

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AÇÕES TERAPÊUTICAS DO METIL-EUGENOL NA
INFLAMAÇÃO AGUDA DE PULMÃO INDUZIDA EM
RATOS**

MARIA ALANA ROCHA DE SOUSA

ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO OLIVEIRA DE MEIRA GUSMÃO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO MARTINS RAMOS

Teresina – PI

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AÇÕES TERAPÊUTICAS DO METIL-EUGENOL NA
INFLAMAÇÃO AGUDA DE PULMÃO INDUZIDA EM
RATOS**

MARIA ALANA ROCHA DE SOUSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão

Teresina – PI

2023

S725a Sousa, Maria Alana Rocha de.
Ações terapêuticas do Metil-Eugenol na inflamação aguda de pulmão
induzida em ratos / Maria Alana Rocha de Sousa. – 2023.
49 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Piauí –
UESPI, Programa de Pós-Graduação em Química, *Campus* Poeta
Torquato Neto, Teresina-PI, 2023.

“Orientador Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão.”

“Co-Orientador Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos.”

1. Abordagem Terapêutica. 2. Lesão de Isquemia e Reperusão.
3. Metil-eugenol. 4. Ancoramento Molecular. I. Título.

CDD: 540.07

AÇÕES TERAPÊUTICAS DO METIL-EUGENOL NA INFLAMAÇÃO AGUDA DE PULMÃO INDUZIDA EM RATOS

MARIA ALANA ROCHA DE SOUSA


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química

Aprovado em 06 de dezembro de 2023.

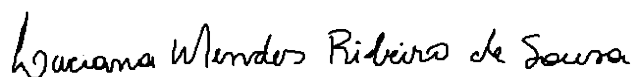
Membros da Banca:



Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão
(Presidente da Banca – UESPI)

 Documento assinado digitalmente
RICARDO MARTINS RAMOS
Data: 07/03/2024 18:47:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ricardo Martins Ramos
(Membro Titular – IFPI)



Profa. Dra. Luciana Mendes Ribeiro de Sousa
(Membro Titular – UFPI)



Profa. Dra. Nayana Pinheiro Machado de Freitas Coelho
(Membro Suplente – UESPI)

Teresina – PI

2023

*Dedico este trabalho a Deus por ter me dado força,
proteção e discernimento para enfrentar alguns
desafios durante o decorrer deste curso.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram com este trabalho. A Deus, por me deixar viver meus sonhos, pela saúde e força necessária para superar incansáveis dias de dedicação. Ao meu esposo, meus pais e irmãs, que facilitaram o que estava ao alcance deles para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.
- ❖ Ao meu orientador Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão e coorientador, Dr. Ricardo Martins Ramos e professores, por todas as correções feitas, sabedoria compartilhada e compromisso com o desenvolvimento de novos estudos. Vocês me inspiram.
- ❖ Agradeço também à UESPI e ao Biotério do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBio – UESPI), por ceder os espaços de estudos, à estrutura que me permitiu explorar ao máximo tudo o que foi necessário para o sucesso deste trabalho.

*“Nunca perca de vista o seu ponto de partida”
(Santa Clara de Assis)*

RESUMO

SOUSA, M. A. R. **AÇÕES TERAPÊUTICAS DO METIL-EUGENOL NA INFLAMAÇÃO AGUDA DE PULMÃO INDUZIDA EM RATOS.** 2023. 49 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma doença inflamatória que acomete os pulmões, com ruptura da barreira alvéolo-capilar e perda da complacência pulmonar orquestradas por intenso processo inflamatório mediado por neutrófilos que culmina com o dano alveolar difuso e hipóxia tecidual. Neste contexto, nenhum medicamento específico ainda foi aplicado para tratar a síndrome. Portanto encontrar novos alvos terapêuticos que possam tratar a síndrome tornou-se estudo de investigação. Diante disso, o metil-eugenol (ME) é o alvo deste estudo. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise farmacológica e toxicológica *in silico* com o ADMET, bem como determinar por meio do ancoramento molecular a afinidade de interação das enzimas 5-lox e cox-2 com o ME e em seguida os testes *in vivo*; em que ratos machos foram distribuídos em cinco grupos com cinco ratos cada, em que alguns grupos foram submetidos ao processo de isquemia e reperfusão (I/R). Os grupos G4 e G5 foram tratados por via inalatória com metileugenol (10%). Após a conclusão desses procedimentos foi realizado a contagem de células totais e a histologia pulmonar. Na predição ADMET o metil-eugenol apresentou absorção intestinal alta e barreira hematoencefálica de média permeabilidade. Frente a regra de Lipinski, o metil-eugenol não teve nenhuma violação demonstrando alto potencial para candidato a fármaco. O ancoramento molecular demonstrou que o metil-eugenol obteve maior afinidade de ligação com a enzima 5-Lox. Por fim, as análises estatística e histológica do ME demonstraram a sua eficácia farmacológica quanto a diminuição da quantidade de células inflamatórias, macrófagos livres e diminuição dos radicais livres. Os resultados indicaram que o óleo do ME é uma opção favorável de abordagem terapêutica no tratamento da SDRA.

Palavras-chave: Abordagem terapêutica; Metil-eugenol; Ancoramento molecular; Lesão de isquemia e reperfusão.

ABSTRACT

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is an inflammatory disease that affects the lungs, with rupture of the alveolar-capillary barrier and loss of lung compliance orchestrated by an intense inflammatory process mediated by neutrophils that culminates in diffuse alveolar data and tissue hypoxia. In this context, no specific drug has yet been applied to treat the syndrome. Therefore, finding new therapeutic targets that can treat the syndrome has become a research study. In view of this, methyl-eugenol (ME) is the target of this study. The aim of this work was to carry out an in silico pharmacological and toxicological analysis with ADMET, as well as to determine the interaction affinity of the 5-lox and cox-2 enzymes with ME by means of molecular docking, and then in vivo tests; in which male rats were distributed into five groups with five rats each, in which some groups were subjected to the ischemia and reperfusion (I/R) process. Groups G4 and G5 were treated by inhalation with methyl-eugenol (10%). After completing these procedures, total cell counts and lung histology were performed. In the ADMET prediction, methyl-eugenol showed high intestinal absorption and a medium-permeability blood-brain barrier. Methyl-eugenol had no violations of Lipinski's rule, demonstrating high potential as a drug candidate. Molecular docking showed that methyl-eugenol had the highest binding affinity with the enzyme.

Keywords: Therapeutic approach; Methyl eugenol; Molecular docking; Ischemiareperfusion injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura 3D do metil-eugenol	22
Figura 3.2. Pulmões armazenados em formol tamponado.	26
Figura 3.3. A) Incisão na região ventral; B) Exposição da traqueia com cânula diagonal; C) Incisão de soro fisiológico na região da traquéia.	27
Figura 3.4. Pulmões armazenados em formol tamponado.	27
Figura 3.5. Suspensão celular com azul de metileno.	28
Figura 4.1. Afinidades do metil-eugenol nos cálculos de docking com a A) enzima 5LOX e B) enzima Cox-2. 3D imagens taken from ChimeraX Viewer and LIGPLOT+.	33
Figura 4.2. Análise comparativa do número de células inflamatórias presentes no lavado bronco- alveolar dos animais com e sem tratamento com METIL-EUGENOL. Legenda: $a=p<0,001$ quando comparado ao grupo 1.	34
Figura 4.3. Análise comparativa do número de células inflamatórias presentes nos alvéolos de animais com e sem tratamento com METIL-EUGENOL.	35
Figura 4.4. Fotomicrografias da histologia dos alvéolos. A) Isquemia, não tratado; B) Aberto, não manipulado; C) Não manipulado. D) Isquemia, tratado com o óleo; E) Isquemia, tratado com o óleo antes da reperfusão.	36
Figura A.1. Espectro de massas do ME.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Predição de metabolismo e toxicidade.....	24
Tabela 4.1. Predição de metabolismo e toxicidade.....	29
Tabela 4.2. Previsão de analogia com droga.....	30
Tabela 4.3. Parâmetros de afinidade do ancoramento molecular utilizando o Autodock Vina das enzimas 5-Lox (PDB: 6N2W) e Cox-2 (PDB: 5IKR) com o Metil-eugenol.	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LPA - Lesão Pulmonar Aguda

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

PMNs - Recrutamento de Neutrófilos Polimorfonucleares

ME - Metil-eugenol

I/R - Isquemia e reperfusão

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

NF-KB - Fator de Transcrição Nuclear Kappa-B

SNPs - Polimorfismos de Nucleotídeo Único

ADMET - Adsorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade.

LTs - Leucotrienos pró-inflamatórios

Cox-2 - Ciclooxigenase-2

5-lox - 5-lipooxigenase

IL - Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

CYPs - Enzimas polimórficas do citocromo P450

LBA - Lavagem bronco-alveolar

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos	16
CAPÍTULO 2 - REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Lesão de Isquemia e Reperfusão.....	17
2.2 Óleos essenciais	18
2.3 Predição ADMET.....	18
2.3.1 Enzimas polimórficas de citocromo P450 (CYPs).....	19
2.4 Ancoramento molecular.....	20
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	21
3.1 In silico	21
3.1.1 <i>Propriedades ADMET</i>	21
3.1.2 <i>Estrutura 3D de ligantes e receptores</i>	22
3.1.3 <i>Ancoramento molecularEstrutura 3D de ligantes e receptores</i>	23
3.2 In vivo	24
3.2.1 <i>Protocolo experimental (Indução da resposta inflamatória pulmonar – isquemia e reperfusão)</i>	25
3.2.2 <i>Tratamento</i>	25
3.2.3 <i>Lavabo Broncoalveolar</i>	26
3.2.4 <i>Contagem de células totais</i>	27
3.2.5 <i>Histologia pulmonar</i>	28
3.2.6 <i>Eutanásia</i>	28
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Previsão ADMET do Metil-Eugenol	29
4.2 Ancoramento molecular.....	31
4.3 Análise histológica.....	33
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS	38
ANEXO A.....	49

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A lesão pulmonar aguda (LPA) e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) são definidas por um edema pulmonar não cardiogênico onde ocorre um dano alveolar difuso, principalmente com conteúdo proteico, ou seja, um processo inflamatório de base importante com uma excessiva resposta inflamatória do pulmão, associada ao recrutamento de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), lesão do parênquima pulmonar, edema intersticial e ruptura da integridade epitelial [1,2]. Essa síndrome clínica continua sendo a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva [3]. Apesar de uma melhor compreensão de sua fisiopatologia, atualmente não existem tratamentos eficazes. Nesta pesquisa, analisamos o efeito protetor do metileugenol (ME) contra o dano oxidativo pulmonar *in vivo* e *in silico*.

A patogênese de distúrbios LPA/SDRA incluem estresse oxidativo/antioxidante e instabilidade inflamatório/anti-inflamatório, regulação positiva de moléculas de adesão e aumento da produção de quimiocinas [1,4]. Citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 β (IL-1 β), IL-8 e IL-6, atuam em uma função significativa na intermediação e ampliação de LPA /SDRA, induzindo quimiotaxia e a ativação de neutrófilos [2]. A isquemia-reperfusão intestinal (I/R) é uma forma bastante estabelecida que imita as alterações morfológicas e funcionais analisadas na SDRA. A I/R intestinal aumenta a permeabilidade vascular após cirurgia cardíaca e aórtica, choque ou trauma crítico [5]. Pesquisadores examinaram os mecanismos dessa lesão, sugerindo que a isquemia intestinal posterior serve como leito primário para leucócitos circulantes [6].

Nenhum medicamento específico foi administrado para controlar LPA ou SDRA. Portanto, encontrar novos alvos terapêuticos e descobrir novos medicamentos para curar a SDRA tornou-se objeto de investigação. Modelos animais de LPA são instrumentos significativos para esmiuçar as funções envolvidas na SDRA em

humanos. Vários procedimentos foram elaborados em diferentes estirpes animais que podem provocar a LPA, cada qual com suas próprias vantagens e limitações.

O metil-eugenol (4-alil-1,2-dimetoxibenzeno) é um composto com estrutura análoga ao eugenol, que possui massa molar de $178.23 \text{ g.mol}^{-1}$, é um produto encontrado nos óleos essenciais de uma diversidade de plantas como: *Myristica fragran* H. (*Myristicaceae*), *Rosmarinus officinalis* L. (*Lamiaceae*), *Assarum eurapaeum*, *Acacia senegal* (L.) Willd. (*Mimosaceae*), *Piper nigrum* L. (*Piperaceae*) e *Croton nepetaefolius* Baill (*Euphorbiaceae*) [7, 8].

A partir da análise dos espectros de massas do ME com as sequencias de fragmentação [9] (Figura A.1 - Anexo A) podemos observar que há um fragmento com pico m/z em 178, confirmando a formação do íon molecular. Logo em seguida um elétron foi removido de um orbital de maior energia da molécula e o fragmento com pico em m/z 147 [M-31], que é um pico típico referente a perda do $-\text{OCH}_3$ do éter.

O fragmento com pico m/z em 115, também foi formado pela perda do grupo $-\text{OCH}_3$. Logo após há a clivagem da ligação simples formando o cátion benzila apresentando um pico com m/z 91, em seguida ele rapidamente se rearranjou formando o pico base do íon tropílio com m/z 91. Pois quando cadeias maiores estão presentes pode ocorrer a quebra para eliminar parte da cadeia carbônica como radical formando primeiro o cátion benzila e depois rearranjar até o íon tropílio. No pico com m/z 77 ocorreu uma clivagem sigma e no pico com m/z 51 ocorreu clivagem pi e rearranjo.

A exposição humana ao metil-eugenol pode acontecer por meio da utilização de cosméticos de modo direto na pele ou por via oral por meio de substâncias que estão incluídas nos alimentos. Frequentemente é empregado como um potente bactericida por suas propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antitumoral, antifúngica, antipirética, antimutagênica, antiplaquetária, antialérgica, anti-inchaço e antisséptico [10-13].

Dados in vivo que compostos estruturalmente relacionados ao eugenol atuam na sinalização do TNF- α induzindo à ativação do NF-Kb [14]. Estudos anteriores utilizando modelo in vivo na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS) demonstrou que o eugenol potencializou de fato os componentes elásticos, resistivos e viscoelásticos da mecânica pulmonar, promovendo inibição da liberação do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e ativação de fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) [15] e diminuiu a infiltração de neutrófilos nos pulmões [2]. Além do mais, o

eugenol defende contra o deterioramento dos pulmões ao ser exposto a xenobióticos e material particulado ao ser induzido por partículas de escape de diesel [16].

Mesmo com o variado uso popular e comercial, o metil-eugenol apresenta solubilidade aquosa limitada, tendo baixa biodisponibilidade. Algumas das soluções para aumentar o seu potencial terapêutico, é o uso de nano-formulações que foram desenvolvidas como lipossomas, nanopartículas, microemulsões e micelas [17, 18].

Para ampliar o conhecimento deste fenilterpenoide, o presente estudo teve por objetivo: (i) realizar um estudo de predição farmacocinética e toxicológica, bem como (ii) predizer a afinidade da molécula com as enzimas 5-Lox e Cox-2 por meio do ancoramento molecular e (iii) analisar o efeito antioxidante e anti-inflamatório do metil-eugenol e sua importância funcional como recurso terapêutico na LPA/SDRA por meio da inalação do óleo do metil-eugenol no tratamento da inflamação aguda de pulmão induzida por isquemia e reperfusão intestinal em ratos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antioxidante e anti-inflamatório do metil-eugenol na LPA/SDRA induzida por isquemia-reperfusão intestinal (I/R) em ratos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar por meio de um estudo farmacocinético e toxicológico a biodisponibilidade oral e absorção intestinal do metil-eugenol;
- Analisar a afinidade de ligação entre o metil-eugenol com as enzimas 5-Lox e Cox-2 empregando testes *in silico*;
- Avaliar os efeitos anti-inflamatórios do óleo do metil-eugenol na inflamação e reperfusão pulmonar induzida por isquemia e reperfusão aguda em ratos;
- Investigar, por inalação do metil-eugenol a atividade anti-inflamatória na pneumonia isquêmica aguda e reperfusão intestinal em ratos;

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lesão de Isquemia e Reperfusão

A interrupção do fluxo sanguíneo a um órgão causa de forma rápida prejuízos nos tecidos. Mesmo que a renovação do fluxo de sangue consiga mitigar tecidos danificados após a isquemia, a própria reperfusão causa danos adicionais chamados de lesão de isquemia-reperfusão (I/R) [19]. A lesão por I/R pode induzir a SDRA. A isquemia é uma circunstância em que o fluxo sanguíneo, rico em oxigênio, é interrompido a determinado órgão ou tecido, prejudicando sua oxigenação celular [20].

O vocábulo reperfusão é uma palavra usada para definir a restauração do fluxo sanguíneo e, assim sendo, do oxigênio, para um tecido que estava em período isquêmico. Em muitos tecidos, as complicações da isquemia consistem na sua duração, e várias lesões ocorrem durante a fase de reoxigenação da reperfusão intestinal. No entanto, a recuperação tecidual da reperfusão e oxigenação é capaz de iniciar respostas bioquímicas adversas que auxiliam para a degeneração tecidual tardia [21].

A lesão de I/R é seguida por uma diminuição da atividade contrátil, ampliação da permeabilidade vascular e danos à barreira mucosa [22]. Além de danificá-lo, destrói a integridade da barreira e a absorção de nutrientes que através da mucosa pode fazer com que bactérias entrem no sangue através da parede intestinal, causando resposta inflamatória, sepse sistêmica e danos aos órgãos. Onde vários fatores podem contribuir para a lesão de I/R, incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS), em que os radicais livres danificam membranas e a liberação de citocinas [23, 24].

2.2 Óleos essenciais

Conforme os estudos de Mouchrek Filho [25], o termo “óleo essencial” é utilizado para descrever líquidos oleosos voláteis, de cheiro forte, quase sempre agradável, extraídos de plantas por algum método específico.

A composição química dos óleos essenciais é bastante complexa, contendo inúmeros compostos com diferentes funções orgânicas. As características físicas dos óleos essenciais incluem a cor, que geralmente é incolor ou levemente amarelada quando recém extraída. Existem poucos óleos que têm cor. Na maioria dos casos, os óleos essenciais não apresentam muita estabilidade, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais, são lipossolúveis e dissolvem-se em solventes orgânicos comuns [26].

Esses óleos têm sido cada vez mais explorados como fontes alternativas, mais naturais e menos prejudiciais ao meio ambiente. A essências emitidas através da evaporação da superfície das plantas é vista como um mecanismo de defesa contra bactérias e fungos, bem como um mecanismo para atrair insetos e pássaros polinizadores e garantir sua reprodução, especialmente quando se descobre que alguns óleos aromáticos têm graus variados de propriedades antissépticas devido à sua abundância química de fenóis, aldeídos e álcoois.

2.3 Predição ADMET

A farmacocinética é um dos princípios da preparação de medicamentos, onde a pesquisa se concentra na rota percorrida por um medicamento em um organismo vivo. Este estudo analisa quatro propriedades farmacocinéticas variáveis, denominadas pela abreviatura ADME, que representam os processos de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M) e excreção (E), que são os fatores determinantes, fatores como o início, a força e a duração do efeito da droga [27,28].

Seguindo a via de administração do material, a primeira característica é a absorção, que é o transporte do local de administração até a circulação sistêmica. Um dos fatores mais importantes nesta fase é o modo de administração, que afeta diretamente a biodisponibilidade do medicamento. Uma característica de distribuição é então identificada onde o medicamento é distribuído reversivelmente da circulação sistêmica para os tecidos, reduzindo a concentração do medicamento [29]. Durante

esses processos, o organismo tenta eliminar o xenobiótico ou medicamento através do metabolismo, e após esse processo de biotransformação, o organismo tenta eliminar esse produto químico através da excreção e urina [30].

ADMET também é um acrônimo usado em farmacocinética que introduz uma nova propriedade farmacocinética variável juntamente com outra propriedade relatada, a toxicidade (T) que é levada em consideração na determinação de efeitos adversos à saúde durante o tratamento com um determinado medicamento [31]. A via de administração dos medicamentos afeta diretamente a determinação de ADMET e ADME, com o objetivo de alcançar a melhor via de tratamento e o menor risco para o paciente. A previsão das características ADMET é realizada através da coleta de dados científicos e da aplicação extensiva de técnicas como a triagem biológica automatizada [32,33].

2.3.1 Enzimas polimórficas de citocromo P450 (CYPs)

A variabilidade individual na resposta e depuração de um fármaco é um obstáculo de difícil compreensão e frequente na prática clínica [34]. A sobreposição de especificidades de substrato enzimático, muitos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) [35] e diferenças entre grupos étnicos [36] impedem a previsão da resposta fenotípica. Para impedir falhas no tratamento e toxicidade que não é mais necessária, é importante adaptar as doses e os coquetéis de medicamentos a cada indivíduo [37].

O Projeto Genoma Humano constatou 57 CYPs humanos, que foram agrupados em 18 famílias e 43 subfamílias com base na semelhança de sequência [38]. As famílias CYP 1, 2 e 3 são responsáveis pelo metabolismo de medicamentos, xenobióticos e certas moléculas endógenas [36] e são, consequentemente, de específico valor para este estudo. A maior parte das CYPs metaboliza mais de um fármaco. Além disso, a droga é frequentemente metabolizada por múltiplos CYPs. Os fármacos também podem impedir ou compelir a atividade do CYP exercendo ação diretamente com a enzima ou modificando sua expressão.

A descrição dessas interações é fundamental para definir e prever combinações compatíveis de medicamentos [39]. Os CYPs humanos são principalmente proteínas ligadas à membrana [40] que são onipresentes expressas na maior parte dos tecidos. As expressões mais elevadas são normalmente

encontradas no tecido hepático, mas a distribuição de CYPs específicos muda [41] indicando que a eficácia real do fármaco certamente depende da expressão do CYP no tecido alvo.

2.4 Ancoramento molecular

O ancoramento molecular, também denominado de atracamento molecular ou *docking* molecular é um método computacional que prevê a ligação não covalente de moléculas, como um receptor de proteína e um ligante. Esta previsão é uma técnica baseada nas possíveis interações entre o ligante e a macromolécula alvo e é usada na prática para rastrear grandes bibliotecas de compostos [42-44].

O ancoramento consiste em dois momentos principais: amostragem e pontuação. A amostragem relaciona-se à extensa exploração do espaço conformacional das moléculas a serem ligadas [45]. Este espaço conformacional é extenso, parcialmente devido ao fato de tanto o receptor como o ligante serem mais ajustáveis, possibilitando que cada molécula ajuste a sua forma em resposta à influência da outra.

Para limitar o espaço conformacional, o receptor é geralmente mantido rígido. Outra parte importante do acoplamento molecular é o sistema de pontuação. A função de avaliação avalia a adequação de cada posição da amostra. A aptidão define as formas que são preservadas na amostragem e é utilizada para determinar a probabilidade correta de poses preservadas [46]. Onde o resultado final do *docking* é um agrupamento de posições classificadas da molécula acoplada.

Determinar a posição de ligação certa de uma molécula menor é um pré-requisito para estabelecer sua afinidade de ligação e possibilita uma oportunidade de usar a posição para otimização de chumbo [47]. A avaliação adequada da afinidade de ligação é apreciativa para tarefas como triagem virtual ou determinação se um composto é relevante para análise experimental. O *docking* molecular deve calcular rapidamente a posição e a afinidade de ligação para ser útil para buscar informações de milhões de ligantes no processo de descoberta de medicamentos [42].

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 In silico

O óleo do metil-eugenol (98% de pureza) foi adquirido da *Sigma-Aldrich* (St, Louis, EUA), N° CAS: 93-15-2.

3.1.1 Propriedades ADMET

Para a obtenção da estrutura tridimensional do eugenol, utilizou-se o programa *Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) [48]. Os parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolização e excreção - ADMET) e toxicológicos foram analisados *in silico* nas plataformas SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) [49] e PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>) [50].

Os aspectos farmacocinéticos e toxicológicos avaliados no metileugenol foram: Absorção intestinal humana (HIA) considerada “alta” (70-100%), “média” (20-70%) ou “baixa” (<20%) [51]. Absorção oral/permeabilidade (Caco-2) “alta” (>70), “média” (4-70) ou “baixa” (<4) [52] e outro parâmetro que avalia a permeabilidade em células de fígado de cães é o MDCK, que considera “alta” (>500), “média” (25-500) ou “baixa” (<25) [53] e, por último, a passagem/penetração de substâncias pela barreira hematoencefálica (BBB) considerada “alta” (>2,0), “média” (0,1-2,0) ou “baixa” (<0,1) [54].

Para avaliar a predição *in silico* de interação do metil-eugenol com as CYPs foi utilizada a plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) [49], em que a metabolização foi avaliada através das isoformas do complexo P450: CYP2C19_inhibition, CYP2C9_inhibition, CYP2D6_inhibition, CYP2D6_substrate, CYP3A4_inhibition, CYP3A4_substrate [55]. O teste de Ames foi utilizado para verificar se o composto é cancerígeno ou mutagênico [56].

A caracterização do metil-eugenol como um bom candidato a fármaco também foi analisada segundo a Regra de Lipinski ou "Regra dos Cinco" [57,58] e que

estabelece que um bom candidato a fármaco deve possuir: (1) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (2) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (3) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol (4) coeficiente de partição octanol-água (log P) menor ou igual a 5; (6) área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å [57,58]. Além disso, uma regra adicional, proposta por [59], diz que o número de ligações rotacionáveis (NLR) não deve ser superior a 10, visto que a molécula deve adotar uma conformação fixa para interagir com o alvo, passar pelas membranas, e ao mesmo tempo adotar a conformação ativa.

3.1.2 Estrutura 3D de ligantes e receptores

A estrutura tridimensional do eugenol/meta-eugenol foi obtida do banco de dados de moléculas *Pubchem Open Chemistry Database* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os ligantes utilizados foram o metil-eugenol PubChem CID 7127, como mostra a Figura 3.1, e os ligantes cristalográficos obtidos do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) [60].

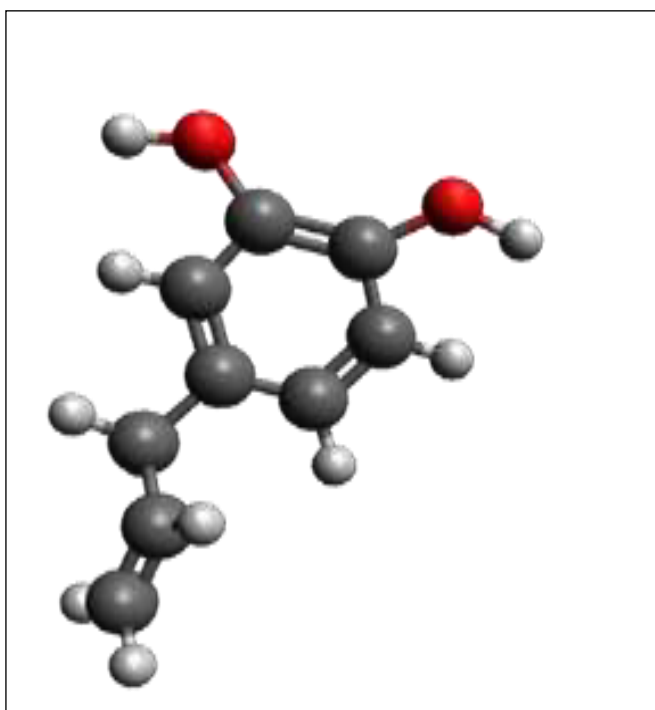


Figura 3.1. Estrutura 3D do metil-eugenol

As estruturas cristalográficas 3D dos receptores (alvos biológicos) das proteínas humanas foram obtidas do PDB. As proteínas selecionadas foram

5lipoxigenase (5-LOX, PDB ID: 6N2W) e Ciclooxigenase-2 (COX-2, PDB ID: 5IKR). Em que a enzima 5-lox na SDRA age sobre o ácido araquidônico (AA) que é fundamental para a produção de leucotrienos pró-inflamatórios (LTs), atua mediando a atuação dos macrófagos livre e induz à formação de LTs estimulando cascatas pró-inflamatórias; já a Cox-2 exerce os seus efeitos sobre o ácido araquidônico metabolizando-o, convertendo-o em prostaglandinas, estas por sua vez atuam no desempenho de inúmeros papéis biológicos na homeostase e nas respostas inflamatórias, agindo como mediadoras com a dor e apoiando os processos inflamatórios.

Posteriormente, as estruturas 3D das proteínas que apresentaram falta de alguns resíduos foram otimizadas por modelagem comparativa com a plataforma Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) [8,61].

3.1.3 Ancoramento molecular Estrutura 3D de ligantes e receptores

Os cálculos de ancoramento molecular (ou molecular *docking*) foram realizados usando o *software* AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/>) versão 1.5.6 [62]. Em seguida, os arquivos de proteínas foram preparados removendo estruturas não relevantes para os estudos como moléculas de água e outros grupos, como íons, usando o *software* CHIMERA X (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>) [63,64]. Logo após, as estruturas 3D das proteínas foram protonadas utilizando a plataforma PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>) [65] com as configurações padrões.

Os ligantes e as proteínas foram preparados para os cálculos com AutoDock Tools (ADT) versão 1.5.6 [66] Os hidrogênios foram adicionados a ambos, receptores e ligantes individualmente. As cargas de Gasteiger [67,68] foram então calculadas pelo ADT e os hidrogênios apolares foram mesclados. O tamanho da caixa de grade foi definido para 22,5 Å para cada eixo. As caixas da grade foram centralizadas nas coordenadas dos átomos dos resíduos localizados na região do sítio ativo, x = 31.907, y = 64.661 e z = 30.497 para 5lox, x = 35.871, y = 4.797 e z = 63.396 para cox2. O número de modos foi definido como 50 e a exaustividade foi definida como 24.

Um total de 4 cálculos de ancoramento molecular foram realizados. A energia de ligação (ΔG) foi calculada para o ligante cristalográfico (*redocking*) de cada proteína analisada como grupo controle em relação ao metil-eugenol. As interações

proteína ligante foram obtidas e analisadas com o *software* LIGPLOT+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) versão 2.2 [69] e as imagens foram geradas com o *software* UCSF ChimeraX.

3.2 In vivo

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí em conformidade com o protocolo número 016706/2022-84. No qual os procedimentos foram realizados com 25 ratos da linhagem Wistar, com idade de 2 a 3 meses, macho e com peso de 250g, fornecidos pelo Biotério do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBio – UESPI). Os ratos foram mantidos em sala ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo claroescuro (12/12 h) em gaiolas coletivas (cinco animais/caixa) com alimentação padrão (Labina) e livre acesso à água.

Os ratos foram distribuídos em 5 grupos experimentais com 5 ratos cada da seguinte forma: (i) G1- O grupo controle foi submetido a I/R, mas não foi tratado com metil-eugenol; (ii) G2- O grupo sham foi aberto, exposto o intestino e após 90 minutos foi realizado a lavagem broncoalveolar; (iii) G3 – O grupo naïve foi somente aplicado o sedativo e após 90 minutos foi realizado a lavagem broncoalveolar; (iv) G4 – O Grupo de tratamento foi submetido a indução por I/R e foi realizada a ação terapêutica através da inalação do metil-eugenol (10%) por um período de 10 minutos durante a reperfusão; (v) grupo G5- O Grupo de prevenção foi submetido a indução por I/R e foi realizada a ação terapêutica através da inalação do metil-eugenol (10%) por um período de 10 minutos durante o processo de isquemia, como mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Predição de metabolismo e toxicidade.

Grupos	Caracterização
G1	Grupo controle: Indução I/R e sem tratamento
G2	Grupo sham: Somente aberto, com exposição do intestino, sem indução I/R

G3	Grupo naive: Sem indução I/R e sem tratamento
G4	Grupo de tratamento: Indução I/R e inalação do metil-eugenol durante a reperfusão
G5	Grupo de prevenção: Indução I/R e inalação do metil-eugenol antes da reperfusão)

3.2.1 Protocolo experimental (Indução da resposta inflamatória pulmonar – isquemia e reperfusão)

Inicialmente foi feita a aplicação de uma injeção dissociativa de cetamina (60 mg/kg) e Xilazina (6 mg/kg), provocando o relaxamento muscular e perda de consciência. Em que posteriormente deu-se início ao processo de indução da inflamação pulmonar conforme o procedimento descrito e adaptado por [70], após cortar a linha alba, foi localizada a artéria mesentérica para aplicação do *claster* por cerca de 45 minutos, conservado durante esse tempo com gaze e soro fisiológico. Em seguida, foi retirado o *claster* para liberar o fluxo sanguíneo, provocando a reperfusão. A Figura 2.2 (a) mostra o período isquêmico com o auxílio do *Claster*.

3.2.2 Tratamento

No momento seguinte à realização dos procedimentos de inflamação do pulmão, foi realizada a inalação com metil-eugenol (20 gotas de ME dissolvidos em 9 ml de soro fisiológico = 10%) com aparelho inalador compressor multilaser por 10 minutos no grupo G4, enquanto no grupo G5 foi feito a inalação durante o procedimento isquêmico com o propósito de prevenir. A Figura 3.2 (b) mostra a terapêutica realizada através da nebulização com o óleo do ME.



Figura 3.2. Pulmões armazenados em formol tamponado.

3.2.3 Lavabo Broncoalveolar

O lavabo broncoalveolar sucedeu em conformidade com a metodologia aplicada e adaptada por Castro e seus colaboradores [71]. A princípio foi feita uma incisão na região ventral próxima a cabeça Figura 3.3 (A) com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgicas, na qual foi retirada a pele, exibida a traqueia, Figura 3.3 (B), cortada entre os anéis traqueais. Foi introduzido na traqueia uma cânula com o auxílio de uma seringa como mostra a Figura 3.3 (C), a qual foi injetada 10 ml de solução fisiológica 0,9 % massageando o pulmão, posteriormente foi aspirada a cultura de células e dispostos os líquidos em tubos falcon, os quais foram armazenados na geladeira para consecutiva contagem de células. Em seguida, foi injetado formol tamponado na traqueia com o auxílio de uma cânula e de uma seringa.

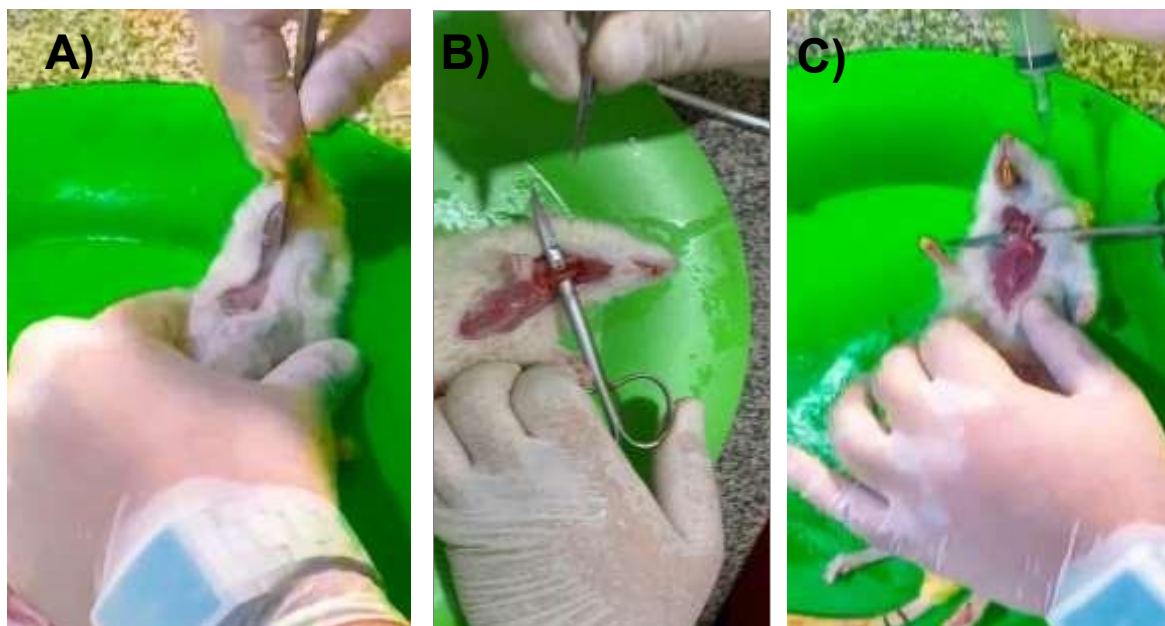


Figura 3.3. A) Incisão na região ventral; B) Exposição da traqueia com cânula diagonal; C) Incisão de soro fisiológico na região da traquéia.

3.2.4 Contagem de células totais

Os tubos foram dispostos na centrífuga por 10 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm). Após a formação do botão celular, com o auxílio da pipeta de Pasteur foi retirado o sobrenadante e adicionado 5 gotas do corante azul de metileno como mostra a Figura 3.4. Com o auxílio da pipeta graduada foi retirado o botão celular corado e acomodada na lamínula para contagem das células totais no microscópio óptico com aumento de 100X.



Figura 3.4. Pulmões armazenados em formol tamponado.

3.2.5 Histologia pulmonar

Após o processo de reperfusão intersticial, os pulmões foram retirados e armazenados em formol tamponado 10% como mostra a Figura 3.5. Posteriormente o lobo esquerdo do pulmão foi submetido a análise com o auxílio de hematoxilina – eosina (HE) em que foram investigadas com o auxílio do microscópio óptico trinocular (Olympus® CX31, Japão), equipado com uma câmera digital (Bell & Howell, EU 16.0 Plus, U.S.A.) acoplada a um microcomputador.



Figura 3.5. Suspensão celular com azul de metileno.

3.2.6 Eutanásia

Posteriormente aos processos mencionados neste trabalho, os animais foram sacrificados, com tiopental 100 mg/kg por via intravenosa. Logo após os corpos foram conservados em ambiente refrigerado.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Previsão ADMET do Metil-Eugenol

O metil-eugenol apresenta HIA de alta absorção (100,000000) [72,73], Caco-2 (58,0919) de média permeabilidade e MDCK (294,736) de média permeabilidade. Quanto à passagem pela barreira hematoencefálica (BBB), o metil-eugenol se apresenta como “média” (1.10869) [73]. No que se refere a atividade cancerígena em camundongos e ratos se evidenciou positivo.

Quanto à metabolização, o metil-eugenol apresentou-se como inibidor às isoenzimas CYP_2C19_inhibition e CYP_2C9_inhibition [72,74,75]. Como não inibidor às isoenzimas CYP_2D6_inhibition, CYP_3A4_inhibition e CYP_3A4_substrate [73]. A Tabela 4.1 mostra a predição de metabolismo e toxicidade

Tabela 4.1. Predição de metabolismo e toxicidade.

PREDITORES	PARÂMETROS	VALORES
Ames_test	Non mutação (Sem alterações) Mutação (Com alteração)	mutagen
Carcino_Mouse	Positive Negative	positive
Carcino_Rat	Positive Negative	positive
BBB	Maior que 2.0 (Alta) Entre 0.1 ~ 2.0 (Média) Menor que 0.1 (Baixa)	1,10869
Caco2	Maior que 70 (Alta) Entre 4 e 70 (Média) Menor que 4 (Baixa)	58,0919

CYP_2C19_inhibition	Inhibitor Non	Inhibitor
CYP_2C9_inhibition	Inhibitor Non	Inhibitor
CYP_2D6_inhibition	Inhibitor Non	Non
CYP_2D6_substrate	Inhibitor Non	Non
CYP_3A4_substrate	Inhibitor Non	Non
HIA	Entre 70% e 100% (Alta) Entre 20% e 70% (Média) Menor 20% (Baixa)	100.000000
MDCK	Maior que 500 (Alta) Entre 25-500 (Média) Menor que 25 (Baixa)	294,736

O metil-eugenol apresentou-se “mutagênico” no teste de Ames, porém, mesmo que o ME apresentando efeito tóxico, foi confirmado que ele atua em atividades citoprotetoras multifuncionais, inclusive em atividades antioxidantes e antiinflamatórias na dose de 100 mg/kg por peso corporal [76]. Quanto à Regra de Lipinski não apresentou nenhuma violação [73,74], nem com a regra de Veber [73]. A Tabela 4.2 apresenta a previsão de analogia com droga.

Tabela 4.2. Previsão de analogia com droga.

CRITÉRIOS	VALORES
nALH ≤ 10	2
nDLH ≤ 5	0
MM $\leq 500 \text{ g/mol}$	184,20 g/mol
Log P ≤ 5	2,58

TPSA $\leq 140 \text{ \AA}$	18,46
NRL ≤ 10	4

4.2 Ancoramento molecular

Tabela 4.3. Parâmetros de afinidade do ancoramento molecular utilizando o Autodock Vina das enzimas 5-Lox (PDB: 6N2W) e Cox-2 (PDB: 5IKR) com o Metil-eugenol.

Complex (Protein – ligand)	ΔG_{bind} (kcal/mol) Autodock Vina	Amino acids that interact through hydrogen bonds ^b	Amino acids that make hydrophobic ^b
6n2w_30z	- 7.16	His 432	Leu 368, Thr 364, Gln 363, Arg 596, His360, Pro 569, Ala 603, His 600, Val 604, Trp 599
6n2w_metileugenol	-6,2		Ile 340, Pro 289, Leu 288, Phe 252, Leu 291, Trp 194, Tyr 244, Lys 290
5ikr_ID8	-9,1		Trp 387, Leu 384, Ser 530, Tyr 348, Ala 527, Val 349, Leu 531, Val 523, Tyr 355, Leu 352, Met 522, Gly 526, Tyr 385
5ikr_metileugenol	-6,2		Tyr 355, Ser 353, Ala 527, Val 349, Ser 530, Tyr 385, Gly 526, Phe 518, Met 522, Leu 352, Val 523, Arg 120.

^a Energia de ligação da melhor conformação; ^b Obtida com o *software* LIGPLOT+.

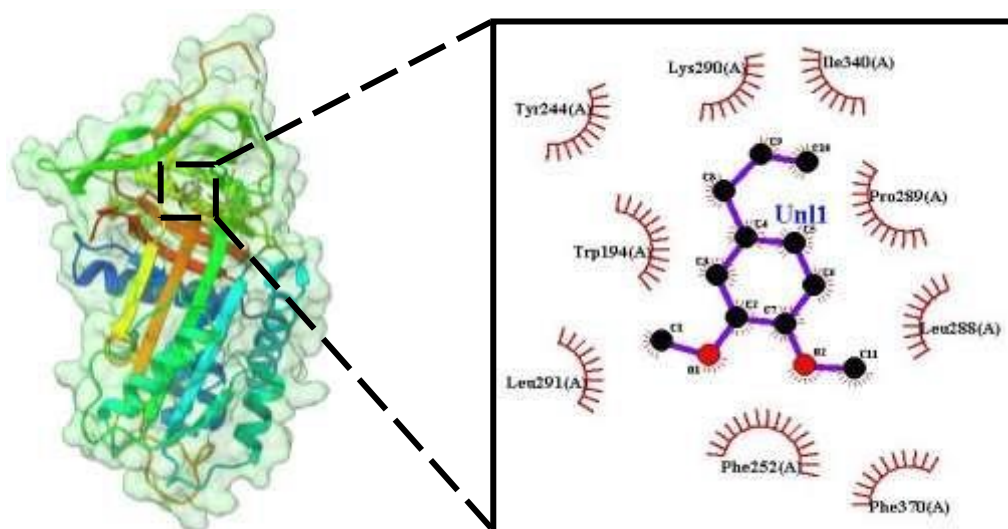
Na tabela 4.3 visualizamos que os encaixes realizados com 5-Lox (PDB: 6N2W) mostrou que o ligante cristalográfico apresentou o valor da energia de ligação de – 7,16 Kcal/mol. Dentre os quais foi observado que houve uma interação de ponte de

hidrogênio His432, mas também ocorreram interações hidrofóbicas (forças de Van der Waals) com os resíduos de aminoácidos Leu368, Thr364, Gln363, Arg596, His360, Pro569, Ala603, His600, Val604, Trp599 [77,78]. Na análise dos complexos realizada com a enzima *cox2* (PDB: 5IKR), o ligante cristalográfico também não apresentou nenhuma interação de ponte de hidrogênio, mas exibiu 13 interações hidrofóbicas Trp387, Leu384, Ser530, Tyr348, Ala527, Val349, Leu531, Val523, Tyr355, Leu352, Met522, Gly526, Tyr385 [79,80].

A energia de ligação dos ligantes cristalográficos em relação ao metileugenol mostrou que a proteína *cox-2* (PDB: 5IKR) apresentou uma energia de ligação maior (-9,1) [81]. No entanto, a proteína 5-*lox* (PDB: 6N2W) exibiu energia de ligação de -7,16 [82] obtendo uma energia de ligação próxima ao resultado da interação proteína-ligante do 6N2W–metileugenol (-6,2), no qual teve somente interações hidrofóbicas Tyr355, Ser353, Ala527, Val349, Ser530, Tyr385, Gly526, Phe518, Met522, Leu352, Val523, Arg120, do que a interação proteína-ligante do 5IKR – metileugenol ($\Delta G = -6,2$) o qual apresentou uma energia de ligação mais distante do ligante cristalográfico e apresentando somente interações de forças de

Van der Waals, Tyr355, Ser353, Ala527, Val349, Ser530, Tyr385, Gly526, Phe518, Met522, Leu352, Val523, Arg120 [74] como mostra a Figura 4.1.

A) 6N2W-METILEUGENOL



B) 5IKR – METILEUGENOL

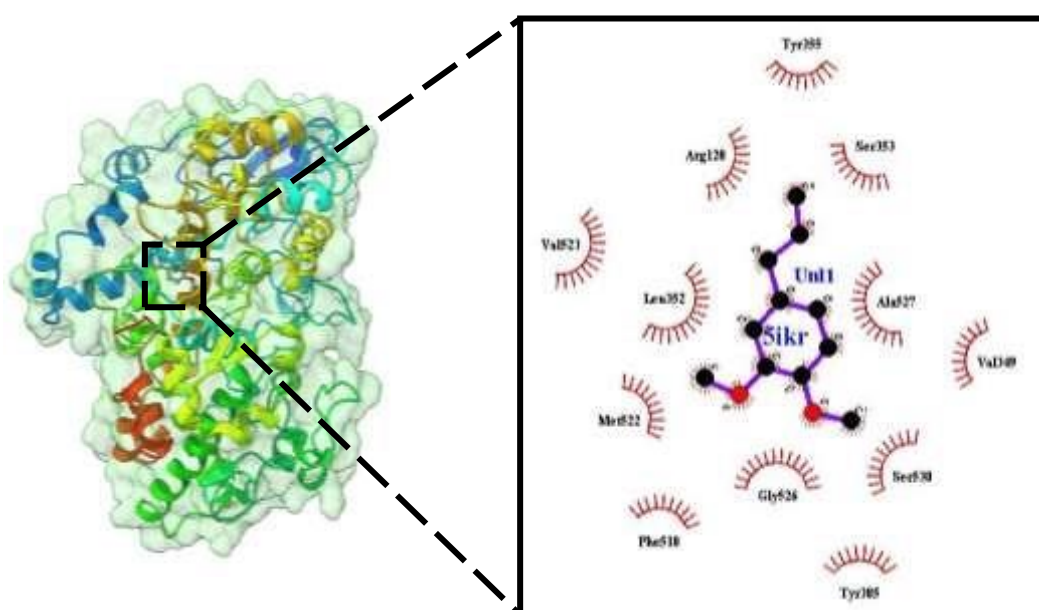


Figura 4.1. Afinidades do metil-eugenol nos cálculos de docking com a A) enzima 5LOX e B) enzima Cox-2. 3D imagens taken from ChimeraX Viewer and LIGPLOT+.

4.3 Análise histológica

A indução de síndrome respiratória aguda grave em ratos que passam por I/R acabam resultando na disfunção respiratória mitocondrial, com níveis maiores de citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS). Também pode ser observado a existência de células inflamatórias, principalmente macrófagos.

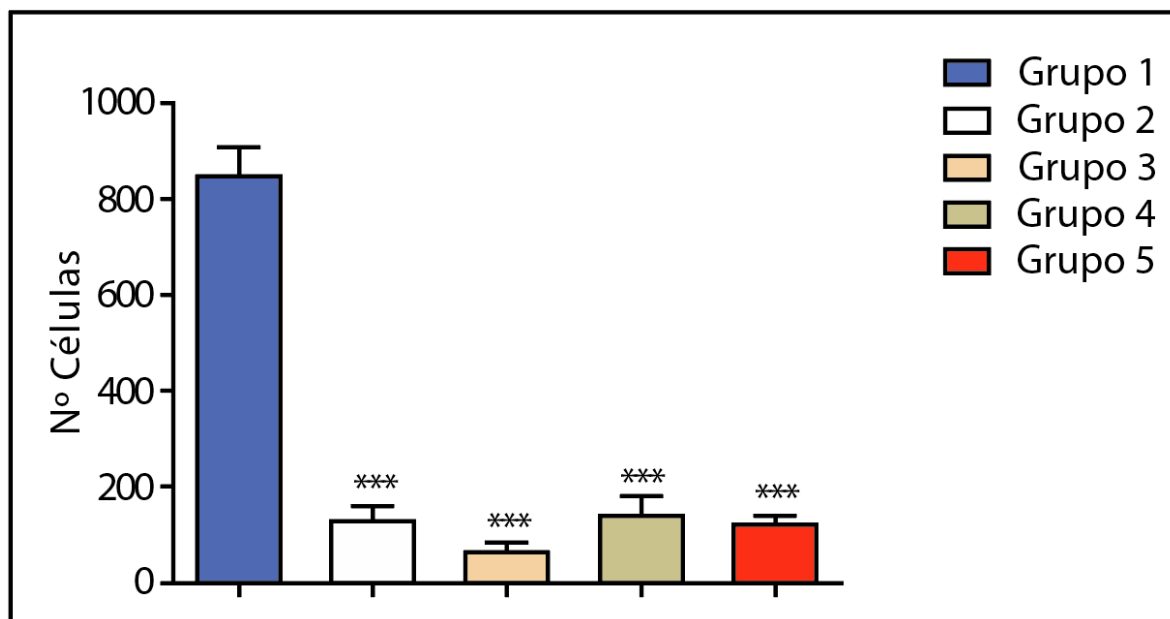


Figura 4.2. Análise comparativa do número de células inflamatórias presentes no lavado bronco- alveolar dos animais com e sem tratamento com METIL-EUGENOL. Legenda: a= $p < 0,001$ quando comparado ao grupo 1.

Na análise estatística, o grupo 1 corroborou com [83-85] em que a (I/R) ocorreu um aumento das células inflamatórias após um episódio de isquemia aguda quando o fluxo sanguíneo foi restabelecido provocando uma quantidade elevada de células inflamatórias, além do mais, os radicais hidroxila instigam a reação em cadeia livre, provocando uma peroxidação lipídica e desintegração do DNA [86]. Pode-se verificar que no que se refere a quantidade de células inflamatórias, entre os grupos 2 e 3 houve a diminuição do número de macrófagos e radicais livres quando comparados ao grupo 1. Porém, eles não passaram pela indução I/R, conforme mostra a Figura 4.2.

Em relação aos grupos tratados com metil-eugenol os grupos 4 e 5, obteve-se uma diminuição bastante considerável da quantidade de células inflamatórias e eliminador de radicais livres sugerindo a ação anti-inflamatória do metil-eugenol validando [72], que demonstrou que o metil-eugenol conseguiu induzir um efeito citoprotetor multifuncional, incluindo efeitos antioxidantes [87], no entanto os grupos 4 e 5 não apresentaram diferenças bastantes relevantes entre eles.

A análise do número de células inflamatórias, como mostra a Figura 4.3, demonstrou diferença considerável entre os grupos. No grupo 4 foi constatado uma diminuição bastante significativa do número de células inflamatórias presentes nos alvéolos, demonstrando que o ME atuou como um potente eliminador de radicais livres

[72,67] em relação ao grupo 1. Os grupos 4 e 5 confirmaram a diminuição na quantidade de células inflamatórias, porém o grupo 4 que é o de tratamento obteve um resultado melhor que o grupo 5 que é o grupo de prevenção.

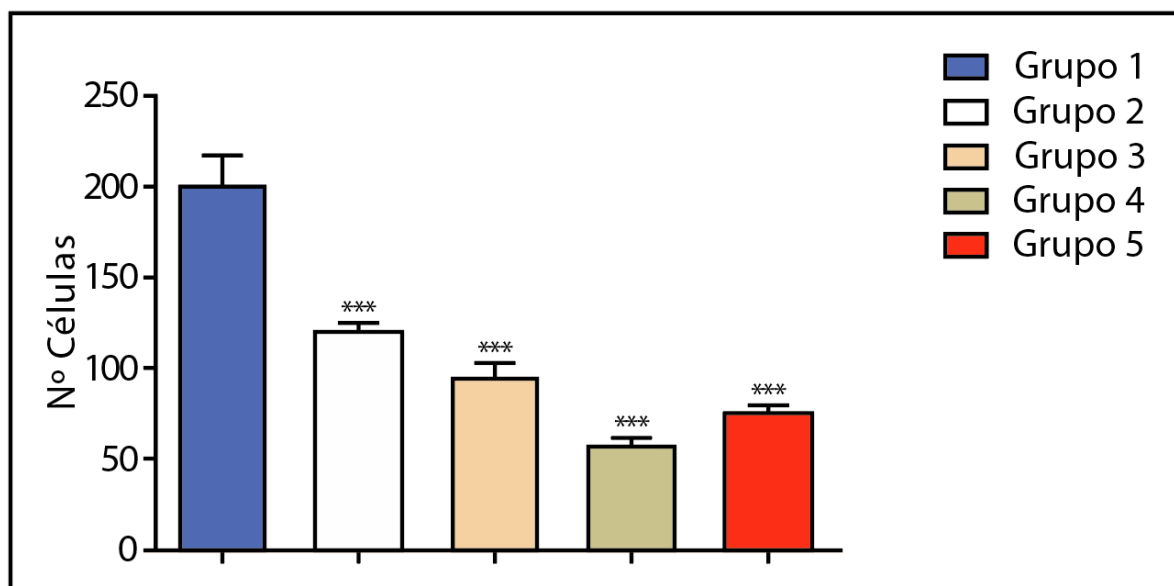


Figura 4.3. Análise comparativa do número de células inflamatórias presentes nos alvéolos de animais com e sem tratamento com METIL-EUGENOL.

A Figura 4.4 mostra as fotomicrografias de histologia dos alvéolos. Os achados histológicos apontam que o modelo experimental utilizado resultou em lesão pulmonar aguda e acentuada [88,89] caracterizada por abundância de macrófagos livres nos alvéolos [87] e ampliação na espessura dos septos alveolares conforme observado no grupo G1 [90] como também podemos visualizar diante dos grupos G2 e G3 os quais não passaram por I/R. No entanto, nos grupos G4 e G5, verificamos que as membranas hialinas já findaram, ocorrendo o espessamento dos septos interalveolares por edema sucedendo-se do aparecimento de septos alveolares mais preservados, inibindo os macrófagos [91] atenuando o estresse oxidativo e regulando as citocinas pró-inflamatórias [92].

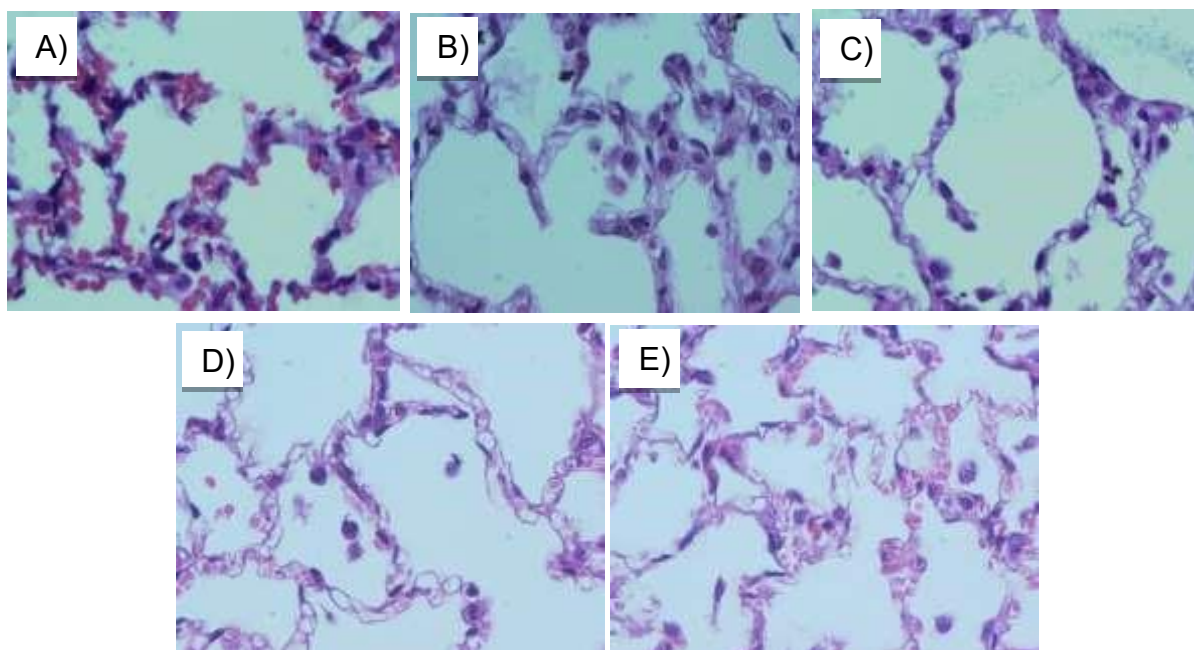


Figura 4.4. Fotomicrografias da histologia dos alvéolos. A) Isquemia, não tratado; B) Aberto, não manipulado; C) Não manipulado. D) Isquemia, tratado com o óleo; E) Isquemia, tratado com o óleo antes da reperfusão.

Neste trabalho, demonstramos que o óleo do ME como tratamento e prevenção foram capazes reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, reduzindo o número de macrófagos livres nos espaços alveolares [93] isso deve-se à sua inter-relação com cascatas de sinalização abrangendo citocinas e sua ação na expressão de genes pró-inflamatórios [87] indicando o seu uso potencial no tratamento da SDRA induzida por I/R intestinal em ratos.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, o metil-eugenol apresentou resultados significativos nos testes *in vivo* e *in silico*, indicando que o óleo possui uma média probabilidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BBB), alta absorção no intestino humano (HIA) e média biodisponibilidade oral (Caco-2). Frente a regra de Lipinski, o metil-eugenol não apresentou nenhuma violação aos critérios, podendo ser considerado um bom candidato a fármaco, e não exibiu nenhuma violação a regra de Veber podendo ser considerado um fármaco com uma boa biodisponibilidade oral em ratos.

No ancoramento molecular foi constatado que o metil-eugenol demonstrou maior afinidade com a proteína 5-lox e nos testes *in vivo* o óleo demonstrou um efeito na redução da quantidade de células inflamatórias, macrófagos alveolares, radicais livres e citocinas pró-inflamatórias.

CONTINUIDADE DA PESQUISA:

Desta maneira, o ME aponta ser um potencial agente terapêutico que pode ser empregado para prevenir SDRA no futuro.

- Contudo ainda requer uma investigação mais aprofundada sobre os efeitos do óleo nas células e seus principais mediadores pró-inflamatórios.
- Avançar estudos com diferentes concentrações de ME podem ser implementados para investigar os efeitos do ME na SDRA após o desafio com a I/R.
- Realizar testes *in silico* e *in vivo* comparando o metil-eugenol com outros compostos estruturalmente semelhantes

REFERÊNCIAS

1. BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **Journal of Pathology**, v. 202, n. 2, p. 145-156, 2004.
2. HUANG, X.; LIU, Y.; LU, Y., MA, C. Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. **International Immunopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 265-271, 2015.
3. ORBAN, J.C. et al. Causes and characteristics of death in intensive care units: a prospective multicenter study. **Anesthesiology**, v. 126, n. 5, p. 882-889, 2017.
4. LEE, W.L.; DOWNEY, G.P. Neutrophil activation and acute lung injury. **Curr. Opin. Crit. Care**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2001.
5. LIMA, F.M. et al. Dual Effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the Acute Lung Inflammation Induced by Intestinal Ischemia and Reperfusion: Action on Anti- and Pro-Inflammatory Cytokines. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 410-420, 2011.
6. MOORE, E.E et al. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. **The Journal of Trauma**, v. 37, n. 6, p. 881-887, 1994.
7. VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: I. Methyleugenol. **Fitoterapia** v. 71, n. 2, p. 216-221, 2000.
8. PEREIRA, A.D. et al. Isomerização do Metil-Eugenol Catalisada por $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3]$ em Atmosfera de CO_2 em Diferentes Temperaturas. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 4, p. 868-874, 2021.

9. SOUSA, D. A. **Influência da adição de CuCl₂ e SnCl₂ na relação metátese de olefinas vs isomerização do metileugenol usando complexo de Ru do tipo grubbs segunda geração como catalisador**. Orientador: José Luiz Silva Sá. 2018. 64 p. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Centro de Ciências da Natureza, Universidade Estadual do Piauí, Teresina, 2018.
10. AL-SHARIF, I.; REMMAL, A.; ABOUSSEKHRA, A. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation. **BMC Cancer**, v. 13, p. 1-10, 2013.
11. YOGALAKSHMI, B.; VISWANATHAN, P.; ANURADHA. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, v. 268, n. 3, p. 204-212, 2010.
12. GUENETTE, S.A. et al. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 562, p. 60-67, 2007.
13. ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Perspectives for the Application of Eugenol – A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 3671-3684, 2021.
14. MAGALHÃES, C.B. et al. The anti-inflammatory and anti-oxidative actions of eugenol improve lipopolysaccharide-induced lung injury. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 259, p. 30-36, 2018.
15. MAGALHÃES, C.B. et al. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 4, p. 845-851, 2010.
16. ZIN, W.A. et al. Eugenol attenuates pulmonary damage induced by diesel exhaust particles. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 5, p. 911-917, 2012.

17. PRAKASH, P.; GUPTA, N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: A short review. **Indian Journal of Physiology Pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 125-131, 2005.
18. RAJA, M.R.C. et al. Versatile and synergistic potential of eugenol: A review. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, n. 7, p. 1-6, 2015.
19. MALLICK, I.H. et al. Ischemia—reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. **Dig. Dis. Sci**, v. 49, n. 9, p. 1359–1377, 2004.
20. KALOGERIS, T. et al. Ischemia/Reperfusion. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 1, p. 113-70, 2016.
21. VERCESI, A. E et al. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 129, p. 1-24, 2018.
22. PARKS, D.A.; WILLIAMS, T.K.; BECKMAN, J.S. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. **Am. J. Physiol**, v. 254, n. 5, p. 768–774, 1988.
23. THURMAN, J.M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. **Clin. Immunol.** v. 123, n. 1, p. 7–13, 2006.
24. ZINGARELLI, B. et al. Diverse cardioprotective signaling mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and ciglitazone, in reperfusion injury: role of nuclear factor-kappaB, heat shock factor 1, and Akt. **Shock**, v. 28, n. 5, p. 554–563, 2007.
25. MOUCHREK FILHO, V. E. **Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e aceitação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie Pimenta dioica Lindl.** Orientador: Gilberto Orivaldo Chierice. 2000.124 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

26. MARTIN, S. et al. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. **Planta Medica**, v.59, n. 6, p.533-536,1993.
27. FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug Discov Today**, V. 24, n. 5, p. 1157–1165, 2019.
28. KAR, S.; LESZCZYNSKI, J. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. **Expert Opin Drug Discov**, v. 15, n. 12, p. 1473–1487, 2020.
29. SUSHKO, I. et al. Online chemical modeling environment (OCHEM): web platform for data storage, model development and publishing of chemical information. **J. Comput. Aided. Mol. Des.**, v. 25, n. 6, p. 533–554, 2011.
30. GUAN, L. et al. ADMET-score—a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Med. Chem. Comm.**, v. 10, n. 1, p. 148–157, 2019.
31. JIA, C-Y. et al. A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 25, n. 1, p. 248–258, 2020.
32. PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. PkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **J. Med. Chem**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015.
33. CLARK, A. M. et al. Open source Bayesian models. 1. Application to ADME/Tox and drug discovery datasets. **J. Chem Inf. Model**, v. 55, n. 6, p. 1231–1245, 2015.
34. ZHOU, S.F.; LIU, J.P.; CHOWBAY, B. (2009) Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* 41: 89-295, 2009.

35. RAETHER, W. et al. Action of p-(4-amidino-phenoxy)-benzaldehyde-p-amidino-phenylhydrazone dihydrochloride on *Leishmania donovani* infections in the golden hamster. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 72, p. 543-547, 1978.
36. MCGRAW, J.; WALLER, D. Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 8, p. 371-382, 2012.
37. DEENEN, M. J. et al. Pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism part 2. **Oncologist**, v. 16, p. 820-834, 2011.
38. INGELMAN-SUNDBERG, M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 207, p. 52-56, 2005.
39. FLOCKHART, D. A; OESTERHELD, J. R. Cytochrome P450-mediated drug interactions. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am**, v. 9, p. 43-76, 2000.
40. BERKA, K. et al. Membrane position of ibuprofen agrees with suggested access path entrance to cytochrome P450 2C9 active site. **J Phys Chem A**, v. 115, p. 11248-11255, 2011.
41. CULHANE, A. C. et al. (2010) GeneSigDB--a curated database of gene expression signatures. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 716-725.
42. KITCHEN, D.B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
43. LEACH, A.R.; SHOICHET, B.K.; PEISHOFF, C.E. Docking prediction and scoring of protein-ligand interactions: successes and shortcomings. **J Med Chem**, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006.
44. LYU, J. et al. Ultra-large library docking to discover new chemotypes. **Nature**, v. 566, n. 7743, p. 224-229, 2019.

45. MUEGGE, I. A knowledge-based scoring function for protein-ligand interactions: probing the reference state. **Perspectiva Drug Discov Design**, V. 20, n. 1, p. 99-114, 2000.
46. BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I.D. Molecular recognition and docking algorithms. **Ann Rev Biophys Biomol Struct**, v. 32, n. 1, p. 335-373, 2003.
47. LIU, J.; WANG, R. Classification of current scoring functions. **J Chem Inform Model**, v. 55, n. 3, p. 475-482, 2015.
48. KIM, S. et al. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 49, p. 388-395, 2021.
49. 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. 1-13, 2017.
50. LEE, S. K. et al. The PreADME Approach: Web-based program for rapid prediction of physico-chemical, drug absorption and drug-like properties. **EuroQSAR 2002 Designing Drugs and Crop Protectants: processes, problems and solutions**, p. 418-420, 2002.
51. ZHAO, Y. H. et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 6, p. 749-784, 2001.
52. YAMASHITA, S. et al. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 195-204, 2000.
53. IRVINE, J. D. et al. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n.1, p. 28-33, 1999.

54. MA, X.L; CHEN, C.; YANG, J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 26, n. 4, p. 500-512, 2005.
55. LI, A.P. In Vitro Evaluation of Metabolic Drug-Drug Interactions: Concepts and Practice, in: Li, A.P. Drug-Drug Interactions in Pharmaceutical Development. **John Wiley & Sons**, p. 1-26, 2008.
56. AMES, B.N. et al. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 8, p. 2281-2285, 1973.
57. LIPINSKI, C.A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235-49, 2000.
58. LIPINSKI, C.A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.
59. VEBER, D.F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.
60. SUSSMAN, J.L. et al. Protein Data Bank (PDB): Database of Three-Dimensional Structural Information of Biological Macromolecules. **Acta Cryst**, v. 54, p. 1078-1084, 1998.
61. WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modeling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. 296-303, 2018.

62. TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, eficiente optimization, and multithreading. **Journal of Computacional Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455– 461, 2009.
63. GODDARD, T. D. et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. **Protein Sci**, v. 27, n. 1, p. 14-25, 2018.
64. PETTERSEN, E.F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021.
65. JURRUS, E. et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Sci**, v. 27, n. 1, p.112-128, 2018.
66. MORRIS, G.M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computacional Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.
67. SÁ JUNIOR, P.L. et al. Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell in vitro. **Phytomedicine**, v. 23, n. 7, p. 725–735, 2016.
68. GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity da rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, p. 3219-3228, 1980.
69. LASKOWSKI, R.A.; SWINDELLS, M.B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778-2786, 2011.
70. LIMA, F.M. et al. Low-Level Laser Therapy Restores the Oxidative Stress Balance in Acute Lung Injury Induced by Gut Ischemia and Reperfusion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 1, p. 179–188, 2013.

71. CASTRO, C.M.M.B. et al. Modulation by dexamethasone of phospholipase A₂ activities in endotoxemic guinea pigs. **Journal of Applied Physiology**, v. 79, n. 4, p. 1271-1277, 1995.
72. RIGHI, Nadjat et al. Chemical composition and in vivo/in silico anti-inflammatory activity of an antioxidant, non-toxic essential oil from *Thymus algeriensis* Boiss & Reut. **South African Journal of Botany**, v. 157, p. 64-74, 2023.
73. REDDY, Yenumala Vamshidhar. Swiss ADME predictions of phytoconstituents present in *Ocimum sanctum* Linn. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 12, n. 5, p. 17-26, 2023.
74. ALMINDER EJ, F. et al. Antioxidant activities of a new chemotype of *Piper cubeba* L. fruit essential oil (Methyleugenol/Eugenol): In Silico molecular docking and ADMET studies. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1534, 2020.
75. BANPURE, S. G.; VITTHAL, V. Chopade. Docking Study of Selected Phytoconstituents with Acetylcholine Esterase and BChE for its Anti-alzheimers Activity. **International Journal of Drug Delivery Technology**, v. 12, n. 3, p. 1413-1417, 2022.
76. CHOI, Y.K. et al. Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. **Free Raical Research**, v. 44, n. 8, p. 925-935, 2010.
77. KHAYAT, M. T. et al. Integracides: Tetracyclic Triterpenoids from *Fusarium* sp.— Their 5-Lipoxygenase Inhibitory Potential and Structure–Activity Relation Using In Vitro and Molecular Docking Studies. **Life**, v. 12, n. 12, p. 2095, 2022.
78. KUNDU, S.; N, S. Discovery of pharmacological agents for triple-negative breast cancer (TNBC): molecular docking and molecular dynamic simulation studies on 5-lipoxygenase (5-LOX) and nuclear factor kappa B (NF-κB). **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-14, 2023.

79. SAHU, Ankita et al. In silico library design, screening and MD simulation of COX-2 inhibitors for anticancer activity. In: **Proceedings of the 12th International Conference**. 2020. p. 21-32.
80. UTAMI, W. et al. In silico anti-inflammatory activity evaluation of some bioactive compound from ficus religiosa through molecular docking approach. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2020. p. 012024.
81. WIYONO, Anang Setyo et al. Molecular docking of 5-o-benzoylpinostrobin derivatives from Boesenbergia pandurata roxb. as anti-inflammatory. **Journal of Public Health in Africa**, v. 14, n. Suppl 1, 2023.
82. MAHGOUB, Shahenda et al. Polyphenolic profile of Callistemon viminalis aerial parts: Antioxidant, anticancer and in silico 5-LOX inhibitory evaluations. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2481, 2021.
83. MEŠTROVIĆ, J. et al. Efeito protetor do urapidil na lesão de torção-detorção testicular em ratos. **Surg Today**, v. 47, n. 3, p. 393–398, 2017.
84. CELIK, E. et al. Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. **Archives of Medical Science**, v. 12, n. 5, p. 928-934, 2016.
85. ARENA, S. et al. Medical perspective in testicular ischemia-reperfusion injury. **Exerimental and Theraeutic Medicine**, v. 13, n. 5, p. 2115-2122, 2017.
86. HARRISON, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 6, p. 774–797, 2002.
87. SALEH, Hanan; EL-SHORBAGY, Haidan M. Mechanism underlying methyl eugenol attenuation of intestinal ischemia/reperfusion injury. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 10, p. 1097-1105, 2017.

88. LIN, Zhi-Liang et al. Protective effects of terminal ileostomy against bacterial translocation in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion injury. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 47, p. 17905, 2014.
89. LIU, Xu-Hui et al. Protective role of adiponectin in a rat model of intestinal ischemia reperfusion injury. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 47, p. 13250, 2015.
90. NEZU, Yoshinori et al. Effects of small intestinal ischemia and reperfusion on expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 messenger RNAs in the jejunum, liver, and lungs of dogs. **American journal of veterinary research**, v. 69, n. 4, p. 512-518, 2008.
91. DE PAULA PORTO, Marilia et al. Citral and eugenol modulate DNA damage and pro-inflammatory mediator genes in murine peritoneal macrophages. **Molecular biology reports**, v. 41, p. 7043-7051, 2014.
92. BACHIEGA, Tatiana Fernanda et al. Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 610-616, 2012.
93. ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicology in vitro**, v. 19, n. 8, p. 1025-1033, 2005.

Anexo A

ESPECTRO DE MASSAS

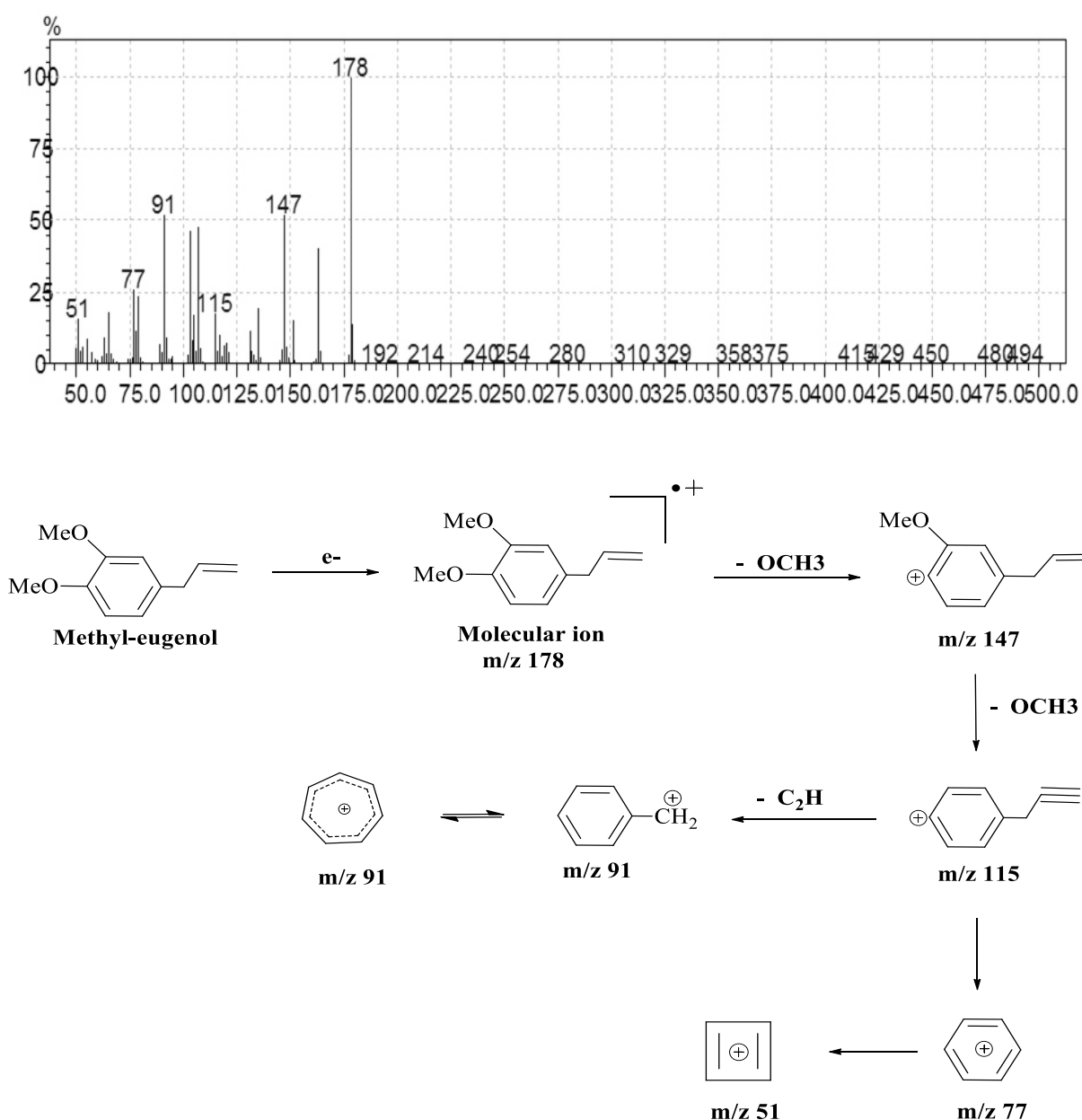


Figura A.1. Espectro de massas do ME.