e problemas digestivos. Produtos feitos com erva santa também são usados em aplicações alimentícias e farmacêuticas como modificadores de sabor, seu sabor é descrito como amargo e doce com notas de menta e eucalipto (Wang et al., 2023).

O *E. californicum* é uma planta nativa da Califórnia e era usada por tribos indígenas para tratar diversas doenças como asma, tosse, infecções pulmonares e reumatismo, como componentes, a esterubina é tido como um importante ativo, mas também foram encontradas concentrações de eriodictiol e homoeriodictiol (Maher et al., 2020), por possuir componentes neuroprotetores a planta tem um potencial para tratamento de doença de Alzheimer (Fisher et al., 2019).

Os flavonoides presentes na espécie são encontrados principalmente nas folhas e são conhecidos por possuírem atividade antiinflamatória e antimicrobiana sendo utilizados como ingredientes em alimentos e produtos farmacêuticos. A esterubina, presente no extrato de *E. californicum*, tem uma atividade *in vitro* maior que o eriodictiol e o homoeriodictiol e esta possui evidências de atividade contra estresse oxidativo e neuroinflamação (Hofmann et al., 2020).

2.4.1 Esterubina

A esterubina é um flavonoide considerado o composto mais ativo presente na *Eriodictyon californicum*, mostrando uma atividade *in vitro* maior que os outros compostos também presentes nessa espécie e demonstrando importante atividade neuroprotetora e antiinflamatória (Fischer, et al., 2019).

Em estudo feito por Hofmann e colaboradores (2020), a esterubina mostra uma atividade maior contra estresse oxidativo e neuroinflamação do que vários outros flavonoides, além de mostrar ter potencial significativo como

neuroprotetor modificador da doença de Alzheimer (DA), já que levou a melhora de memória em testes comportamentais feitos em modelo murino.

É considerada protetora contra múltiplos indutores de morte celular, induz fortemente o fator de transcrição antioxidante Nrf2 (fator nuclear eritróide 2) e também tem atividade anti-inflamatória (Fisher et al, 2019). Em testes feitos com indutores de resposta inflamatória, a esterubina foi eficaz contra a produção induzida de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) de óxido nítrico (NO) e citocinas e também contra a produção NO e citocinas induzidas por ácido lipoteicoico (LTA). (Liang; Maher, 2022). Estudos epidemiológicos têm mostrado que pessoas com maior consumo de flavonoides tem risco reduzido de demência, podendo retardar o declínio cognitivo e mostrando potencial de melhorar a patologia da DA (Buraco; Williams, 2021).

Estudos feitos com esterubina e flavonoides relacionados com envelhecimento capilar investigaram sua capacidade de estimular melanogênese, nos testes, a esterubina suprimiu a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e os dados mostraram que ela possui componentes ativos que podem prevenir o envelhecimento de cabelo protegendo os queratinócitos foliculares (Tagushi et al., 2018; Walker et al., 2016).

Apesar de estudos mostrarem algumas propriedades da esterubina, outros relacionados a sua toxicidade são escassos. Saber sobre toxicidade de um composto é muito importante, pois alguns metabólitos secundários podem ser tóxicos e levar a distúrbios no organismo, além do que esclarecer aspectos relacionados a toxicidade favorece na descoberta de novos fármacos e ajuda a entender melhor como o composto pode agir frente a diferentes parâmetros, auxiliando por exemplo na escolha de melhores doses que poderão ser utilizadas em testes *in vivo* (Campos et al., 2016).

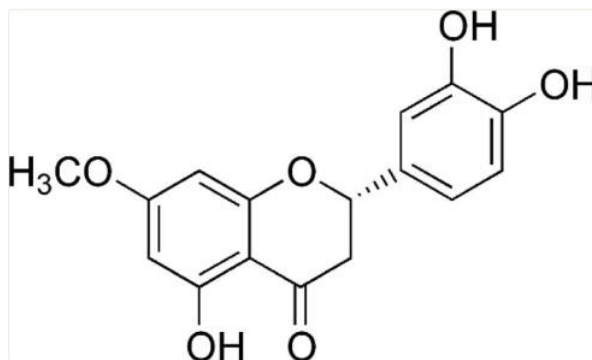


Figura 2. Fórmula estrutural esterubina

Fonte: Kazmi et al., 2023.

2.5 Ensaio de Toxicidade

Os ensaios de toxicidade são testes realizados com o objetivo de avaliar o efeito de alguma substância no organismo, avaliando a probabilidade da ocorrência dos efeitos adversos devido a exposição a determinada substância, e em quais condições esta pode causar danos, como o tempo de exposição, quantidade do ativo, interação com o meio ou outras substâncias, entre outros. Os testes toxicológicos podem ser de vários tipos como toxicidade aguda, sub aguda, sub crônica, crônica, imunotoxicidade, reprodução, genotoxicidade e carcinogenicidade (Moura et al., 2012).

Dentre esses tipos de toxicidade, o estudo de toxicidade aguda é usado para avaliar a toxicidade de uma substância teste em uma ou mais doses durante um período de 24 horas, assim nesse tipo de teste é possível ver risco de intoxicações agudas o que é importante para avaliação da segurança dessa substância em curto período de tempo e dá suporte para escolha das demais doses nos testes de toxicidade seguintes (Silva et al, 2021). Já os testes de toxicidade crônica e subcrônica verifica o efeito tóxico depois de uma exposição prolongada, a doses cumulativas geralmente um período acima de 3 meses e avaliam parâmetros subletais como crescimento, reprodução e deformidades e caracteriza o efeito dose-resposta (Moura et al., 2012).

Métodos alternativos de testes de toxicidade, tem crescido nos últimos anos, principalmente por conta de leis e regulamentações que apoiam meios para reduzir, refinar e substituir o uso de animais (3Rs) (Ogasawara, 2019). A exemplo testes de toxicidade utilizando peixes em estágios iniciais para

avaliação de toxicidade aguda e crônica de produtos químicos, os peixes são expostos a várias concentrações do composto a ser analisado e os efeitos letais e subletais são medidos ao longo do tempo (Allen et al., 2024).

Há ainda a toxicologia computacional, essa área abrange teoria e aplicações de abordagens *in silico* para prever, modelar e explicar mecanismos toxicológicos a nível molecular. O amplo interesse em promover cuidado e bem estar dos animais utilizados em testes de toxicidade, assim como reduzir cada vez mais seu uso, trouxe o desenvolvimento dessas novas abordagens e metodologias desse tipo de teste e que apresenta vantagens em comparação com testes *in vivo* e *in vitro* como custo-efetividade e rápida disponibilidade de resultados. Além disso essas estratégias computacionais permitem rápida determinação de propriedades físico químicas importantes na otimização de possíveis candidatos a fármacos o que ajuda a reduzir toxicidade fora do alvo e diminui consequentemente o número de animais utilizados nos testes (Ford, 2016).

2.5.1 Modelos *in silico* para avaliação de toxicidade

Com o objetivo de prever toxicidade em modelos computacionais a abordagem *in silico* está em crescente utilização. O termo “*in silico*” se refere a simulação computacional, nesse modelo o princípio é que compostos com estruturas similares devem se comportar de maneira similar, e a indisponibilidade de dados de uma substância nova, ou de determinada substância e a restrição cada vez maior sobre o uso dos animais, faz com que essa abordagem seja bastante procurada (Alves; Streit; Pizzolato, 2023).

Os softwares que são utilizados para simulações físico químicas, baseiam-se em algoritmos que podem calcular descritores moleculares e trazem informações estruturais disponíveis sobre a molécula em estudo tanto sobre propriedades físico químicas como informações mais complexas, auxiliando assim nas interações entre molécula e organismos vivos por meio da correlação entre a propriedade da estrutura química e do composto e medidas de toxicidade para uma área específica por exemplo (Alves; Streit; Pizzolato, 2023). É uma ferramenta rápida, mais econômica, não utiliza animais e a relação estrutura-

atividade (SAR) e estrutura-atividade quantitativa (QSAR) é uma alternativa eficiente para investigar toxicidade de compostos químicos (Rim, 2020).

As abordagens *in silico* podem prever toxicidade, mecanismos de ação, interação com receptores, atividade farmacológica e além disso podem ser úteis para mostrar em que parâmetros essa substância pode ter mais “defeitos” e guiar possíveis modificações que a melhorem. Esse tipo de abordagem permite ainda estudar populações altamente específicas e assim reduz população necessária para ensaios clínicos e dá um direcionamento adequado de qual população selecionar, quantidade, e reduz tempo e custos de ensaio (Costa, 2022).

Os modelos computacionais permitem prever quantitativamente e qualitativamente a toxicidade química de compostos, misturas, nanoformulações e isso antes que um composto novo fosse sintetizado por exemplo (Rim, 2020). Além disso características farmacocinéticas e farmacodinâmicas são essenciais para avaliar candidatos a novas drogas e algumas ferramentas *in silico* permitem ver esses parâmetros de absorção, metabolismo, distribuição e excreção (ADME). O SwissADME é um exemplo de programa que permite calcular esses descritores físico químicos (Pereira et al., 2023).

Para predição de toxicidade o uso de modelos computacionais é muito mais barato e rápido, permitindo ainda analisar um grande número de substâncias em um curto espaço de tempo. Vários modelos foram desenvolvidos nas últimas décadas e podem evidenciar diferentes *endpoints* toxicológicos como, hepatotoxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade, toxicidade respiratória, irritação e corrosão ocular. Geralmente, essas ferramentas *in silico* utilizam de abordagem de leitura cruzada supondo que substâncias com estruturas semelhantes, compartilhem de propriedades físico químicas e de toxicidade semelhantes e isso permite prever algumas propriedades que podem ser úteis em futuros testes da substância (Gluck et al., 2018).

2.5.2 Modelos de toxicidade *in vitro*

Os modelos de toxicidade *in vitro* são métodos que visam reduzir ou não utilizar animais na experimentação. Esses testes reforçam o programa 3R's que significa as iniciais das três finalidades, em inglês, que são redução

(Reduction), refinamento (Refinement) e substituição (Replacement), esse programa consiste em reduzir ao máximo a utilização dos animais substituindo por métodos de testes alternativos estes utilizam microorganismos como bactérias, fungos, algas, crustáceos, enzimas, proteínas, cultivos de tecidos ou celulares, e que podem servir de prévia aos estudos de toxicidade *in vivo* (Bednarczuk et al., 2010).

A proposta desse tipo de modelo é também preservar dignidade e bem estar dos animais de laboratórios sem comprometer o desenvolvimento científico, com testes que são seguros e eficazes para fazer a avaliação da substância teste. Além disso, a necessidade em se desenvolver ainda mais métodos alternativos está no fato do alto custo para manutenção e aquisição dos animais nos laboratórios, protocolos de estudos com animais muitas vezes requerem longos períodos para conclusão, muitas vezes falta de profissionais capacitados para manusear esses animais (Ogasawara, 2019).

Nas últimas décadas a discussão em torno desses métodos ganhou proporções ainda maiores, no sentido de que estes sejam implementados e utilizados cada vez mais em pesquisa científica e o Brasil segue a tendência, com publicação da Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014, no âmbito do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, 17 métodos alternativos foram reconhecidos com aceitação regulatória internacional. E alguns são bastante reconhecidos e utilizados em laboratórios de todo o Brasil, em substituição aos métodos *in vivo* (Ogasawara, 2019).

Um exemplo de teste *in vitro* é o teste que utiliza *Artemia salina*. Ela é um microcrustáceo aquático que pode ser encontrado em abundância em muitos ecossistemas de água salgada, é um organismo invertebrado e sua utilização nos testes de toxicidade se deve a algumas características como rápida eclosão dos seus ovos, tamanhos pequenos, alta produção de descendentes, seu cultivo é simples e tem um bom custo benefício (Palacio et al., 2021).

Meyer et al (1982) descreveu o teste de letalidade com *Artemia salina*, neste teste são observados os nauplios vivos e mortos após a exposição a

diferentes concentrações de uma substância. Segundo ele, foi estabelecida uma relação entre grau de toxicidade e dose letal média DL_{50} foi considerado que quando verificados valores acima de $1000\mu\text{g/ml}$ e não houver morte acima de 50%, a substancia é considerada atóxica (Bednarczuk et al., 2010).

Outro exemplo é o ensaio de citotoxicidade pelo método MTT, esse ensaio é usado para estimar citotoxicidade através de avaliação de atividade mitocondrial, onde somente células viáveis conseguem converter o sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina) que é um sal amarelo em cristais de formazan (cor púrpura) (Duarte, 2015). Foi desenvolvido por Mosmann et al (1983) e é realizado em alguns passos que podem sofrer algumas alterações dependendo do estudo, variando por exemplo as quantidades da droga e da substância que será utilizada.

O reagente MTT consegue penetrar pela membrana celular de células viáveis, por conta, provavelmente, da sua carga positiva e sua estrutura lipofílica e a medição baseada na colorimetria produzida por essa reação. O ensaio é realizado após a incubação de algumas células com o MTT e o formazan que é produzido é solubilizado com dimetilsulfóxido (DMSO), ao final com auxílio de um espectrofotômetro de microplacas a absorbância de cada poço será obtida e se chegará a um resultado final sobre a citotoxicidade da substância teste. A quantificação da absorbância se dá a partir das leituras que o equipamento faz, com base nas cores roxas que aparecem nas placas por conta da conversão em formazan, quanto mais púrpura está o poço mais células viáveis se encontram nele (Ghasemi et al., 2021).

O teste *Allium cepa* (cebola) é um bioensaio, também *in vitro*, de alteração cromossômica bastante utilizado em laboratórios, isso porque o teste utiliza a cebola que é de fácil manuseio e armazenamento. O teste foi desenvolvido por Levan (1938), e avalia os efeitos da substância teste nos cromossomos das plantas, analisando as células das pontas das raízes, pois elas que ficam por um certo tempo em contato com a substancia a ser testada (Carvalho et al., 2018).

O ensaio propõe ver índice germinativo (IG), índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN), que são parâmetros

importantes para ver o efeito que a substância está exercendo no sistema. O índice germinativo (IG), pode ser avaliado de forma macroscópica, pois nesse parâmetro se observa o crescimento das raízes e a germinação das sementes, quando a substância teste provoca queda de cerca de 70% da germinação em relação ao controle negativo, esta pode ser considerada tóxica. Os outros parâmetros são avaliados de forma microscópica, a exemplo o IM fornece dados sobre citotoxicidade enquanto as ACs fornecem dados sobre genotoxicidade pois mostram mudanças nos cromossomos, já o número e frequência dos MNs indica tanto genotoxicidade como mutagenicidade (Silva, 2021).

É um teste de curta duração que apresenta algumas vantagens como facilidade de manuseio, baixo custo e bom desempenho cromossômico. Utiliza de uma série de cebolas para diferentes concentrações da substância teste e por ser um teste sensível que apresenta boa correlação com outros sistemas de testes, os resultados finais devem ser considerados como alertas caso mostre alguma possível citotoxicidade ou genotoxicidade, pois pode indicar um possível risco à saúde ou para o ambiente (Fiskejo, 1985).

O ensaio de cometa é outro tipo de teste muito útil e empregado e para avaliação de danos e reparos ao DNA em células individuais, é chamado de cometa porque o teste tem como princípio a lise de membrana celular seguida da migração eletroforética do DNA liberado e ao migrar a célula adquire um formato de cometa com cabeça e cauda e por isso o nome. O teste também pode ser chamado de técnica de eletroforese celular em microgel e análise vai se basear no grau de fragmentação do DNA e sua migração pela microeletroforese (Brianezi; Camargo; Miot, 2009).

Quando ocorre a lise das membranas e o DNA é exposto a uma corrente elétrica, cada célula de DNA contém um nucleóide que é uma porção não fragmentada que aparece com um formato de círculo preenchido e a parte do DNA fragmentado tem aspecto de “cauda de cometa”, o padrão de dano se baseia pelo tamanho, intensidade da fluorescência e porcentagem do DNA da cauda. Um DNA íntegro não apresenta cauda, e a medida que o tamanho da cauda aumenta se refere a diferentes classes de danos, onde a cauda pode

chegar a ser mais duas vezes maior que o tamanho do nucleóide, quanto maior a cauda, maior o dano (Garla et al., 2022).

O teste de hemólise é outro exemplo de teste de toxicidade *in vitro*, é um teste útil para avaliação de citotoxicidade com vantagens de ser de fácil acesso, barato e fácil de realizar. O sangue é coletado, mas comumente de um animal, e em seguida os eritrócitos lavados para serem incubados juntamente com o composto que está sob investigação e observar se este causa hemólise ou não e o grau da hemólise através da análise em espectrofotômetro (Saebo et al., 2023).

2.5.3 Testes de toxicidade *in vivo*

Os testes de toxicidade *in vivo* são testes permitem avaliar início, natureza e duração da intoxicação, inclusive com acompanhamento dos animais através de exames clínicos e patológicos. São testes que abordam carcinogenicidade, genotoxicidade, alterações na fertilidade, toxicidade, aguda, subcrônica e crônica e são utilizados grupos de animais com diferentes doses, sendo avaliado além do grau de toxicidade se houve morte dos animais (Moura et al, 2012).

Os modelos animais facilitam seleção de compostos, permitem compreender mecanismos de ação, avaliam segurança, podem proporcionar melhor compreensão de índice terapêutico e consequentemente melhor seleção de dose a ser utilizada. Esses animais para serem utilizados na pesquisa científica passam pelo Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA) que é um órgão de definição e fiscalização das diretrizes éticas em experimentação animal no país e esse conselho utiliza das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) que julgam e aprovam projetos de pesquisa das universidades e outras instituições de acordo com as diretrizes do CONCEA (Tonholo, 2018).

Com relação as condições experimentais os animais devem estar saudáveis, ter semelhanças de peso e idade e no acondicionamento eles devem estar em condições adequadas, tamanho de gaiola adequada, condições de temperatura e umidade e dieta de modo a manter bom funcionamento do metabolismo. O número de animais a ser selecionado para os ensaios vai

dependem dos parâmetros a serem avaliados de modo que se tenha uma validade estatística e a escolha das vias de administração vai depender também das vantagens e desvantagens oferecidas, sendo as mais comuns via oral, parenteral e dérmica (Lavandeira, 2014).

Na maioria dos casos uma espécie de animal (roedor) é aceitável e os critérios para seleção da espécie a ser utilizada são baseados em perfis metabólicos, semelhança com o sistema humano e tolerância de algumas espécies à ação farmacológica. Em um estudo de toxicidade aguda por exemplo, os animais recebem diferentes doses da substância teste por um período de até 24h e permite conhecer a morte dos animais por excesso de produtos nos órgãos alvo, permite ver as mudanças de comportamento do animal conforme variação de dose e o risco da exposição aguda permitindo selecionar a melhor dose para estudos prolongados (Tonholo, 2018).

Os ensaios de toxicidade podem ser ainda sub agudos com duração entre 14 e 28 dias, subcrônica com duração de 90 dias e crônica onde o período de duração é maior, a FDA (agência americana) e PMDA (agência asiática) requerem que o tempo de duração desse tipo de estudo seja de 12 meses, mas a FDA reconhece que 9 meses possam ser suficientes para extrair todos os dados, enquanto que a EMA (agência europeia) requer duração de 6 meses. Porém mesmo com um pouco de variação no período de duração desses testes, eles permitem fazer uma avaliação, principalmente, de efeitos adversos, fazendo uma análise da ação dessa substância como se fosse um tratamento crônico (Denny; Stewart, 2017).

Esses ensaios podem ser feitos com roedores, mas têm-se aumentado a procura por métodos alternativos de modelos experimentais de forma a racionalizar e reduzir o uso de animais, enfatizando seu uso consciente, e um exemplo são a utilização de invertebrados como o *Zophobas morio*, é um inseto, um besouro, e suas larvas tem sido utilizada para realização de pesquisas merecendo destaque por sua facilidade de cultivo, custo benefício, facilidade e permitir avaliar com eficácia alguns parâmetros, como por exemplo toxicidade aguda (Neta, 2022).

2.5.3.1 Teste de toxicidade com larvas de *Zophobas morio*

O *Zophobas morio*, conhecido como tenebrio gigante, é um inseto pertencente à família Tenebrionidae e as larvas apresentam excelente composição química com alto teor de proteínas, e teor de lipídeos com propriedade de se adaptar a diferentes substratos (Fratini et al., 2023).

É um tipo de modelo alternativo ao uso de roedores e oferecem algumas vantagens como custo benefício, tratabilidade genética, ciclo de vida curto e mesmo possuindo uma distância evolutiva de mamíferos, esses invertebrados possuem sistema imunológico inato semelhante ao de organismos superiores, sendo fundamentais para compreensão de alguns aspectos como defesa do hospedeiro (Rakovitsky et al., 2024).

Na comunidade científica este novo modelo experimental com essas larvas de *Zophobas morio* tem despertado interesse, pois se mostrou eficiente em ensaios onde foi avaliado como hospedeiro para examinar infecções fúngicas, utilizado também para promover decomposição biológica de poliestireno expandido (EPS), onde dentro do trato digestivo das larvas ele sofre biodegradação se transformando, gerando dióxido de carbono e fragmentos (Neta, 2022).

Seu sistema imunológico inato é semelhante ao de mamíferos sendo assim utilizadas em testes para determinar a toxicidade de compostos ativos, além disso, apesar de não possuir sistema imune adaptativo, possuem sistema imune inato evoluído com estratégias de defesa celular e humoral que permitem avaliar inflamação através da presença de hemócitos na hemolinfa das larvas, além de permitir monitorar da sua viabilidade através da ausência de movimento e melanização em resposta à infecção (Silva et al., 2024).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a toxicidade da esterubina em modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar as propriedades físico químicas e toxicidade da esterubina *in silico* através de programa computacional ADMETlab 3.0;
- Avaliar a toxicidade da esterubina *in vitro* através do teste de hemólise
- Avaliar a toxicidade da esterubina *in vitro* através de teste de citotoxicidade pelo método MTT
- Verificar a toxicidade da esterubina *in vivo* em ensaio com Larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

A obtenção da esterubina foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida (UNIVASF). Foram coletadas as folhas de três variedades de *Eriodictyon californicum* (Hook. & Arn.) Torr. (Boraginaceae) na sede da Embrapa Semiárido, no Campo Experimental de Bebedouro (coordenadas 09°23'35" S e 40°30'27" O), no município de Petrolina-PE, em fevereiro de 2020. Os espécimes foram coletados pela Prof. Dra. Lúcia Helena Piedade Kiill, pesquisadora da Embrapa Semiárido e a identificação botânica foi realizada com base na comparação com exsicata, sob identificação HTSA 7850. A planta também foi cadastrada no SisGen com número de registro A7FE154, referente aos constituintes químicos das folhas de *Eriodictyon californicum*.

A esterubina apresenta fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_6$, peso molecular, 302,28 g/mol, nome IUPAC: (2S)-2-(3,4-dihidroxifenil)-5-hidroxi-7-metoxi-2,3-di-hidrocromeno-4-ona. No isolamento, a substância foi obtida como um sólido branco amorfo da fase acetato de etila, com R_f 0,5 quando eluído no sistema Hex:AcOEt (1:1). Após revelação com NP-PEG, o composto adquiriu coloração alaranjada. O composto é solúvel em MeOH e possui faixa de fusão a 220-223 °C.

4.2 Drogas e reagentes

- Soro fisiológico
- DMSO (Dimetilsulfóxido)
- Álcool isopropílico
- Reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)

4.3 Avaliação *in silico* dos parâmetros físico-químicos e toxicidade através do programa computacional ADMETlab 3.0

Inicialmente o SMILE da esterubina foi obtido através do banco de dados de moléculas PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), e importado para a plataforma ADMETlab 3.0. A análise ADMET inicia colocando o SMILE manualmente no espaço para leitura da própria plataforma. Com essa estrutura disponível, a plataforma gera vários descritores moleculares e propriedades

físico-químicas, como peso molecular, polaridade e coeficiente de partição (LogP), que servem como base para as predições. Os descritores são a base para aplicação de modelos de aprendizado de máquina, prevendo aspectos críticos do comportamento da molécula no organismo, como as propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME).

Após a conclusão das predições, o ADMETlab 3.0 produz um relatório em PDF que organiza as informações de forma compreensível, auxiliando na interpretação dos resultados e na identificação de moléculas que possam apresentar restrições ou perigos. O relatório possibilita uma avaliação mais segura e eficaz, auxiliando na orientação de moléculas promissoras para ensaios experimentais mais precisos e progredindo no aperfeiçoamento de possíveis medicamentos (Fu et al, 2024).

As tabelas geradas pelo ADMETlab 3.0, apresentam as propriedades com interpretações através de valores e cores, mostrando que para determinada propriedade a molécula pode apresentar-se desde extremamente desfavorável a extremamente favorável, e toxicidade considerada baixa ou elevada, conforme mostrado na tabela 1 e tabela 2.

Tabela 1. Interpretação das faixas de valores apresentadas pelo ADMETLab 3.0 para propriedades de toxicidade

Valores	Significado	Interpretação
0-0,1 (---)	Extremamente desfavorável, valor bem longe do ideal	Esse aspecto pode ser um fator limitante crítico, exigindo ajustes substanciais para que o desenvolvimento continue.
0,1-0,3 (--)	Desfavorável, a propriedade está abaixo do ideal, mas é um pouco menos problemática do que a faixa anterior.	Apesar de representar uma limitação significativa, ajustes moderados podem melhorar a situação.
0,3-0,5 (-)	Moderadamente desfavorável, propriedade aquém do ideal, mas o nível de limitação é menor	Sugere necessidade de otimização, mas o composto pode ainda ser viável dependendo do contexto.
0,5-0,7 (+)	Favorável, propriedade se encontra em uma faixa aceitável, sugerindo um perfil razoável	Esse valor indica um bom potencial para o composto, geralmente sem necessidade de grandes mudanças
0,7-0,9 (++)	Muito favorável, propriedade bem próxima do ideal, indicando boa adequação	O composto é muito bem tolerado ou eficaz para essa característica
0,9-1,0 (+++)	Extremamente favorável, propriedade está quase no ideal, sendo excelente para o desenvolvimento do composto	Valores nessa faixa indicam um perfil altamente favorável, com grande potencial para o desenvolvimento.

Fonte: ADMETLab 3.0, adaptado, 2024 .

Tabela 2. Significado das cores apresentadas nos resultados da avaliação de toxicidade pelo programa ADMETLab 3.0

Cores	Significado
	“Pobre”, quer dizer que para essa característica a toxicidade é pobre, baixa, e por isso apresenta um perfil alto de segurança
	Médio, indica um perfil de toxicidade mediano para essa característica.
	Elevada, a propriedade mencionada apresenta elevada toxicidade que consequentemente é ruim, apresentando baixa segurança.

Fonte: ADMETLab 3.0, adaptado, 2024.

4.4 Avaliação *in vitro* da esterubina

4.4.1 Teste de Hemólise

O teste de hemólise foi realizado com a esterubina, conforme Mendes et al., (2017) e Batista et al., (2020), com adaptação. Foram utilizados eritrócitos derivados de sangue arterial de mamífero (*Canis lupus familiaris*) de acordo com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (protocolo nº 463/18). A análise foi toda feita em triplicata e as amostras divididas em 5 grupos: Grupo I: suspensão de eritrócitos + solução salina 0,9% (controle negativo); Grupo II: suspensão de eritrócitos + solução de detergente (controle positivo); Grupo III: suspensão de eritrócitos + solução salina 0,9% + esterubina 1mg/ml; Grupo IV: suspensão de eritrócitos + solução salina 0,9% + esterubina 0,1mg/ml; Grupo V: suspensão de eritrócitos + solução salina 0,9% + esterubina 0,01mg/ml.

Inicialmente os eritrócitos são levados para centrifugação para serem lavados, são colocados 1 ml da suspensão de eritrócitos e 9 ml de solução salina centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos, por 2 vezes para ao final retirar o sobrenadante. Nos eppendorfs, feitos em triplicata para cada grupo, são

pipetados 360 µl de solução salina (exceto no grupo II), em seguida 40 µl da solução contendo esterubina no grupo III, homogeneizado, e a partir dela é feita uma diluição seriada até o grupo V, e nesse grupo após homogeneização da esterubina e solução salina, são desprezados 40 µl de cada eppendorf para que todos se mantenham no mesmo volume. Em seguida são pipetados 360 µl da solução de eritrócitos em todos os eppendorfs de todos os grupos, e no grupo II é adicionado com a solução de hemácias 360 µl da solução de detergente.

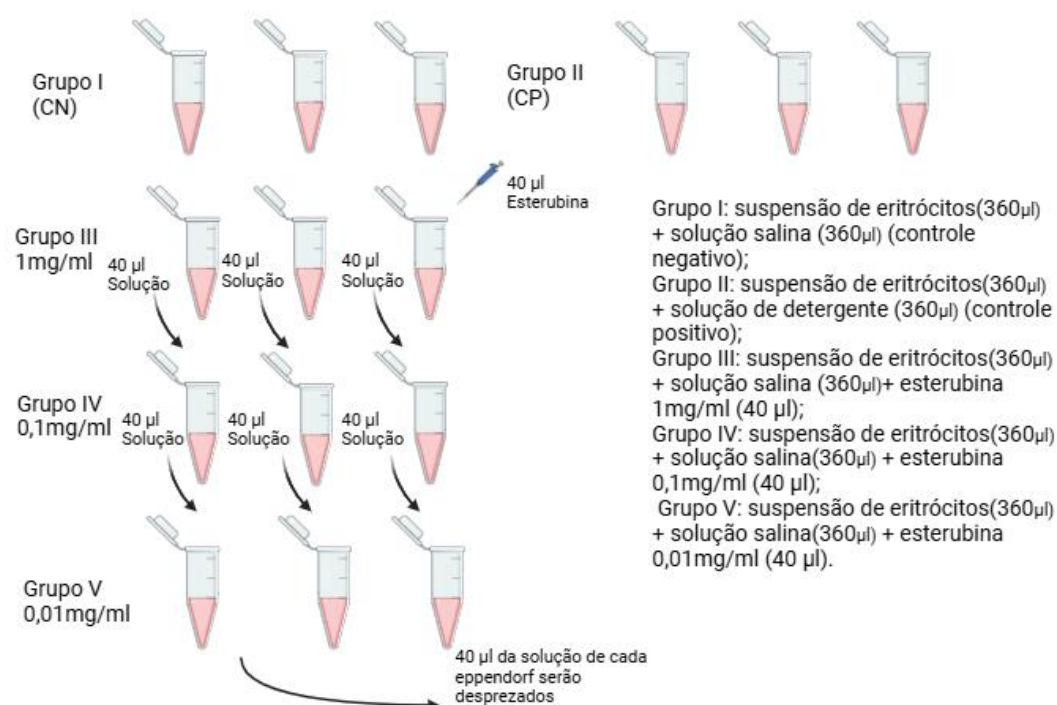


Figura 3. Preparo das concentrações de esterubina para incubação e posterior leitura em espectrofotômetro para avaliação da toxicidade *in vitro* através de teste de hemólise. Fonte: Autor, 2024.

Após, as amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C. Finalizado o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços. Por fim foi quantificado a presença de hemoglobina no sobrenadante usando o GloMax Microplate Reader (Promega) no comprimento de onda de 560nm. A solução salina 0,9% foi utilizada para o controle negativo e solução detergente a 1% para o controle positivo.

4.4.2 Teste de citotoxicidade pelo método MTT

O ensaio do MTT foi realizado de acordo com Mosmann (1983). As linhagens celulares L929 (fibroblastos de camundongos) e B16F10 (melanoma murino) foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades, numa densidade de 1×10^6 células/mL. As substâncias teste e controles foram incubadas durante 68 horas juntamente com as células. Após o período de incubação, foi adicionado às culturas, 20 μ L da solução de MTT (5 mg/mL) e reincubadas durante 4h em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as placas, cuidadosamente, armazenadas ao abrigo da luz, sendo deixadas *overnight* para secagem completa. Posteriormente, o precipitado foi ressuspensionado em 100 μ L de álcool isopropílico. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram analisadas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm.

4.5 Avaliação *in vivo* da esterubina

4.5.1 Teste de toxicidade *in vivo* com larvas de *Zophobas morio* - Tenebrio Gigante

O ensaio para avaliação da toxicidade com larvas de Tenebrio seguiu o protocolo com metodologia de Neta (2022), adaptado. O material biológico utilizado neste ensaio para avaliação da toxicidade *in vivo* foram larvas de Tenebrio, e todo o preparo da amostra para o experimento foi realizado no laboratório de aulas práticas no Centro de Ciências Agrárias (CCA) e levado para análise no Laboratório de Atividade Antileishmania no Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM).

O experimento foi realizado em duplicata contendo 10 larvas por grupo de concentração a ser avaliada no estudo. As larvas foram separadas em placas de Petri, contendo, em cada uma, um pouco de ração para consumo até o final do experimento e 5 larvas em cada placa. Inicialmente foi feita uma diluição da substância com solução salina e obtidas as doses de 3, 30 e 300 mg/kg, doses já preconizadas para teste de toxicidade nesse modelo, que foram administradas na hemocela, no primeiro esternito visível após a última pata do *Zophobas morio* (0,5 g), a quantidade administrada é de 10 μ L, com auxílio de seringa de insulina, e além da substância testes, também foram administrados

mesma quantidade de solução salina e DMSO como controle negativo e positivo, respectivamente.



Figura 4. Preparo da solução de esterubina para obtenção das diferentes doses utilizadas para avaliação da toxicidade *in vivo* em larvas de *Zophobas morio*. Fonte: Autor, 2024.

Após a administração, as larvas foram incubadas à temperatura ambiente em placas de Petri e contendo dieta da criação e foram observadas por meio de inspeção visual com 24h e 48h, com relação à melanização e número de morte e após a observação de 48h as larvas foram congeladas para posterior análise.

Para a análise, o material biológico das larvas foi coletado, homogeneizado com 2 ml de solução salina, transferidos para um eppendorf de 2 ml e em seguida levadas para centrifugação a rotação de 14600 rpm por 15 minutos, após, 100 µL do sobrenadante foram coletados em microplacas e feita a leitura em espectrofotômetro 550nm. Ao final foram obtidos gráficos, representando o teor de melanização e percentual de sobrevivência das larvas em cada concentração a ser avaliada no estudo.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graphpad prism 8.0 como o cálculo da concentração inibitória de 50% (CI50), com intervalo de confiança de 95%. O índice de seletividade foi calculado como a razão, entre a IC₅₀ entre células normais e células cancerígenas, foram realizadas análises de variância ANOVA one-way com múltiplas comparações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise *in silico* de parâmetros físico-químicos pelo programa ADMETlab 3.0

No gráfico radar, são representados os parâmetros físico-químicos da substância, a linha verde representa os limites inferiores ou limites mínimos, a linha azul o limite máximo para cada propriedade, a linha amarela representa os limites da esterubina, sendo possível observar se a molécula está dentro desse limite (atingindo até a linha verde) ou se ultrapassa os limites aceitáveis para cada parâmetro (se ultrapassa a faixa azul), conforme se observa na figura 5.

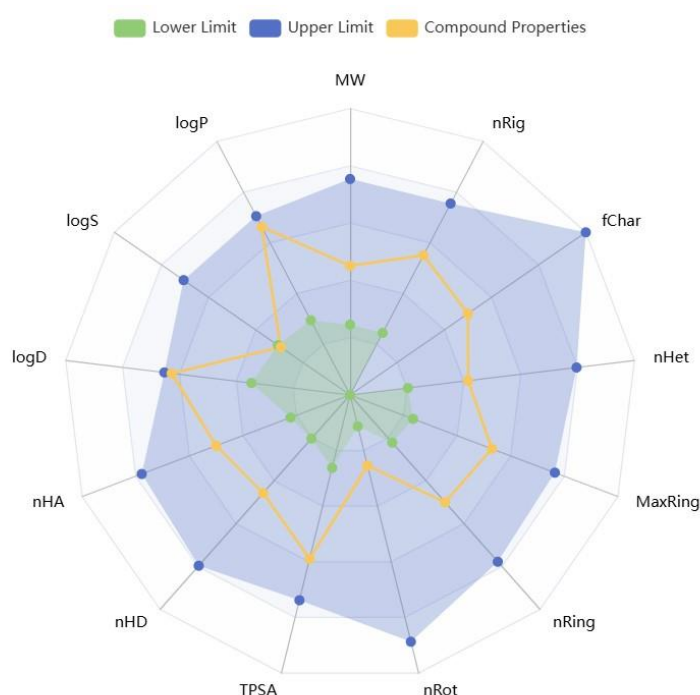


Figura 5. Gráfico radar obtido através do ADMETlab 3.0 que evidencia propriedades físico-químicas da esterubina e os limites de cada propriedade.

Fonte: ADMETlab 3.0, 2024.

Sobre os limites, o gráfico traz o logS, esse parâmetro é um logaritmo de solubilidade que diz sobre sua capacidade de dissolver em um solvente específico, quando positivo indica uma alta solubilidade em água e negativo uma baixa solubilidade. Esse parâmetro é muito importante no desenvolvimento de fármacos pois está relacionada a absorção e distribuição no organismo (Soeiro, 2023). Como mostrado na figura 6, a esterubina passou um pouco do limite

mínimo e apresenta um resultado negativo de -4,134 podendo indicar possivelmente sua baixa solubilidade em água.

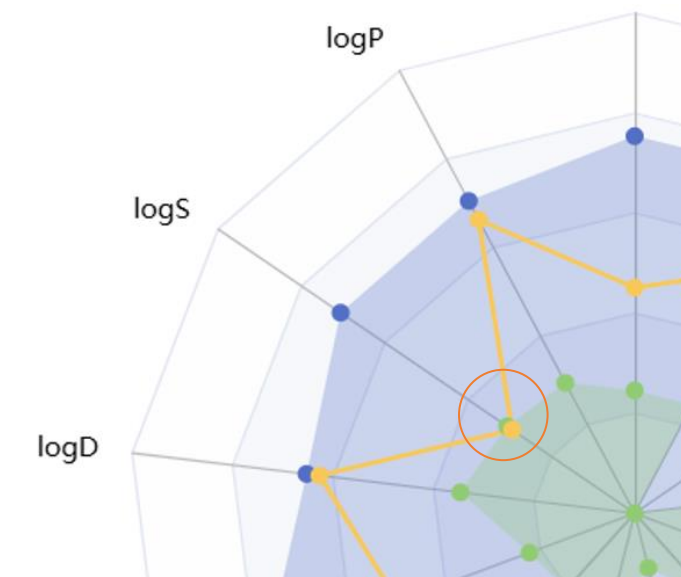


Figura 6. Corte do gráfico radar com foco em logS

Fonte: ADMETlab 3.0, adaptado.

Outro parâmetro avaliado foi o logP, coeficiente de partição, este traz informações sobre a lipofilicidade de um ativo. De acordo com a regra dos 5, os valores de lipofilicidade deve estar entre 1 e 5, abaixo de 1 representa baixa capacidade de atravessar membranas e acima de 5 alta capacidade da molécula apresentar toxicidade pois pode atravessar as membranas de maneira exagerada provocando problemas (Silva et al., 2022). O logD que é o coeficiente de distribuição, também diz respeito sobre lipofilicidade de um composto em um valor de PH, sendo uma função da contribuição do logP e grau de ionização (Andrés et al., 2015). O log de P da esterubina se encontra dentro dos limites estabelecidos e próximo ao limite máximo (que é 5), assim como o logD, também se encontra dentro dos limites representados na figura 5, demonstrando maior afinidade lipofílica e boa capacidade de atravessar as membranas.

Para avaliar estabilidade e solubilidade o TPSA (Área Superficial Polar Total, do inglês Total Polar Surface Area) é utilizado como uma medida de polaridade e capacidade de interação da molécula com outras substâncias como receptores biológicos e quantifica a área superficial polar total, assim fornece

uma indicação de polaridade do fármaco e uma indicação de sua solubilidade lipídica (Silva et al., 2022). O valor TPSA tem sua unidade em Angstroms e aumenta à medida que o número de grupos polares dentro da estrutura do fármaco aumenta e deve estar entre 20-130 Å (Daina; Michielin; Zoete, 2017). Compostos mais lipofílicos terão maiores valores de logP e menor valor de TPSA, e a esterubina se encaixa nesses dados como mostrado na figura 5 através do seu limite, e apresenta valor de 96,22 Å, demonstrando maior probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o SNC (Sistema Nervoso Central).

O MW (molecular weight) diz respeito ao peso molecular, pela regra de Lipinski os compostos apresentam maiores chances de serem biodisponíveis quando possuem peso molecular ≤ 500 daltons, no gráfico obtido pelo ADMETlab 3.0, a esterubina apresentou peso de 302,28 g/mol (que equivale ao mesmo valor em Daltons), estando dentro do padrão desejado e mostrando um perfil favorável para absorção oral e bom tamanho para atravessar mais facilmente as membranas biológicas (Moura, 2021).

O NHA são os números de aceitadores de ligação de hidrogênio (soma de átomos de O e N; ≤ 10), e o NDA, número de doadores de ligação de hidrogênio (soma de grupos OH e NH; ≤ 5), quando a molécula se encontra fora desses padrões sugere-se uma má absorção ou permeação (Santos; Gonsalves; Araújo, 2018), nesses parâmetros a esterubina também se encontra dentro dos limites aceitáveis, sendo valor de NHA- 6 e NDA- 3, valores esses que podem trazer vantagens no desenvolvimento de moléculas bioativas, para administração via oral de fármacos e biodisponibilidade durante ensaios pré clínicos e clínicos.

O número de anéis (nRing) da molécula são 3, número de átomos no maior anel (MaxRing) são 10, e número de heteroátomos (nHet) 6, todos se encontram dentro dos limites estabelecidos conforme figura 5. A complexidade da molécula é fator significativo para que um candidato a fármaco, seja aprovado e se torne efetivamente um medicamento, o que reflete essa complexidade são grau de saturação, números de centros quirais, ou seja, átomos ligados a quatro átomos ou grupos funcionais distintos. A complexidade também pode ser

calculada através de número de ligações simples, duplas ou de anéis aromáticos (Rodrigues et al., 2021).

Macromoléculas que possuem uma complexidade estrutural por exemplo, essa complexidade pode se tornar uma barreira para que ela seja usada terapeuticamente, podendo apresentar elevado peso molecular e baixa permeabilidade, enquanto que fármacos convencionais que apresentam baixo peso molecular, boa capacidade de atravessar membranas, apresentam estrutura molecular mais simples e estável sendo transportados mais facilmente para o seu local de ação, a esterubina se encontra dentro dos padrões desejados para nRing, MaxRing e nHet mostrando que a mesma apresentam estrutura molecular mais simples e estável (Melo; Junior; Fialho, 2012).

Além dos parâmetros abordados por Lipinski na regra dos 5, outros descritores foram adicionados no sentido de compreender melhor a permeação celular e fatores que podem prever uma boa atividade a possíveis candidatos a medicamentos, como por exemplo o número de ligações rotacionáveis, ou rotativas (nRot), número de ligações rígidas (nRig) e a carga formal (fChar). No gráfico todos se encontram dentro do limite desejado, o nRot, ≤ 10 , por exemplo, prediz uma melhor permeabilidade para esse fármaco, um menor número de ligações rotacionáveis é ideal para garantir a estabilidade conformacional da molécula e sua passagem através das membranas (Rodrigues et al., 2021), no gráfico a esterubina se mostrou dentro do limite apresentando o valor de 2 para nRot.

5.2 Análise da toxicidade *in silico* pelo programa ADMETlab 3.0

Tabela 3. Análise da Toxicidade *in silico* da esterubina através do programa computacional ADMETlab 3.0

Propriedade	Valor	Decisão	Comentário
AMES mutagenicidade	0,774		- AMES toxicidade - Categoria 1: AMES positivo (+) -Categoria 0: AMES negativo (-) - O valor de saída é probabilidade de ser tóxico
Toxicidade oral aguda em ratos	0,672		-Toxicidade oral aguda em ratos -Categoria 0: baixa toxicidade >500 mg/kg -Categoria 1: alta toxicidade <500 mg/kg -O valor de saída é a probabilidade de ser tóxico, dentro do intervalo de 0 a 1.
Carcinogenicidade	0,469		-Categoria 1: cancerígenos; -Categoria 0: não cancerígenos; -O valor de saída é a probabilidade de ser tóxico.
Irritação ocular	0,99		-Categoria 1: irritantes; -Categoria 0: não irritantes; -O valor de saída é a probabilidade de serem irritantes.
Corrosão ocular	0,084		-Categoria 1: corrosivos; -Categoria 0: não corrosivos; -O valor de saída é a probabilidade de ser corrosivos.
Hepatotoxicidade humana	0,705		-Categoria 1: H-HT positivo(+); -Categoria 0: H-HT negativo(-); -O valor de saída é a probabilidade de ser tóxico
Respiratório	0,882		-Categoria 1: tóxicos respiratórios; - Categoria 0: tóxicos não respiratórios. -O valor de saída é a probabilidade de ser tóxico,

			dentro do intervalo de 0 a 1.
Genotoxicidade	0,967		-Categoria 0 : não genotoxicidade (-) -Categoria 1: genotoxicidade (+) -O valor de saída é a probabilidade de ser genotóxico, dentro do intervalo de 0 a 1

Fonte: ADMETlab 3.0, 2024, adaptado.

*legenda: valores 0-0,1:extremamente desfavorável; 0,1-0,3:desfavorável; 0,3-0,5:moderadamente desfavorável; 0,5-0,7:favorável; 0,7-0,9:muito favorável; 0,9-1,0:extremamente favorável. Cores:  elevada toxicidade, perfil baixo de segurança;  : média toxicidade, perfil de segurança médio;  : baixa toxicidade, alto perfil de segurança.

O ADMETlab 3.0, é uma plataforma abrangente e eficiente para avaliar parâmetros relacionados ao ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), avaliando também propriedades físico-químicas e características químicas medicinais que possam estar envolvidas no processo de desenvolvimento de medicamentos (Xiong et al., 2021).

A plataforma emprega algoritmos avançados, como a Floresta Aleatória e Máquinas Vetoriais de Apoio, para antecipar características cruciais, tais como a capacidade de absorção intestinal, solubilidade em água, biodisponibilidade oral e a interação com proteínas no sangue. Ademais, a plataforma emprega redes neurais aprimoradas a partir de dados experimentais para avaliar potenciais riscos de toxicidade, tais como os de toxicidade hepática, cardíaca e mutagênica (Cao et al., 2024).

A tabela 3 traz algumas propriedades relacionadas a toxicidade da esterubina, cada propriedade, possui um valor, que é considerado valor de saída que diz se naquela determinada característica a substância é tóxica ou não sendo esse valor variando de 0 a 1, além dos valores, cada característica apresenta círculos onde as cores podem ser verde (excelente), amarelo (médio), vermelho (pobre), esses círculos com cores são as “decisões” que são como essas propriedades ficaram caracterizadas (Tabela 2).

As propriedades que apresentam cor verde que significa excelente, em termos de toxicidade, significa dizer que para essa característica ela tem alta toxicidade, que conseqüentemente é ruim, apresentando baixa segurança, quando a propriedade apresenta cor vermelha que significa “pobre”, quer dizer que para essa característica a toxicidade baixa, e por isso apresenta um perfil

alto de segurança, e quando apresenta cor amarela, está mediano, indica um perfil de toxicidade médio para essa característica.

Com relação as propriedades descritas, na tabela 3, o teste de mutagenicidade AMES, é um teste que usa *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* e usa aminoácidos requeridos por essas cepas para detectar mutações. A substância teste é exposta a essas cepas bacterianas específicas, que são sensíveis a mutações, e que quando em contato com substâncias que são consideradas mutagênicas elas restauram a habilidade funcional das bactérias de produzirem os aminoácidos essenciais, substituindo a mutação original em um processo chamado mutação reversa (Vian et al., 2019). Através da análise no ADMETlab 3.0 a esterubina apresenta valor de 0,774 se mostrando muito favorável, bem tolerado, e com baixa toxicidade sendo considerada não mutagênica pelo teste de AMES.

O padrão estrutural dos flavonoides de um modo geral os tornam ricos em propriedades quimiopreventivas, algumas estruturas são tidas como essenciais principalmente para atividade antimutagênica, como presença de carbonila no carbono 4, existência de duplas ligações entre carbonos C2-C3, anel aberto C e posição do anel B são as estruturas principais que podem produzir variações na atividade anticâncer e variações na estrutura dos flavonoides em diferentes posições podem estar relacionados a mudanças na eficácia dos flavonoides (Almeida, 2013).

Características que modulem a captura de radicais livres também são importantes para esse tipo de atividade como presença de catecol no anel B que ajuda na capacidade de doar elétrons, duplas ligações nas posições 2 e 3 conjugadas com o grupo 4-oxo e presença de hidroxilas nos carbonos 3 e 5 que confere potencial máximo na captura de radicais livres (Almeida, 2013) e a esterubina em sua estrutura apresenta algumas características que corroboram com os estudos em questão e podem justificar sua boa capacidade de ser antimutagênica como a presença de carbonila no carbono 4, e hidroxila no carbono 3 que auxilia na captura de radicais livres.

A avaliação da toxicidade oral aguda em ratos, é um parâmetro de grande importância e permite avaliar a capacidade da substância de provocar danos agudos aos organismos vivos (Cunha et al., 2013), com relação a esse parâmetro a esterubina se mostrou em uma faixa aceitável, de perfil razoável e

indicando bom potencial para o composto, provavelmente não sendo necessário grandes mudanças, mostrando que a substância tem boa capacidade de ser testada *in vivo* e baixas chances de provocar mortalidade.

Em estudo realizado por Kazmi e colaboradores (2023), onde avaliaram, em ratos, a atividade da esterubina contra doença de Alzheimer induzida quimicamente, os resultados obtidos foram positivos, a esterubina melhorou a atividade comportamental, alterou estresse oxidativo e reduziu marcadores neuroinflamatórios, e um dos fatores pode ser o fato de que a esterubina pode regular os níveis da enzima AchE (acetilcolinesterase) e ao regular esses níveis mais acetilcolina se encontrará disponível e regula o sistema colinérgico. Além disso, ao ser tratado com esterubina, os níveis antioxidantes foram restaurados, a peroxidação tecidual diminuída e os níveis de SOD (superóxido desmutase), GSH (glutathione) e CAT(catalase) aumentados.

Com relação a carcinogenicidade o valor apresentado de 0,469, é um valor que merece um pouco de atenção pois é considerado moderadamente desfavorável. Os diversos estudos relacionados a atividade dos flavonoides os mostram como benéficos à saúde e com inúmeras propriedades, porém como toda substância natural podem apresentar algum tipo de toxicidade e que pode ser dose dependente, como em alguns estudos que demonstraram que a dose letal (DL₅₀) de isoflavonas em ratos foi de 2g/kg administrada intravenosa, além do que administrações constantes de doses extremamente altas de flavonoides pode causar alterações morfológicas nas membranas dos hepatócitos dos camundongos provocando necrose e morte do animal (Meotti, 2006).

Além do que alguma atividade tóxica dos flavonoides pode ser atribuída a formação de epóxidos durante processo de biotransformação, que podem ter capacidade de provocar genotoxicidade e levar ao desenvolvimento de câncer, mas ainda assim o risco de consequências patológicas ocorridas pelo consumo de flavonoides é considerado baixo (Meotti, 2006).

Outros estudos também mostram que altas doses de compostos fenólicos podem causar atividade mutagênica em virtude de radicais formados durante o processo de biotransformação, no trato gastrointestinal dos animais (Silva et al., 2015).

Na toxicidade relacionada a irritação ocular a esterubina apresentou valor de 0,99, conforme mostrado na tabela 3, sendo considerada extremamente favorável e como alto perfil de segurança para essa característica.

Em estudo conduzido por Ilhan e colaboradores (2018), um flavonoide proantocianidina que é extraído da semente de uva, foi testado com CoQ10 (coenzima q10), em lesão ocular induzida por mostarda de nitrogênio (MN) que é um agente de guerra química muito potente que provoca destruição das fibras estromais, infiltração de células inflamatórias, pálpebras com degenerações das fibras musculares, perda de cílios e alterações histológicas semelhantes a queimaduras. No grupo dos animais em que foi testado a substância MN e o flavonoide, proantocianidina, o mesmo teve capacidade de preservar as fibras musculares das pálpebras e os folículos capilares dos cílios e melhorar as alterações histológicas observadas, assim como no grupo com CoQ10 também. Além de atividade antioxidante as proantocianidinas também possuem atividade antiinflamatória, os estudos sugerem que o tratamento com flavonoides e CoQ10 podem ajudar o olho a se recuperar de lesões.

Em outro estudo verificou-se o uso de flavonoides em pacientes com retinopatia diabética, que é uma condição caracterizada por um processo inflamatório e alterações anatômicas e funcionais da retina, essas alterações são promovidas por um ambiente inflamatório crônico observado na retina, com níveis aumentados de citocinas pró inflamatórias, como TNF α (fator de necrose tumoral α) e IL-1 β (interleucina 1 β) (Rubsam; Parikh; Fort, 2018). Flavonoides podem prevenir ou atenuar as complicações associadas a retinopatia diabética, porque podem agir modulando o metabolismo de lipídios e carboidratos e a resistência a insulina, diminuindo a hiperglicemia, e suprimir processos inflamatórios e estresse oxidativo que podem estar envolvidos nessa condição (Matos et al., 2020).

Em estudo usando células endoteliais capilares da retina humana, foi visto que o extrato de antocianina de mirtilo (BAE) e seus constituintes malvidina, malvidina-3-glicosídeo e malvidina-3-galactosídeo, preveniram a lesão induzida por glicose alta nessas células, sendo observado uma diminuição do ambiente inflamatório e oxidativo diminuindo enzimas pró-oxidantes óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e NADPH oxidase 4, e aumentando enzimas antioxidantes como CAT e SOD, além disso, os níveis de malondialdeído (MDA) e IL-1 β

diminuíram, mostrando que o BAE tem efeitos antiinflamatórios e antioxidantes que trazem benefícios para lesão induzida por glicose alta nas células da retina humana (Huang et al., 2018).

Mostrando assim, que nesse tipo de parâmetro é extremamente importante que a esterubina tenha bom perfil de segurança, pois também possui atividade antioxidante e antiinflamatória que podem acabar ajudando nesse tipo de lesão.

Já com relação a corrosão ocular o valor atribuído se mostrou extremamente desfavorável para essa característica. Diferente da irritação ocular, a corrosão, se caracteriza por ser um dano irreversível, um processo inflamatório muito forte que pode causar corrosão do tecido e até mesmo cegueira (Santos, 2019). Nesse caso ou a substância teria que ser extremamente irritante a ponto de causar corrosão em pouco tempo de exposição, ou sua exposição prolongada poderia gerar danos na córnea que fossem irreversíveis, assim o fato da esterubina apresentar baixa toxicidade na irritação ocular, mas alta toxicidade na corrosão, pode ser dose dependente, onde possivelmente se uma dose muito alta fosse usada poderia gerar corrosão em curto espaço de tempo, ou se a exposição prolongada pudesse gerar danos que fossem cumulativos e com o passar do tempo essa lesão na córnea fosse grave a ponto de ser irreversível. Sendo assim um parâmetro que merece atenção especial.

Na hepatotoxicidade, a esterubina apresentou bons resultados com valor de 0,705, que é considerado bem próximo do ideal, e apresentando baixa toxicidade.

Os estudos que envolvem hepatotoxicidade são essenciais para o desenvolvimento de medicamentos, isso, para minimizar os efeitos tóxicos indesejados que podem aparecer durante seu uso. O fígado é o órgão principal onde os medicamentos tendem a atingir maior concentração depois de serem ingeridos, lá eles passam por biotransformação e bioativação. Os mecanismos que levam a hepatotoxicidade são diversos, entre eles comprometimento da β -oxidação de ácidos graxos (FAO), e este, causa esteatose microvesicular podendo evoluir para um estado inflamatório, esteato hepatite e posteriormente uma cirrose, além disso desacoplamento da cadeia de transporte de elétrons pode gerar redução de oxigênio molecular e gerar espécies reativas de oxigênio

(ROS), causando estresse oxidativo sendo evidenciado por níveis reduzidos de GSH e presença de metabólitos lipídicos oxidados (Martinez-Sena et al., 2023).

A *Erioduction californicum*, planta de onde é extraída a esterubina, possui atividade antiinflamatória e através de triagens fenotípicas, foi descoberto que a esterubina também possui. No estudo de Fischer et al., (2019) células microgliais BV-2 foram tratadas com diferentes doses de esterubina e ela reduziu fortemente a produção de NO, IL-6 e IL1 β , bem como os níveis de iNOS e COX2, além de também terem aumentado os níveis nucleares de Nrf2 (fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2) e ATF4 nas células BV-2 sugerindo que um ou ambos esses fatores de transcrição podem ser um alvo comum para seus efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios, além de possivelmente conferir também proteção contra estresse oxidativo, já que o Nrf2 regula a expressão de múltiplas enzimas envolvidas no metabolismo de GSH e proteção contra estresse oxidativo, podendo justificar o fato de sua hepatotoxicidade ser baixa.

Na toxicidade respiratória os resultados também foram muito favoráveis indicando baixa toxicidade para essa propriedade, o que condiz com o fato de que *Eryoction californicum*, é usada para tratar doenças respiratórias, como asma, bronquite, resfriado, tosse e isso se deve a suas propriedades antiinflamatórias já mencionadas, que a esterubina possui, e propriedades expectorantes, além de antioxidantes e antimicrobianas que podem ajudar no combate a infecções e ajudam a fortalecer o sistema imunológico (Viswanathan et al., 2023).

Para genotoxicidade os resultados foram extremamente favoráveis, indicando um perfil muito alto de segurança. Indicadores de genotoxicidade permitem avaliar o efeito da exposição à substância teste, por meio de avaliação de mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA, enzimas relacionadas ao estresse oxidativo estão envolvidas, podendo gerar dano celular inclusive no material genético. Os resultados desse tipo de teste são importantes pois permitem determinar se o uso dessa substância é segura para uso humano e ambiental (Valente et al., 2017).

Em levantamento da literatura feito por Moysés e colaboradores (2023), evidencia que o principal mecanismo de danos ao DNA está relacionado ao estresse oxidativo provocado por radicais livres, estes desencadeiam mecanismos inflamação-doença, assim a esterubina pode ter mostrado bons

resultados relacionados a genotoxicidade pelo fato de conferir proteção contra estresse oxidativo e aumentar alguns fatores que são tidos antioxidantes, conforme estudo de Fischer et al., 2019.

Tabela 4. Mecanismo molecular de efeitos tóxicos da esterubina em interação com receptores através da avaliação *in silico* pelo programa computacional ADMETlab 3.0

Propriedade	Valor	Decisão	Comentário
NR-AhR	0,966		- Receptor de hidrocarboneto aril - Categoria 1: ativos; - Categoria 0: inativos; - O valor de saída é a probabilidade de estar ativo.
NR-AR	0,141		- Receptor andrógeno - Categoria 1: ativos; - Categoria 0: inativos; - O valor de saída é a probabilidade de estar ativo.
NR-Aromatase	0,263		- Receptor aromatase - Categoria 1: ativos; - Categoria 0: inativos; - O valor de saída é a probabilidade de estar ativo.
NR-ER	0,306		- Receptor de estrogênio - Categoria 1: ativos; - Categoria 0: inativos; - O valor de saída é a probabilidade de estar ativo.
SR-ARE	0.792		- Elemento de resposta antioxidante - Categoria 1: ativos; - Categoria 0: inativos; - O valor de saída é a probabilidade de estar ativo.

Fonte: ADMETLab 3.0, 2024, adaptado. *legenda: valores 0-0,1:extremamente desfavorável; 0,1-0,3:desfavorável; 0,3-0,5:moderadamente desfavorável; 0,5-0,7:favorável; 0,7-0,9:muito favorável; 0,9-1,0: extremamente favorável. Cores: ● elevada toxicidade, perfil baixo de segurança; ● média toxicidade, perfil de segurança médio; ●: baixa toxicidade, alto perfil de segurança

O programa ADMETLab 3.0, também trouxe a previsão da toxicidade da esterubina *in silico* de possíveis efeitos tóxicos que ela possa vir a desencadear através de mecanismos moleculares que interajam com diferentes tipos de receptores, um deles é o receptor aril- hidrocarboneto (NR-AhR), esse receptor se caracteriza como um regulador transcricional dependente de ligante e atua modulando diversos genes associados a vários processos biológicos, como ciclo celular, apoptose, resposta imune, migração, ciclo cicardiano, hematopoiese (Quintana; Sherr, 2013). Frente a sinais tóxicos do microambiente a molécula age como um sensor e provoca alterações nas expressões gênicas em células responsivas, pode ainda ser estimulado por diversos ligantes endógenos ou exógenos que são hidrocarbonetos aromáticos sintéticos (dioxinas, dibenzofuranos) ou naturais (carotenoides, flavonoides), sendo ainda intimamente ligado a regulação e controle de imunidade (Evangelista, 2019).

Para o mecanismo molecular envolvendo esse receptor a esterubina se mostrou com toxicidade “pobre” e valor muito favorável para essa condição, mostrando que o mecanismo desencadeado pela esterubina não provoca efeitos tóxicos para esse tipo de receptor e provavelmente não interfere nas suas propriedades, evitando que possa trazer possíveis prejuízos ao organismo.

O receptor de androgênio (AR) medeia a ação dos hormônios sexuais masculinos, a ligação do AR aos seus ligantes nativos 5 α -diidrotestosterona (DHT) e testosterona, inicia o desenvolvimento sexual masculino e a diferenciação e alterações nas funções desses receptores podem estar associados a doenças, uma perda completa na função do AR em homens por exemplo, resulta na síndrome de insensibilidade androgênica, que é a incapacidade parcial ou completa das células de responder aos andrógenos. Já uma atividade aumentada de AR pode induzir uma maior taxa de proliferação celular e que pode influenciar no câncer de próstata que requer andrógenos para crescer e sobreviver e requer que a taxa de proliferação celular seja maior que a de morte celular (Tan et al., 2014).

Para esse receptor a esterubina pode desencadear algum mecanismo molecular que provoque toxicidade com um perfil desfavorável (Tabela 4) com um valor de 0,141, essa toxicidade no entanto pode apresentar interpretações diferentes, por ser uma previsão *in silico* não sabemos ao certo como ela irá agir, podendo ser tóxica suprimindo os receptores e ser ruim tendo possibilidade de desenvolvimento da síndrome de insensibilidade androgênica, ou suprimir os receptores sendo benéfica por exemplo para pacientes que possuem câncer de próstata, onde nesse caso o aumento da atividade dos receptores AR está intimamente relacionado, e uma supressão nesse caso, seria bom para diminuir o aumento da taxa de proliferação celular (Zhang et al., 2022).

Ainda relacionado com os androgênios, está a aromatase (NR-Aromatase), que é uma enzima que catalisa a conversão de androgênios em estrogênios, é amplamente conhecida por seus papéis na reprodução e doenças no sistema reprodutivo, sendo também um alvo para terapias inibidoras em doenças sensíveis a estrogênio, como câncer e endometriose. A expressão da aromatase é mais comumente relacionada à reprodução, mas também é expressa no cérebro do feto e adultos, sendo o estrogênio neuroprotetor, além de também ser importante na homeostase óssea. Alguns estudos com homens com deficiência na aromatase mostraram epífises não fundidas e osteopenia (Blakemore; Naftolin, 2016).

Expressões anormais na aromatase por diversos fatores, pode ter efeitos clínicos, uma ausência completa por exemplo, pode provocar hipogonadismo em mulheres, onde na puberdade ela não desenvolve as características sexuais secundárias e em homens pode causar osteoporose e diminuição da libido. O aumento tardio da aromatase gonadal e da formação de estrogênio leva ao atraso da puberdade, fechamento epifisário tardio e estatura alta, já o aumento precoce da aromatase/estrogênio ovariano resulta na puberdade precoce, incluindo fechamento epifisário precoce e baixa estatura (Blakemore; Naftolin, 2016).

Para este parâmetro a esterubina se mostrou desfavorável, um possível efeito tóxico nesse receptor que pode resultar em alguma expressão anormal e gerar algum efeito clínico, como os citados anteriormente. No entanto,

apesar da limitação para esse receptor alguns ajustes podem ser considerados no sentido de minimizar possíveis efeitos tóxicos, a exemplo encapsulação com nanopartículas poliméricas que podem ser uma maneira promissora de aumentar a concentração local do fármaco, diminuir a toxicidade e efeitos adversos e prevenir interações não específicas (Bhardwaj; Jangde, 2023).

Os receptores de estrogênio (NR- ER), pertencem a família de receptores nucleares e são amplamente distribuídos no organismo em tecidos do córtex cerebral, tireoide, próstata, pulmão, ossos, mama, ovário, em conjunto com a aromatase que faz a conversão do androgênio em estrogênio, é um receptor bastante importante, principalmente na função dos tecidos do sistema reprodutivo, ajudando ainda a manter a densidade óssea e agindo como cardioprotetor, sendo um aumento ou déficit desse receptor influencia diretamente nos hormônios estrógenos e pode trazer uma série de consequências para o homem, bem semelhantes aos problemas relatados com a enzima aromatase (Sales et al., 2014).

Para esse receptor a esterubina apresentou resultado moderadamente desfavorável, com um valor que não está bom para ser ideal, mas o nível de limitação é menor. Não impede seu uso, por exemplo, mas apresenta um nível moderado de toxicidade.

O programa ADMETlab 3.0 também trouxe a predição da esterubina para o elemento de resposta antioxidante (SR-ARE), esses elementos são bem estabelecidos como reguladores da homeostase redox e ativadores de citoproteção durante estresse oxidativo, atuando também regulando metabolismo de carboidratos, inflamação, cognição, metabolismo de ferro, lipídico e remodelação de tecidos (Raghunath et al., 2018).

Para esse receptor a esterubina se mostrou favorável, com toxicidade baixa, onde provavelmente não interfere no mesmo e não são necessárias grandes mudanças para o composto, esse resultado apresentado na tabela 4 reforça a atividade antioxidante da esterubina, mostrado em estudo realizado por Kazmi, e colaboradores (2023), onde mostrou que ela apresenta atividade neuroprotetora e altera estresse oxidativo, restaurando os níveis

antioxidantes, diminuindo peroxidação tecidual e aumentando níveis de SOD, GSH e CAT.

5.3 Efeitos da esterubina no teste *in vitro* de hemólise

Os eritrócitos são amplamente utilizados para estudos de citotoxicidade *in vitro* pois são de fácil acesso e disponibilidade, e permite avaliar os efeitos citotóxicos da substância teste pela ocorrência ou não de atividade hemolítica que pode ser diretamente correlacionada com sua citotoxicidade. Essa ação hemolítica pode ser atribuída a diversos mecanismos não específicos como compostos surfactantes que produzem efeito hemolítico pela solubilização da membrana plasmática do eritrócito, ou a lise osmótica, as saponinas por exemplo exercem esse efeito hemolítico causando uma deformação na membrana e consequente extravasamento do conteúdo intracelular (Xavier et al., 2021). Compostos fenólicos, por exemplo, podem provocar hemólise por meio da oxidação da hemoglobina (Pequeno; Soto-Blanco, 2006).

Ao observar as amostras após a incubação e posterior centrifugação, as suas características visuais podem ser observadas, onde no controle negativo, o sobrenadante permanece transparente, sem sinais de hemólise, caracterizando a integridade dos eritrócitos, já no controle positivo, o sobrenadante apresenta tonalidade avermelhada, caracterizando ação hemolítica (Figura 7).



Figura 7. Visualização das amostras da solução de eritrócitos e esterubina após centrifugação no teste de hemólise *in vitro*.

Fonte: Arquivo pessoal. *Legenda: A3- controle negativo (solução salina), B3- controle positivo (solução detergente), C3-esterubina 1mg/ml, D3- esterubina 0,1mg/ml, E1- esterubina 0,01mg/ml.

Para avaliar os efeitos da atividade hemolítica da esterubina onde utilizou-se eritrócitos de mamífero, conforme metodologia, observou-se que em todas as concentrações analisadas a porcentagem de hemólise foi menor que 10%, demonstrando assim que a substância não induz ruptura dos eritrócitos (Figura 8).

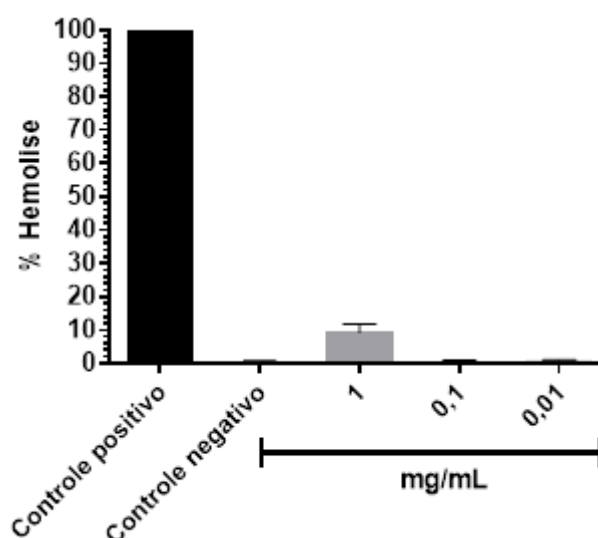


Figura 8. Verificação da toxicidade da esterubina no teste *in vitro* de hemólise em eritrócitos de mamíferos *Canis lupus familiaris*

Diferentes espécies utilizadas possuem variações nos limites de hemólise que são considerados aceitáveis (aproximadamente 10% para humanos, 10%–29% para cães e 0%–37% para coelhos). Os valores de 10% e 25% de hemólise são comumente considerados como referências: uma hemólise inferior a 10% é classificada como não hemolítica, enquanto valores superiores a 25% são considerados hemolíticos permitindo assim avaliar uma substância quanto ao seu uso, principalmente se é segura já que altos índices de hemólise limitam seu uso (Moreno et al., 2024).

Nesse caso a esterubina se mostrou segura em todas as doses testadas, com porcentagem de hemólise menor que 10%. Os flavonoides são metabólitos secundários pertencentes a classe dos polifenóis e segundo Pequeno e Soto-Blanco (2006) compostos fenólicos, podem provocar hemólise por meio da oxidação da hemoglobina, levando a hipótese que possivelmente a

esterubina não provoque hemólise pelas suas propriedades antioxidantes que já foram evidenciadas em estudos como o de Kazmi e colaboradores (2023), que ressaltam seu potencial neuroprotetor e suas propriedades antioxidantes diminuindo nível de peroxidação lipídica e aumentando níveis de marcadores antioxidantes como GSH (glutathiona), CAT (capacidade antioxidante total) e SOD (superóxido dismutase).

Os resultados corroboram com um estudo feito com extrato de sementes de *Lepidium sativum* que apresenta um alto teor de flavonoides fração mostrou a atividade citotóxica em teste de hemólise *in vitro* em diferentes concentrações testadas 1, 25, 50 e 100 mg/ml, o efeito hemolítico das sementes no teste mostrou que elas são seguras, exercendo um efeito tóxico muito fraco, se mostrando não hemolítica nas concentrações de 1 e 25 e com taxa menor que 15% na concentração de 50 mg/ml e de 30% na de 100 mg/ml (Ouattar et al., 2022).

5.4 Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT

O ensaio MTT é útil e amplamente utilizado para avaliação de atividade metabólica, funcionalidade de mitocôndrias e determinar citotoxicidade de substâncias auxiliando por exemplo, na possível descoberta de compostos farmacologicamente promissores. Esse ensaio baseia-se na comprovação de citotoxicidade através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais e do seu potencial redox, a viabilidade é quantificada pela redução do MTT a formazan, somente células viáveis conseguem converter o sal MTT (Bochnie; Gregório; Maciel, 2016).

A citotoxicidade foi realizada contra as células L929 (fibroblastos de camundongos) e B16F10 (melanoma murino). Em L929, a substância reduziu a viabilidade celular de forma significativa a partir da concentração de 1,56 µg/mL, enquanto para B16F10 reduziu a partir da concentração de 6,25 µg/mL ambos comparados ao controle negativo (Figura 9). Os valores de IC₅₀ para as duas linhagens (L929 e B16F10) foram, respectivamente, 37,91 µg/mL (27,86 a 48,85 µg/mL), 15,07 µg/mL (12,55 a 18,10 µg/mL).

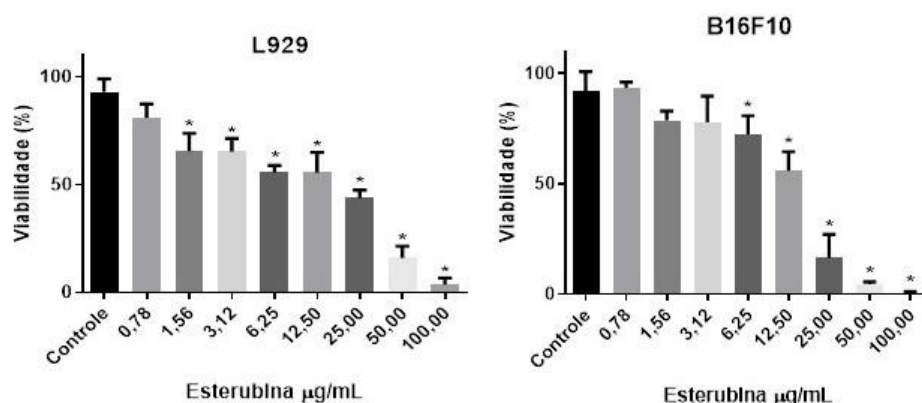


Figura 9. Efeitos da citotoxicidade de Esterubina sobre as linhagens celulares B16F10 e L929. *p <0,05 comparado ao controle negativo.

O melanoma é um tipo de câncer de pele considerado maligno e que a incidência tem aumentado nos últimos anos, é caracterizado por ter uma alta predisposição a se espalhar e evoluir rapidamente para metástase o que pode levar a morte da maioria dos pacientes que possuem esse tipo de câncer (Xie et al, 2022). A esterubina foi avaliada quanto à citotoxicidade em células normais e quanto à capacidade de inibir a proliferação de linhagens celulares de melanoma. O índice seletivo (IS) é frequentemente utilizado para avaliar a toxicidade diferencial de um composto, que é determinada como uma razão entre os valores IC_{50} de células normais e cancerosas. Um valor de IS menor ou igual a 2 sugere a toxicidade geral do composto puro nas células (Badisa et al., 2014).

A esterubina apresentou atividade citotóxica com um valor de IC_{50} 37,91 µg/mL (27,86 a 48,85 µg/mL), em células L929 e um valor de IC_{50} de 15,07 µg/mL (12,55 a 18,10 µg/mL) em células B16F10, apresentando um índice de seletividade no valor de 2,5. A partir de de 1,56 µg/mL a esterubina exibiu uma redução significativa de células normais, enquanto uma diminuição significativa de melanoma viáveis só começou a aparecer a uma concentração de 6,25 µg/mL.

De um modo geral a esterubina mostra ação citotóxica nas células normais e células de melanoma, com eficácia em reduzir a viabilidade quando comparadas ao controle negativo assim como também o valor de IC_{50} (concentração que inibe 50% das células) de 15,07 µg/mL (12,55 a 18,10 µg/mL)

em células B16F10, mostrando também um bom potencial em reduzir a viabilidade desse tipo de célula. Apresenta um índice de seletividade no valor de 2,5, um IS maior que 2 qualifica o composto como mais seletivo para as linhagens tumorais, ou seja, eliminando o dobro de células tumorais frente as células normais (Teixeira, 2023).

Os dados corroboram com estudo feito por Militão, 2005, que testou atividade antitumoral de diferentes tipos de flavonoides em diferentes células tumorais, incluindo melanoma, o estudo mostrou a quercetina, luteolina e apigenina como mais potentes para redução de viabilidade celular do que compostos como galangina e crisina e sugere que a diferença entre os tipos de flavonoides, de um ser mais potente que outro com relação a citotoxicidade, pode ser devido a mudanças de grupos funcionais em determinadas posições de anéis a exemplo citado no estudo, apigenina ser mais ativa que a acacetina e a diferença entre as duas ser uma hidroxila no lugar da metoxila em C4.

Em outro estudo feito com diferentes tipos de flavonas a eupafolina reduziu viabilidade celular em de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$ chegando a 80% na maior dose e as flavonas apigenina e luteolina reduziram em 40 e 75% respectivamente, a viabilidade celular das células de melanoma murino na dose de 200 $\mu\text{mol/L}$. Confirmando assim, o amplo espectro de atividades biológicas que os flavonoides exercem, como atividade antioxidante, e efeitos quimiopreventivos, com inibição de progressão e tumores através de diferentes tipos de mecanismos, entre eles, aqueles envolvendo a modificação de enzimas que ativam ou detoxificam carcinógenos e aqueles relacionados à alteração de vias de sinalização celular. Além do que com bons resultados de toxicidade permite que a esterubina seja utilizada com mais segurança para futuros testes *in vivo* (Herrerias, 2009).

5.5 Teste de toxicidade *in vivo* com larvas de *Zophobas morio*, Tenebrio Gigante

O teste de toxicidade feito com larvas de *Zophobas morio*, tenébrio gigante, é um modelo de teste que utiliza um invertebrado e não necessita de aprovação prévia no comitê de ética, sendo reconhecido como uma abordagem válida para avaliar toxicidade e uma alternativa pra reduzir o uso de animais

vertebrados nos testes (Campelo et al., 2024). Nos testes realizados foram feitas quantificação do teor de melanização e taxa de sobrevivência das larvas frente à substância testada em diferentes concentrações e aos controles positivo e negativo.

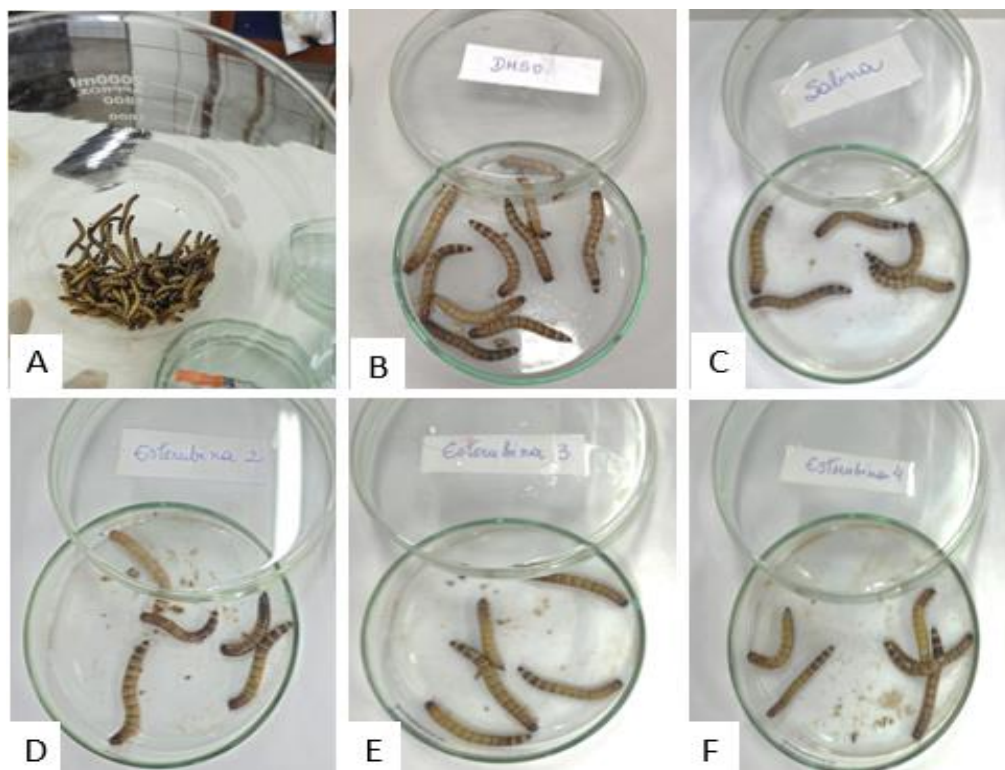


Figura 10. Registro fotográfico de larvas de *Zophobas morio* para verificação de melanização.

Fonte: Arquivo pessoal. Legenda: A: Larvas *Zophobas morio*; B: Grupo DMSO (controle positivo); C: Grupo Salina (controle negativo); D: Grupo esterubina 300mg/kg; E: Grupo esterubina 30mg/kg; F: Grupo esterubina 3mg/kg.

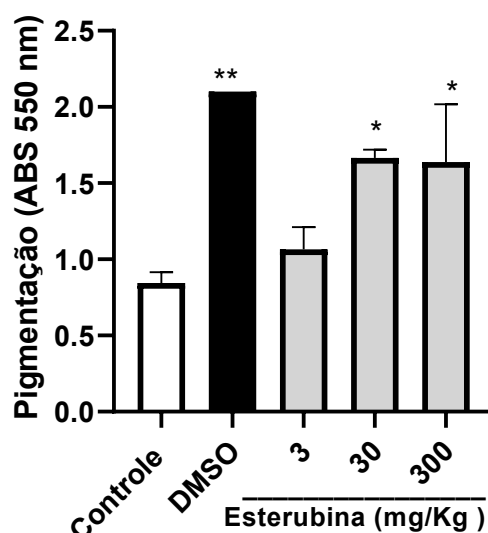


Figura 11. Avaliação da toxicidade *in vivo* da esterubina através do teor de melanina em larvas de *Zophobas morio*.

A figura 11 traz as concentrações de melaninas encontradas após homogeneização e leitura das larvas.

Os resultados relacionados a melanina dizem respeito ao estresse oxidativo que é um desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade natural dos organismos de desintoxicar naturalmente dessas espécies (Campelo et al., 2024).

Através do gráfico podemos ver que o DMSO apresentou maior porcentagem de melanização como esperado, por ser o controle positivo e ser tóxico para larvas de *Zophobas morio*. Nas doses testadas a de 3mg/kg não apresentou valores significativos de melanização, se mostrando segura, enquanto as de 30 e 300mg/kg apresentaram maior teor de pigmentação e consequente melanização, mostrando uma maior elevação na resposta imune e uma maior resposta tecidual a essas concentrações. Essa maior resposta tecidual é compreensível como sendo um indicador de maior atividade biológica, mediada seja por maior atividade farmacológica ou toxicológica (Coelho et al., 2023).

A quantificação da expressão da melanização pode também ser um indicativo de um processo inflamatório, os níveis de melanina quando expressos

podem ser reportados como responsáveis pela liberação de cortisol que é proveniente de uma resposta do organismo relacionada ao stress (Neta, 2022). Sendo então esse modelo experimental sugestivo para avaliar um processo inflamatório, a inflamação é considerada uma resposta generalizada específica, porém estimulam resposta locais e sistêmicas recrutando células fagocitárias e auxiliando na remoção de material endógeno e exógeno (Sousa et al., 2021).

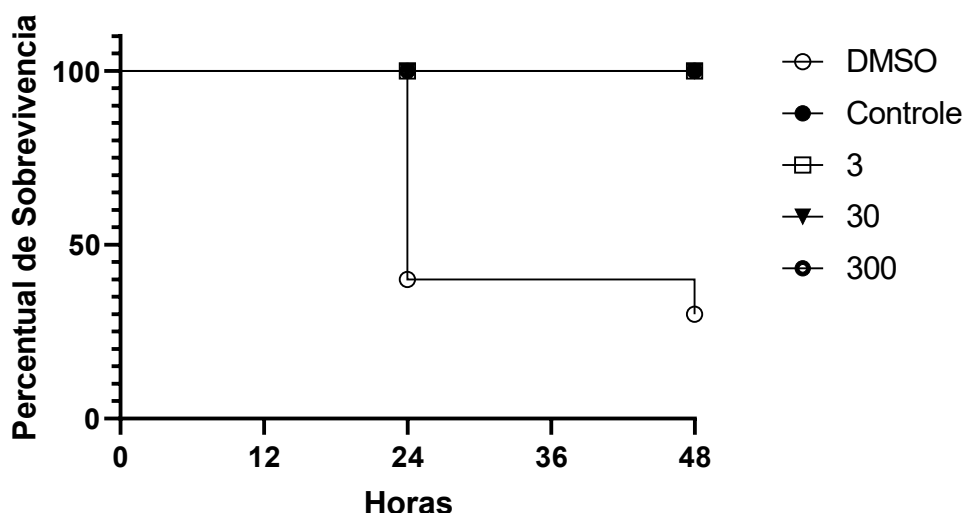


Figura 12. Percentual de sobrevivência de larvas de *Zophobas morio* expostas a diferentes doses de esterubina através de teste de toxicidade *in vivo*.

O uso de larvas de *Zophobas morio* tem crescido os últimos anos por ser um modelo alternativo, de fácil manuseio e criação, e serem úteis para avaliar parâmetros como toxicidade e patogenicidade. Os estudos toxicológicos, que são o foco do trabalho, têm como principal objetivo prever possíveis efeitos adversos que a substância possa vir a provocar quando for testada *in vivo* em animais ou em humanos (Ribeiro, 2021).

O gráfico de sobrevivência (Figura 12) diz respeito a quantidade de larvas que permaneceram vivas após o período de 48 horas. O que pôde ser observado, é que no controle negativo que é a solução salina, a porcentagem de sobrevivência permaneceu em 100% nas 24 e 48h, mostrando que não houve morte das larvas, enquanto o controle positivo, DMSO, o percentual de sobrevivência nas primeiras 24h, é de 40% e ao final nas 48h, ele cai mais um pouco para 30%, mostrando ser uma substância tóxica para as larvas. Com

relação as doses testadas, as doses de 3, 30 e 300 mg/kg, obtiveram bons resultados não sendo observada morte das larvas em nenhuma das doses, e o valor se assemelhando ao controle negativo, solução salina, mostrando assim que as doses testadas são seguras.

Apesar da melanização que ocorreu nas doses de 30 e 300 mg/kg, a taxa de sobrevivência foi de 100%, não ocorrendo nenhuma morte, isso mostra que a substância ativa o sistema imune, já que a melanização é um dos principais elementos de defesa dessas larvas, porém, consegue ser metabolizada e eliminada não provocando morte dos mesmos (Sousa et al., 2023).

O que corrobora com vários dados relacionados a toxicidade previsto pelo ADMETlab 3.0, que traz um bom perfil de segurança e baixa toxicidade em parâmetros considerados essenciais para manutenção dos organismos como para genotoxicidade, hepatotoxicidade, e com relação a toxicidade oral aguda em ratos, onde um bom perfil, indica baixa probabilidade de causar danos agudos em organismos vivos (Cunha et al., 2013), além do que alguns estudos como o de Meotti (2006), a DL50 de isoflavonas em ratos foi de 2g/kg administrada intravenosa e em tratamento crônico, mostrando que flavonoides podem gerar algum dano, mas em quantidades bem elevadas e em um possível tratamento crônico.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto no estudo, a esterubina se apresenta como uma substância promissora, seus parâmetros físico-químicos estão dentro dos valores esperados, mostrando afinidade lipofílica e boa capacidade de atravessar membranas.

Com relação a previsão dos parâmetros de toxicidade, a maioria dos resultados foram considerados favoráveis e com condições próximas ao ideal, merecendo atenção parâmetros como carcinogenicidade, e mecanismos que podem desencadear resposta tóxica em alguns receptores como androgênico e aromatase em que ela se mostra desfavorável.

Nos ensaios *in vitro* apresentou resultados favoráveis considerada não hemolítica e com capacidade de reduzir viabilidade em células de melanoma, e nos testes *in vivo* apresentando excelente sobrevivência em doses maiores proporcionando maior segurança para futuros testes que possam ser realizados.

REFERENCIAS

Allen, D. S.; Wiencek, M. M.; Kelly, M. M.; Solomons, K. S.; Jeffries, M. K. S. Exploring Alternatives for Marine Toxicity Testing: Initial Evaluation of Fish Embryo and Mysid Tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Volume 43, Issue 6, 1 June 2024, Pages 1285–1299. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5862>.

Al Aboody, M. S.; Mickymaray, S. Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. *Antibiotics*, 2020. Doi: [10.3390/antibiotics9020045](https://doi.org/10.3390/antibiotics9020045).

Al-Khayri, J. M.; Sahana, G. V.; Nagella, P.; Joseph, B. V.; Alessa, F. M.; Ai-Mssalem, M. Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. **Molecules**, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>.

Almeida, C. P. S. **Estudo do potencial antimutagênico de flavonoides pelo ensaio bacteriano de mutação reversa** (teste de ames). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmacêutico- bioquímico), Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2013.

Alves, M. S.; Streit, L.; Pizzolato, T. M. Utilização de modelos *in silico* para avaliação da toxicidade de resíduos de agrotóxicos, fármacos e metabólitos em águas naturais. **Química Nova**, 2023. Doi: [10.21577/0100-4042.20230062](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230062)

Andrés, A.; Rosés, M.; Ráfaols, C.; Bosch, E.; Espinosa, S.; Segarra, V.; Huerta, J. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (log *D*) from low drug amounts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol 76, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.008>

Badisa, R. B.; Mina, D. A.; Latinwo, L. M.; Soliman, K. F. Selective anticancer activity of neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium on non-small cell lung adenocarcinoma A549 cells. **Anticancer research**, 34(10), 5447–5452. 2014. PMCID: [PMC4185426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264185426/).

Badshah, S. L.; Faisal, X.; Muhammad, A.; Poulson, B. G.; Emwas, A. H.; Jaremko, M. Antiviral activities of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Volume 140, August, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111596>.

Batista, F. A.; Fontele, S. B. C.; Santos, L. K. B.; Filgueiras, L. A.; Nascimento, S. Q.; Sousa, J. M. C.; Gonçalves, J. C. R.; Mendes, A. N. Synthesis, characterization of α -terpineol-loaded PMMA nanoparticles as proposed of therapy for melanoma. **Materials Today Communications**, 22. 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.100762>.

Bhardwaj, H.; Jangde, R. K. Current updated review on preparation of polymeric nanoparticles for drug delivery and biomedical applications. *Next Nanotechnology*. Vol 2, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nxnano.2023.100013>.

Bednarczuk, V. O.; Verdam, M. C. S.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, Jul. - Dez./2010. Doi: <https://doi.org/10.5380/acd.v11i2.21366>.

Blakemore, J.; Naftolin, F. Aromatase: Contributions to Physiology and Disease in Women and Men. **Physiology**, vol. 31, ed. 4, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1152/physiol.00054.2015>

Bochnie, K. A.; Gregório, P. C.; Maciel, R. A. P. Análise da viabilidade celular por mtt em células tratadas com toxinas urêmicas – revisão. **Cad. da Esc. de Saúde**, Curitiba, V.1 N.15, 2016.

Borges, L. P.; Amorim, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

Bozac, M. U.; Poljua, D.; Dudas, S.; Bilic, J.; Sola, I.; Mikulic-Petkosevsek, M.; Sladonja, B. Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Invasive *Solidago canadensis* L.: Potential Applications in Phytopharmacy. **Plants**, 2024. Doi: [10.3390/plants14010044](https://doi.org/10.3390/plants14010044).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC 24 de 14 de junho de 2011.

Breuss, J. M.; Atanasov, A. G; Uhrin, P. Resveratrol and Its Effects on the Vascular System. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019. Doi: [10.3390/ijms20071523](https://doi.org/10.3390/ijms20071523)

Brianezi, G.; Camargo, J. L. V.; Miot, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442009000400010>

Brook, K.; Bennett, J.; Desai, S. P. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. **Journal of Anesthesia History**. Vol 3, ed 2, 2017. Doi: [10.1016/j.janh.2017.02.001](https://doi.org/10.1016/j.janh.2017.02.001)

Buraco, K. L.; Williams, R. J. Flavonoids as an Intervention for Alzheimer's Disease: Progress and Hurdles Towards Defining a Mechanism of Action. **Brain Plasticity**. 2021. Doi: [10.3233/BPL-200098](https://doi.org/10.3233/BPL-200098).

Caboclo, E. K. D.; Sousa, A. R.; Santos, J. B.; Castro, L. S.; Bordin, A. R.; Lisvoa, H. C. F. Fitoterápicos e plantas medicinais na prática dos profissionais de saúde em Unidades de Estratégia Saúde da Família. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. Salvador, v. 21, n. 2, p. 211-217, maio/ago, 2022. Doi: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v21i2.47704>.

Caccia- Bava, M. C. G. G.; Bertoni, B. W.; Pereira, A. M. S.; Martinez, E. Z. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ).

Rev. Ciencia e Saúde Coletiva, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1590/1413-81232017225.16722015>

Campelo, J. E. S.; Nascimento, M. O.; Carvalho, A. L. M.; Santos, H. S. P.; Almeida, J. O. C. S.; Alves, M. M. M.; Arcanjo, D. D. R.; Neto, J. M. T.; Muratori, M. C. S.; Costa, A. P. R. Evaluation of the acute toxicity of ellagic acid and gallic acid incorporated in Poloxamer407® gel, in *Zophobas morio* larvae. **Toxicology in Vitro**, vol 95, 2024. Doi: [10.1016/j.tiv.2023.105727](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105727).

Campos, S. C.; Silva, C. G.; Campana, P. R. V.; Almeida, V. L. Toxicity of plant species. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.373-382, 2016. Doi: https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_057

Cao, L.; Wang, J.; Zhang, Y.; Tian, F.; Wang, C. Osteoprotective effects of flavonoids: Evidence from *in vivo* and *in vitro* studies (Review). **Molecular Medicine Reports**. Vol 25, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12716>.

Cao, D., et al. Admetlab 3.0. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, 2024. Disponível em: <https://admetlab3.scbdd.com/>.

Carvalho, M. T. B.; Araujo Filho, H. G.; Barreto, A. S.; Quintans- Junior, L. J.; Quintans, J. S. S.; Barreto, R. S. S. Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. **Phytomedicine**. Vol 20, 2021. Doi: [10.1016/j.phymed.2021.153636](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153636).

Carvalho, T.; Miucci, M. A.; Froes, G.; Oliveira, C. R.; Santos, S. A. Testes Para Avaliação De Genotoxicidade Com Allium Cepa: Estado Da Arte. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. Ano 03, Ed. 12, Vol. 03, pp. 131-139, 2018. ISSN:2448-0959.

Coêlho, A. G.; Almeida, J. O. C. S.; Santos, A. A.; Santos, W. R. P.; Sousa, L. R.; Viana, N. R.; Batista, F. A.; Neta, M. S. B.; Santos, A. S.; Da Silva, S. W.; De Souza, P. E. N.; Nobre, A. R. A.; Neto, J. S. L.; Citó, A. M. G. L.; Carvalho, F. A. A.; Alves, M. M. M.; Lucarini, M.; Durazzo, A.; Mendes, A. N.; Arcanjo, D. D. R. Solid Lipid Nanoparticles from *Platonia insignis* Seeds, a Brazilian Amazon Fruit: Characterization, In Vitro and In Vivo Toxicological and Antioxidant Activities. **Journal of Composites Science**, 2023. Doi: <https://doi.org/10.3390/jcs7090368>

Costa, M. F. **Análise dos métodos *in silico* frente à estudos in vivo: Uma revisão integrativa**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, Rio de Janeiro, 2022.

Cunha, L. C.; Melo, D. F. A.; Pereira, M. E.; Melo, D. S.; Parente, L. L.; Silva, M. A. C.; Conceição, E. C.; Gonzaga, L. Q. S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2013. ISSN 1808-4532.

Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 3 mar. 2017. Doi: [10.1038/srep42717](https://doi.org/10.1038/srep42717).

Dellatore, C. P.; Siqueira, P. **Avaliação da toxicidade de metais em *Daphnia magna***. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Processos Ambientais). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Curitiba – PR, 2015.

Denny, K. H., Stewart, C. W. Acute, Sub-acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. In Faqi, A, S. **A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development**. 2ª Edição. Amsterdã. Editora Elsevier. pp. 109-127, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00005-0>.

Dhiany, R.; Srivastava, S. K.; Shankar, K.; Ghosh, T.; Beniwal, A.; Navani, N. K. A chemical genetic approach using genetically encoded reporters to detect and assess the toxicity of plant secondary metabolites against bacterial pathogens. **Journal of Hazardous Materials**, Vol. 418, 15 September, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126399>.

Dias, M. C.; Pinto, D. C. G. A.; Silva, A. M. S. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. **Molecules**. 2021. Doi: [10.3390/molecules26175377](https://doi.org/10.3390/molecules26175377).

Disner, G. R.; Silva, L. F. O.; Kitamura, R. S. A. Toxicologia ambiental: abordagens sobre a qualidade do meio ambiente. In: Godinho, M. B. C., et al. **X Semana da Biologia UFABC**, Universidade Federal do ABC, 2022, pag 67-73.

Dresler, S.; Szymczak, G.; Wójcik, M. Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the Boraginaceae Family. **Pharmaceutical Biology**, vol. 55, no. 1, 691–695, 2017. Doi: [10.1080/13880209.2016.1265986](https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1265986)

Duarte, C. R. A. **Avaliação da citotoxicidade in vitro decomposições de fosfato de cálcio para uso em reparação óssea**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, 2015.

Evangelista, L. S. M. **Papel do receptor aril-hidrocarboneto na atividade imunomoduladora das células-tronco mesenquimais utilizando um modelo de lesão renal aguda**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de São Paulo-Unifesp. São Paulo, 2019.

Fischer, W.; Currais, A.; Liang, Z.; Pinto, A.; Maher, P. Old age-associated phenotypic screening for Alzheimer's disease drug candidates identifies sterubin as a potent neuroprotective compound from Yerba santa. **Redox Biol**. 2019. Doi: [10.1016/j.redox.2018.101089](https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101089).

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>

Fratini, F.; Ciurli, L.; Forzan, M.; Kaboudari, A.; Copelotti, E.; Paci, G.; Mancini, S. Contamination of *Zophobas morio* Larvae Rearing Substrate with *Listeria monocytogenes*: A Preliminary Study. **Animals**. 2023. Doi: [10.3390/ani13071198](https://doi.org/10.3390/ani13071198)

Fonseca, R. S.; Oliveira, A. F. M.; Martins, I. V. F.; Donatele, D. M.; Oliveira, F. A.; Quirino, C. R. Efeitos da torta de neem no controle alternativo de nematoides gastrintestinais em ovinos: Revisão. **Pubvet**. V.13, n.4, a304, p.1-12, Abr., 2019. Doi: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a304.1-11>.

Ford, K. A. Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Toxicity Tests by Computational Methods. **ILAR Journal**, Volume 57, Issue 2, 1 December 2016, Pages 226–233. Doi: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw031>.

Fu, L.; Shi, S.; Yi, J.; Wang, N.; Ele, Y.; Wu, Z.; Peng, J.; Deng, Y.; Wang, W.; Wu, C.; Lyu, A.; Zeng, X.; Zhao, W.; Hou, T.; Cao, D. ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. **Nucleic Acids Research**. Volume 52, edição W1, Pag W422–W431 5 Julho, 2024. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae236>.

Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021. Doi: [10.3390/ijms222312827](https://doi.org/10.3390/ijms222312827)

Garla, A.; Gruener, T. H.; Oliveira, L. F.; Limeira, D. M. Protocolos e metodologias do ensaio cometa em peixes: uma revisão sistemática da literatura. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 15, n. 3, p. 01-16, 2022. Doi: <http://dx.doi.org/10.18316/rca.v16i2.8376>.

Gautam, S.; Lapcik, L.; Lopiciková, B. Pharmacological Significance of *Boraginaceae* with Special Insights into Shikonin and Its Potential in the Food Industry. **Foods**, 2024. DOI: [10.3390/foods13091350](https://doi.org/10.3390/foods13091350).

Gluck, J.; Buhrke, T.; Frenzel, F.; Braeuning, A.; Lampen, A. *In silico* genotoxicity and carcinogenicity prediction for food-relevant secondary plant metabolites. **Food and Chemical Toxicology**, vol 112, parte B, Pag. 298-306, 2018. Doi: [10.1016/j.fct.2018.04.024](https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.04.024).

Guan, L, P.; Liu, B. Y. Antidepressant-like effects and mechanisms of flavonoids and related analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Vol 121, 2016. Doi: [10.1016/j.ejmech.2016.05.026](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.026).

Herrerias, T. **Efeitos de flavonoides sobre o metabolismo mitocondrial e suas implicações na viabilidade e apoptose de células de melanoma**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Paraná- UFPR, Curitiba- PR, 2009.

Hofmann, J.; Fayez, S.; Scheiner, M.; Hoffmann, M.; Oerter, S.; Appelt-Menzel, A.; Maher, P.; Maurice, T.; Bringmann, G.; Decker, M. Sterubin: Enantioresolution and Configurational Stability, Enantiomeric Purity in Nature, and Neuroprotective Activity in Vitro and in Vivo. **Chemistry**, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1002/chem.202001264>.

Huang, W.; Yan, Z.; Li, D.; Ma, Y.; Zhou, J.; Sui, Z. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Blueberry Anthocyanins on High Glucose-Induced Human Retinal Capillary Endothelial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2018. Doi: [10.1155/2018/1862462](https://doi.org/10.1155/2018/1862462).

Ilhan, A.; Youlcu, U.; Oztas, E.; Erdem, U. Therapeutic effects of proanthocyanidin and coenzyme Q10 on nitrogen mustard-induced ocular injury. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 2018. Doi: <https://doi.org/10.5935/0004-2749.20180045>.

Janabi, A. H. W.; Kamboh, A. A.; Saeed, M.; Xiaoyu, L.; Bibi, J.; Majeed, F.; Naeed, M.; Mughal, M. J.; Korejo, N. A.; Kamboh, R.; Alagawany, M.; Lv, H. Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 2020. Doi: [10.22038/IJBMS.2019.35125.8353](https://doi.org/10.22038/IJBMS.2019.35125.8353).

Kazmi, I.; Al-Abbasi, F. A.; Afzal, M.; Nadeem, M. S.; Altaib, H. N. Sterubin protects against chemically-induced Alzheimer's disease by reducing biomarkers of inflammation- IL-6/ IL-1 β / TNF- α and oxidative stress- SOD/MDA in rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2023. Doi: [10.1016/j.sjbs.2023.103560](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103560).

Kotha, R.; Luthria, D. L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. **Molecules**, 2019. Doi: [10.3390/molecules24162930](https://doi.org/10.3390/molecules24162930).

Lavandeira, F. M. F. **Ensaios toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto- PT, 2014.

Levan A. The effect of colchicines on root mitoses in Allium. **Hereditas**. XXIV, p 471-486, 1938. Doi: [10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x).

Liang, Z.; Maher, P. Structural Requirements for the Neuroprotective and Anti-Inflammatory Activities of the Flavanone Sterubin. **Antioxidants**, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/antiox1112197>

Li, Y.; Kong, D.; Fu, Y.; Sussman, M. R.; Wu, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. Vol. 148, p. 80-89, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>.

Li, Z.; Wang, Y.; Xu, M.; Liu, H.; Li, L.; Xu, D. Molecular mechanism overview of metabolite biosynthesis in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. Vol. 204, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108125>.

Maher, P.; Fisher, W.; Liang, Z.; Soriano- Castell, D.; Pinto, A. F. M.; Rebman, J.; Currais, A. The Value of Herbarium Collections to the Discovery of Novel Treatments for Alzheimer's Disease, a Case Made With the Genus *Eriodictyon*. **Frontiers in Pharmacology**. Vol 11, 2020. Doi: [10.3389/fphar.2020.00208](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00208).

Martinez, J. P. Q.; Campos, M. R. S. Flavonoids as a therapeutic option for the treatment of thrombotic complications associated with COVID-19. **Phytotherapy Research**, 2022. Doi: [10.1002/ptr.7700](https://doi.org/10.1002/ptr.7700).

Martinez-Sena, T.; Moro, E.; Moreno-Torres, M.; Quintás, G.; Hengstler, J.; Castell, J. V. Metabolomics-based strategy to assess drug hepatotoxicity and uncover the mechanisms of hepatotoxicity involved. **Archives of Toxicology**, 2023. Doi: 10.1007/s00204-023-03474-8.

Matos, A. L.; Bruno, D. F.; Ambrósio, A. F.; Santos, P. F. The Benefits of Flavonoids in Diabetic Retinopathy. **Nutrients**, 2020. Doi: [10.3390/nu12103169](https://doi.org/10.3390/nu12103169).

Melo, C. S.; Junior, A. S. C.; Fialho, S. L. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, vol 33, n 4, pag 469-477, 2012. ISSN 1808-4532.

Mendes, A. N.; Filgueiras, L. A.; Siqueira, M. R. P.; Barbosa, G. M.; Holandino, C.; Moreira, D. L.; Pinto, J. C.; Nele, M. Encapsulation of Piper cabralanum (Piperaceae) nonpolar extract in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of increase in the effectiveness of antileukemic activity in K562 cells. **International Journal of Nanomedicine**, Volume 12, 8363–8373, 2017. Doi: 10.2147/IJN.S134756.

Meotti F.C. **Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: Estudos in vivo e in vitro**. Tese (Doutorado em Bioquímica Toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Santa Maria - RS, Brasil, 2006.

Meyer, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

Militão, G. C. G. **Potencial antitumoral de flavonoides isolados de plantas do nordeste brasileiro: estudos preliminares da relação estrutura atividade citotóxica**. Dissertação (mestrado em farmacologia). Universidade Federal do Ceará- UFC, Fortaleza- CE, 2005.

Moraes, G. V.; Jorge, G. M.; Gonzaga, R. V.; Dos Santos, D. A. Potencial antioxidante dos flavonoides e aplicações terapêuticas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36225>.

Moreno, T. J. C., et al. Avaliação da atividade hemolítica do extrato da casca da *Punica granatum* L. **XXVIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XXIV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e XIV Encontro de Iniciação à Docência** - Universidade do Vale do Paraíba – 2024.

Mounanga, M. B.; Mewono, L.; Angone, S. A. Toxicity studies of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol 194, p. 618-627. 2015.

Moura, N. S.; Ferreira, N. S.; Resende, J. A.; Ignacchi, M. D. C. Ensaios toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15, 2012.

Moura, E. P. **Estudo *in silico* de flavonoides e compostos análogos pertencentes à família Asteraceae contra a Doença de Alzheimer.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba- UFPB. João Pessoa – PB, 2021.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** 1983. Doi: [10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Moysés, D. A., Galucio, N. C. R., Barbosa, W. S., Rodrigues, I. L., Santos, J. L. B., Vale, V. S., Terra, I. A., Correa, R. M. S. Indução de genotoxicidade por medicamentos sintéticos anti-hipertensivos: uma revisão sobre o risco à saúde e ensaios de detecção de danos ao DNA. **Revista Científica Multidisciplinar.** Vol 4, n 12, 2023. Doi: <https://doi.org/10.47820/recima21.v4i12.4536>

Nyakudya, T. T.; Tshabalala, T.; Dangarembizi, R.; Erlwanger, K. H.; Ndhalala, A. R. The Potential Therapeutic Value of Medicinal Plants in the Management of Metabolic Disorders. **Molecules**, 2020. Doi: [10.3390/molecules25112669](https://doi.org/10.3390/molecules25112669).

Neta, M. S. B. **Avaliação e caracterização de c-dots com oleos essenciais de cravo, citronela e laranja para aplicações biológicas – um estudo com larvas de *Zophobas morio*.** Tese (Doutorado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, UnB, Brasília, p. 63-66, 2022.

Ogasawara, M. S. **Métodos alternativos ao uso de animais na avaliação toxicológica de substâncias químicas para fins de registro.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em farmácia - bioquímica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), 2019.

Oliveira, R. S.; Lucas, C. P.; Antonucci, G.; Silva, F. C. Compostos bioativos naturais: agentes promissores na redução do estresse oxidativo e processos inflamatórios. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological.** Vol 5, n 2, p 258-273, 2018. ISSN 2446-4821.

Ouattar, H.; Zouirech, O.; Kara, M.; Assouguem, A.; Almutairi, S. M.; Al-Hemaid, F. M.; Rasheed, R. A.; Ullah, R.; Abbasi, A. M.; Aouane, M.; Mikou, K. In Vitro Study of the Phytochemical Composition and Antioxidant, Immunostimulant, and Hemolytic Activities of *Nigella sativa* (Ranunculaceae) and *Lepidium sativum* Seeds, **Molecules**, 2022. Doi: [10.3390/molecules27185946](https://doi.org/10.3390/molecules27185946).

Palácio, S. M.; Almeida, J. C. B.; Campos, E. A.; Veit, M. T.; Ferreira, L. K.; Deon, M. T. M. Silver nanoparticles effect on *Artemia salina* and *Allium cepa* organisms: influence of test dilution solutions on toxicity and particles aggregation. **Ecotoxicology**, vol 30, 2021. Doi: [10.1007/s10646-021-02393-7](https://doi.org/10.1007/s10646-021-02393-7).

Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016. Doi: [10.1017/jns.2016.41](https://doi.org/10.1017/jns.2016.41).

Pequeno, N. B.; Soto-Blanco, B. *In vitro* toxicity of poisonous plants: evaluation of hemolytic activity assay. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2006. ISSN 1679-9216.

Pereira, J. J.; Silva, Y. S.; Alves, F. M.; Bellei, P. M.; Viana, G. H. R.; Scopel, K. K. G.; Andrade, B. P.; Bellei, J. C. B. Avaliação *in silico* e *in vivo* do perfil de metabolismo e toxicidade hepática de alcaloides β -carbolínicos sintéticos com prévia atividade antimalárica. **HU Revista**, vol 49, 2023. Doi: <https://doi.org/10.34019/1982-8047.2023.v49.42343>.

Quintana, F. J.; Sherr, D. H. Aryl Hydrocarbon Receptor Control of Adaptive Immunity. **Pharmacological Reviews**, 2013. Doi: [10.1124/pr.113.007823](https://doi.org/10.1124/pr.113.007823)

Raghunath, A.; Sundarraj, K.; Nagarajan, R.; Arfuso, R.; Bian, J.; Kumar, A. P.; Sethi, G.; Perumal, E. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. **Redox Biology**, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.05.002>.

Rakovitsky, N.; Temkin, E.; Hameir, A.; Lurie-Weinberger, M.; Keren-Paz, A.; Carmeli, Y. *Zophobas morio* larvae as a novel model for the study of *Acinetobacter* virulence and antimicrobial resistance. **Frontiers in Microbiology**. 2024. Doi: [10.3389/fmicb.2024.1375787](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1375787)

Ribeiro, I. M. M. **Líquido da casca da castanha do caju (*Anarcadium occidentale* L.) (LCC) e seus principais constituintes: atividades anti-leishmania, toxicológica e imunomoduladora**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional. Universidade Federal do Piauí- UFPI, 2021.

Rim, K-T. In silico prediction of toxicity and its applications for chemicals at work. **Toxicol. Environ. Health Sci**, 2020. Doi: [10.1007/s13530-020-00056-4](https://doi.org/10.1007/s13530-020-00056-4)

Rodrigues, G. S.; Avelino, J. A.; Siqueira, A. L. N.; Ramos, L. F. P.; Santos, G. B. O uso de softwares livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 44, No. 8, 1036-1044, 2021. Doi: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170739>.

Rubsam, A.; Parikh, S.; Fort, P. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018. Doi: [10.3390/ijms19040942](https://doi.org/10.3390/ijms19040942).

Saebo, I. P.; Bjoras, M.; Franzyk, H.; Helgesen, E.; Booth, J. A. Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023. Doi: [10.3390/ijms24032914](https://doi.org/10.3390/ijms24032914).

Sales, P. A. B.; Costa, A. S.; Oliveira, J. M. G.; Silva, K. R.; Costa, A. P. R. Receptores de estrógeno e seus ligantes: uma breve revisão. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 15, Ed. 264, Art. 1755, agosto, 2014. Doi: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v8n15.1755>

Santos, A. M. **Proficiência do método alternativo ao uso de animais OECD TG 491 para avaliação de irritação e corrosão ocular**. Trabalho de conclusão

de curso (Graduação em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, 2019.

Santos, V. L. A.; Gonsalves, A. A.; Araújo, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de Lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Quim. Nova**, Vol. 41, No. 1, 110-115, 2018. Doi: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170135>.

Shamsudin, N. F.; Ahmed, Q. U.; Mahmood, S.; Shah, S. A. A.; Khatib, A.; Mukhtar, S.; Alsharif, M. A.; Parveen, H.; Zakaria, Z. A. Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. **Molecules**, 2022. Doi: [10.3390/molecules27041149](https://doi.org/10.3390/molecules27041149).

Silva, H. H. M.; Alves, M. H. P.; Gonçalves, R. J. S.; Pereira, N. A.; Affonso, C. R. G. Proposta de modificação molecular: análise de parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos “in silico” de fármacos barbitúricos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, 2022. Doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i13.35680>.

Silva, L. R.; Martins, L. V.; Bantim, F. C. I.; Meireles de Deus, M. S.; Ferreira, P. M. P.; Peron, A. P. Flavonoids: Chemical composition, medical actions and toxicity. **Acta toxicol. argent.** Vol.23, N.1, 2015. ISSN 1851-3743.

Silva, K. U. D. **O uso do ensaio Allium cepa para análise ecotoxicológica de corpos d'água continentais do Rio Grande do Sul**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS), 2021.

Silva, D. M.; Nunes, L. G. A.; Silva, N. P.; De Freitas, P. H. S.; Scio, E.; Tavares, G. D.; Alves, I. A.; Costa, J. C. Anti-Inflammatory Activity and Acute Toxicity Of *Pereskia aculeata*, In *Zophobas morio* Larvae. **Chemistry & Biodiversity**. 2024. Doi: DOI: [10.1002/cbdv.202400686](https://doi.org/10.1002/cbdv.202400686)

Silva, M. G.; Furtado, M. M.; Osório, A. T.; Moraes, I. C. P. S.; Amaral, M. P. M.; Coelho, A. G.; Arcanjo, D. D. A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, e538101220137, 2021. Doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20137>

Soeiro, J. E. M. **Bioinformática estrutural aplicada a bioprospecção alvo direcionada de compostos com potencial antitumoral**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, 2023.

Sousa, J. di P. S.; Feitosa, R. S.; Lira, B. S. M. M.; Medeiros, M. G. F., Carvalho, A. L. M. Vegetable oils as skin penetration enhancer in topical and transdermal anti-inflammatory formulations: an integrative review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 12, p. e541101220308, 2021. Doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20308>

Sousa, J. P. A.; Sousa, J. M. S.; Rodrigues, R. R. L.; Nunes, T. A. L.; Machado, Y. A. A.; Araújo, A. C.; Silva, I. G. M.; Cordeiro, K. B. B.; Bão, S. N.; Alves, M. M. M.; Mendonça-Junior, F. J. B.; Rodrigues, K. A. F. Antileishmanial activity of 2-amino-thiophene derivative SB-200. **International Immunopharmacology**. Vol 13, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110750>.

Tagushi, N.; Hata, T.; Kamiya, E.; Kobayashi, A.; Aoki, H.; Kunisada, T. Reduction in human hair graying by sterubin, an active flavonoid of *Eriodictyon angustifolium*. **Journal of Dermatological Science**, 2018. DOI: [10.1016/j.jdermsci.2018.11.002](https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.11.002)

Tan, M. E.; Li, J.; Xu, H. E.; Melcher, K.; Yong, E. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug Discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>.

Tavarati, G.; Masoudian, N.; Gholamian, A. Evaluation of Medical Metabolites in Boraginaceae Family. **Journal of Chemical Health Risks**, 2014.

Teixeira, M. H. S. Avaliação in vitro da potencial atividade citotóxica e genotóxica de metalocomplexos a base de rênio. Dissertação (Mestrado em genética e bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Uberlândia – MG, 2023.

Tonholo, D. R. **Avaliação da toxicidade in vitro e in vivo de moléculas potencialmente terapêuticas**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

Ullah, A.; Munir, S.; Badshah, S. L.; Khan, N.; Ghani, L.; Poulson, B. G.; Emwas, A. H.; Jaremko, M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules**, 2020. Doi: [10.3390/molecules25225243](https://doi.org/10.3390/molecules25225243).

Valente, D.; Costa-Amaral, I. C.; De Carvalho, L. V. B.; Dos Santos, M. V. C.; De Castro, D. R. F.; De Falco, A.; Silva, C. B.; Nogueira, S. M.; Gonçalves, E. S.; Moreira, J. C.; André, L. C.; Teixeira, L. R.; Sarcinelli, P. N.; Sisenando, H. A.; De Oliveira, M. S.; Pereira, J. A.; Mattos, R. C. O. C.; Larentis, A. L. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1590/2317-6369000124415>.

Vargas, F. S.; Almeida, P.; Boleti, A. P. A.; Pereira, M. M.; Souza, T. P.; Vasconcellos, M. C.; Nunez, C. V.; Pohlit, A. M.; Lima, E. S. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2016. Doi: 10.1186/s12906-016-1061-9.

Verma M.; Amresh, G.; Sahu, P. K.; Rao, C. V.; Singh, A. P. Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats. **Indian J Exp Biol**. 2013. PMID: 23441481.

Vian, M.; Raitano, G.; Roncaglioni, A.; Benfenati, E. *In silico* model for mutagenicity (Ames test), taking into account metabolismo. **Mutagenesis**, vol 34, ed 1, 2019. Doi: 10.1093/mutage/gey045.

Vieira, D. D.; Conceição, A. S.; Melo, J. I. M.; Stapf, M. N. S. A família Boraginaceae sensu lato na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Rodriguésia** 64 (1), Mar, 2013. <https://doi.org/10.1590/S2175-78602013000100013>.

Viswanathan, S.; Subramanian, K.; Ramesh, V.; Vashanti, A. H. R. Insights from molecular network analysis to docking of sterubin with potential targets. **Bioinformation**, vol 19, 2023. Doi: [10.6026/973206300191184](https://doi.org/10.6026/973206300191184).

Walker, J.; Reichelt, K. V.; Obst, K.; Widder, S.; Hans, J.; Krammer G. E.; Ley, J. P.; Somoza, V. Identification of an anti-inflammatory potential of *Eriodictyon angustifolium* compounds in human gingival fibroblasts. **Food & Function**, issue 7, 2016. Doi: 10.1039/c6fo00482b.

Wang, M.; Zhao, J.; Avula, B.; Lee, J.; Upton, R.; Khan, I. A. Chemical characterization and quantitative determination of flavonoids and phenolic acids in yerba santa (*Eriodictyon* spp.) using UHPLC/DAD/Q-ToF. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol 234, 2023. Doi: [10.1016/j.jpba.2023.115570](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115570)

Xavier, Y. K. S.; Sobreira, R. C. B.; Junior, J. B. S.; Dos Santos, E. R. S. L.; Lima, M. I. A.; Ferreira, A. M. M. S.; Souza, C. S. V.; Souza, F. A.; Silva, M. S.; De Souza, I. A.; Maia, C. S. Phytochemical Investigation and Evaluation of Hemolytic and Toxicological Activity of the ethanol extract obtained from the mixture of seeds and pods of *Caesalpinia echinata* Lam. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 27341-27352 mar. 2021. Doi:10.34117/bjdv7n3-441.

Xie, R.; Li, B.; Jia, L.; Li, Y. Identification of Core Genes and Pathways in Melanoma Metastasis via Bioinformatics Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2022. Doi: [10.3390/ijms23020794](https://doi.org/10.3390/ijms23020794)

Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; Chen, X.; Hou, T.; Cao, D. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET Properties. **Nucleic Acids Research**. Volume 49, Edição W1, 2 de julho de 2021, Páginas W5–W14. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>.

Yu, X. Prediction of chemical toxicity to *Tetrahymena pyriformis* with four-descriptor models. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Vol. 190, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110146>

Zhang, H.; Zhou, Y.; Xing, Z.; Sah, R. K.; Hu, J.; Hu, H. Androgen Metabolism and Response in Prostate Cancer Anti-Androgen Therapy Resistance. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23, 13521. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms232113521>.

Zheng, M.; Liu, C.; Pan, F.; Shi, D.; Zhang, Y. Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from *Apocynum venetum* leaves: Possible cellular mechanisms. **Phytomedicine**. 2012 Doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.029>.

Zhu, Z.; Bao, Y.; Yang, Y.; Zhao, Q.; Li, R. Research Progress on Heat Stress Response Mechanism and Control Measures in Medicinal Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, 2024. DOI: [10.3390/ijms25168600](https://doi.org/10.3390/ijms25168600).

