



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA DE ANDRADE

**NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA
CARREADAS COM EUGENOL COMO PROPOSTA PARA
TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA.**

**TERESINA- PI
2019**

FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA DE ANDRADE

**NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA CARREADAS COM
EUGENOL COMO PROPOSTA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química Inorgânica.
Orientador: Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes

TERESINA- PI
2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

A553n Andrade, Francisco das Chagas Pereira de.
Nanopartículas de albumina sérica bovina carregadas com
eugenol como proposta para tratamento de câncer de mama /
Francisco das Chagas Pereira de Andrade. – 2019.
110 f.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal
do Piauí, Teresina, 2019.

“Orientador: Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes”.

1. Ciclo-oxigenase. 2. Docking. 3. Inflamação.
4. In silico. 5. Lipoxigenase. I. Título.

CDD 546

**NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA CARREADAS COM
EUGENOL COMO PROPOSTA PARA TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**

FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA DE ANDRADE

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

Aprovado em: ____ de _____ de 2019.

Membros da Banca:

Profa. Dr. Anderson Nogueira Mendes
(Presidente da Banca – UFPI)

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho
(Efetivo – UFPI)

Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima
(Efetivo – UESPI)

TERESINA – PI
2019

“O conhecimento da natureza é o caminho para a admiração do Criador”
Justus von Liebig (Químico alemão).

À Maria Sofia

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes, por todo conhecimento e experiência partilhada, por toda a paciência, compreensão e disponibilidade. Sua orientação foi imprescindível para o meu desenvolvimento científico, acadêmico, profissional e pessoal.

À minha amada esposa, Maria da Conceição Leite da Silva, a quem também dedico este trabalho, por todo o apoio, compreensão e sacrifício pessoal.

A toda minha família, especialmente meu pai, Domingos de Andrade Pereira, minha mãe, Maria Lucia Pereira e minhas irmãs, Maria da Luz e Maria Vanessa, pelo o apoio e incentivo constantes.

A todos os membros do Laboratório de Ciência, Inovação e Tecnologia (LACITEC), pelo companheirismo e a amizade prestadas, que muito contribuíram para que eu chegasse ao final desta empreitada.

E, principalmente, ao meu Senhor e meu Deus, sem o qual nada seria e do qual provem toda ciência, todo conhecimento e toda sabedoria.

RESUMO

Nanopartículas de albumina fornecem efeitos terapêuticos seguros e apresentam vantagens adicionais como, proteção da droga encapsulada contra degradação enzimática, capacidade de permear barreiras biológicas, liberação de droga carregada ou adsorvida a uma taxa controlada e predeterminada e capacidade de atingir o nível intracelular. O Eugenol (2-metoxi-4-prop-2-enilfenol), sendo um membro da classe dos alilbenzenos, mostra várias outras ações farmacológicas interessantes, incluindo ações antioxidante, anti-inflamatória, antiespasmódica, antidepressiva, antigenotóxica e anticarcinogênica. Avaliações *in silico* e de ancoragem molecular do eugenol buscam estudar e compreender as classes-alvo, os dados de ADMET e as interações do eugenol com as proteínas COX-1/2 e LOX visando compreender a atuação anti-inflamatória da substância, e sua possível ação anticancerígena na prevenção e no tratamento do câncer de mama. O ADMET *in silico* do eugenol mostra resultados farmacocinéticos semelhantes aos anti-inflamatórios não esteroidais, como diclofenaco e aspirina. Os testes de ancoragem molecular evidenciam a dupla inibição do eugenol COX1/2-5LOX, indicando uma excelente atividade analgésica e anti-inflamatória da substância, prevendo menor irritação gástrica, efeitos colaterais hemorrágicos e ulcerogênicos reduzidos; evidenciando-o como alternativa interessante no desenvolvimento de fármacos que aliviem a inflamação com maior segurança. Após analisados os resultados teóricos foram preparadas nanopartículas de albumina de soro bovino (BSA), com um diâmetro médio de cerca de 170 nm, boa estabilidade hidrodinâmica, denotada pelo valor de potencial zeta de -36,8 mV; posteriormente, foram produzidas nanopartículas de albumina carregadas com eugenol (BSA@EU) com características semelhantes às proteínas da matriz polimérica produzidas inicialmente, apresentando diâmetro médio de 120 nm e boa estabilidade hidrodinâmica. Dados de DLS e AFM evidenciaram a formação de nanoestruturas com manutenção da estrutura básica da proteína, os dados espectroscópicos de infravermelho e Raman mostraram a capacidade de ligação do eugenol à estrutura nanoproteica dos sistemas produzidos, os dados de ancoragem e a análise computacional preveem a capacidade de dupla inibição da cascata do ácido araquidônico, demonstrando a capacidade anti-inflamatória do eugenol, e seu potencial como agente anticancerígena.

Palavras-chave: Inflamação; Ciclo-oxigenase; Lipoxigenase; *In silico*; *Docking*

ABSTRACT

Albumin nanoparticles provide safe therapeutic effects and have additional advantages such as protection of the encapsulated drug against enzymatic degradation, ability to permeate biological barriers, release of drug-borne or adsorbed drugs at a predetermined controlled rate, and ability to reach intracellular level. Eugenol (2-methoxy-4-prop-2-enylphenol) is a member of the chemical class of allylbenzene and presents several interesting pharmacological actions, including antioxidants, anti-inflammatory, antispasmodic, antidepressant, antigenotoxic and anticarcinogenic action. DFT calculation and molecular docking study evaluation of eugenol it seeks to study and understand the target classes by ADMET data and eugenol interactions with COX-1/2 and LOX proteins in order to understand the anti-inflammatory activity of the substance, and its possible anticancer action in the prevention and treatment of breast cancer. Eugenol ADMET test has demonstrated pharmacokinetic results similar to NSAIDs such as diclofenac and aspirin. Eugenol docking tests has evidenced double inhibition of eugenol COX1/2-5LOX, this indicates excellent analgesic and anti-inflammatory activity of the substance, predicting less gastric irritation, hemorrhagic and ulcerogenic side effects; and presenting it as an interesting alternative in the development of safer drugs for the treatment of inflammation processes. Bovine serum albumin (BSA) nanoparticles were prepared with an average size of 170 nm presents good hydrodynamic stability, as denoted by the potential zeta value of -36.8 mV. Subsequently it was prepared eugenol-loaded albumin nanoparticles (BSA@EU) presenting characteristics similar to the initially produced polymeric matrix proteins having an average diameter of 120 nm and a good hydrodynamic stability. AFM, DLS demonstrate the formation of nanostructures with maintenance of the basic structure of the protein. Spectroscopy techniques FTIR and Raman evidenced the ability of eugenol to bind to the nanoproteic structure of the produced systems. The docking and computational analysis predicted the ability to double inhibit the arachidonic acid cascade, demonstrating the anti-inflammatory ability of eugenol and potential anticancer action.

Keywords: Inflammation; Cyclooxygenase; Lipoxygenase; In silico; Docking.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Síntese de prostaglandinas via ciclo-oxigenase (COX) a liberação catalítica do ácido araquidônico.....	5
FIGURA 2. Cascata do ácido araquidônico	6
FIGURA 3. Sítios ativos da COX1/2	7
FIGURA 4. Mama feminina com presença de cânceros mamários	8
FIGURA 5. Principais domínios e subdomínios da HSA.....	11
FIGURA 6. Diferentes tipos de nanopartículas baseadas em albumina.....	12
FIGURA 7. Espectros teóricos de infravermelho da albumina	15
FIGURA 8. Gráfico teórico de Espectroscopia Raman da albumina sérica bovina.....	17
FIGURA 9. Isômeros de posição do eugenol.	19
FIGURA 10. Características farmacológicas do eugenol.....	20
FIGURA 11. Espectro teórico de IR do eugenol obtido no Gaussian por cálculo de DFT	21
FIGURA 12. Análise in silico no preADMET	24
FIGURA 13. Gráfico de biodisponibilidade do Eugenol	38
FIGURA 14. Principais sítios ativos da albumina, e interações das moléculas	44
FIGURA 15. Sítios ativos e Ancoragem molecular do Eugenol na COX-2.	46
FIGURA 16. Ancoragem Molecular do diclofenaco na bolsa hidrofóbica COX-2	47
FIGURA 17. Ancoragem Molecular da aspirina nos sítios ativos da COX-2.....	48
FIGURA 18. Ancoragem Molecular do eugenol nos sítios ativos da COX-2.....	49
FIGURA 19. Ancoragem molecular do Eugenol com os sítios ativos da 5-LOX.....	51
FIGURA 20. Energia de Ligação versus RMSD: interações do eugenol com COX-2.....	53
FIGURA 21. Gap HOMO-LUMO do eugenol calculado pelo método DFT	54
FIGURA 22. (A) DLS das nanopartículas de BSA; (B) DLS das nanopartículas de BSA@EU	55
FIGURA 23. Potencial zeta das nanopartículas de BSA_Pura e BSA@EU	56
FIGURA 24. Microscopia de Força Atômica (AFM) das nanopartículas de BSA	57
FIGURA 25. FTIR: eugenol	58
FIGURA 26. Deconvolução da banda de amida I - região de 1750 a 1550 cm^{-1}	59
FIGURA 27. Espectro Raman das nanopartículas de albumina.....	60
FIGURA 28. Espectroscopia Raman – ligações dissulfeto BSA_Pura NP's	61
FIGURA 29. Espectroscopia Raman BSA@EU NPs	62
FIGURA 30. Atividade hemolítica (A) eugenol; (B) nanopartículas de BSA pura;	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais bandas do espectro FTIR do eugenol.....	22
Tabela 2. Faixa de qualificação no banco de dados do CMC.....	25
Tabela 3. ADME: comparação entre o eugenol e os AINES diclofenaco e aspirina.	37
Tabela 4. Toxicidade: comparação entre o eugenol e os AINES diclofenaco e aspirina.	39
Tabela 5. Tipos de Interação e Aminoácidos envolvidos na Inibição da de Cox-2.....	41
Tabela 6. Energias de ligação entre o eugenol e os AINES e os sítios ativos da COX-2	50
Tabela 7. Interações do Eugenol nos sítios ativos da COX-2 e 5-LOX.	52
Tabela 8. Estruturas PBD.	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ΔG – energia livre de Gibbs

ΔG_{lig} – energia livre de Gibbs de ligação

ΔH – variação de entalpia

ΔS – entropia

$\mu\text{g/mol}$ – micrograma por mol

μL – microlitro

μm – micrômetro

15(R) - HETE – 15(R) – hidroxieicosatetraenóico

2D – espaço bidimensional (computação gráfica)

3D – espaço tridimensional (computação gráfica)

6-31G* – conjunto de bases polarizadas definido para os átomos H a Zn

AA – ácido araquidônico

ADME – administração, distribuição, metabolismo e excreção

ADMET - administração, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

AFM – *Atomic Force Microscopy* (microscopia de força atômica)

AINEs – anti-inflamatórios não esteroidais

Ala – alanina

AlogP – *atomic Log de P*

AMR - *Antimicrobial resistance* (resistência antimicrobiana)

AOs – *atomic orbitals* (orbitais atômicos)

Arg – arginina

Asn – asparagina

Asp – aspartato (ácido aspártico)

ATR - *Attenuated total reflection*

B3LYP – *Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr* (funcional híbrido de aproximações à energia de troca de correlação funcional na teoria do funcional da densidade – DFT)

BBB – *brain blood barrier* (barreira hematoencefálica)

BSA – *Bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

BSA@EU – albumina carregada com eugenol

BSA@UE NPs – nanopartículas de albumina carregadas com eugenol

°C – graus Celsius

Caco2 – linha contínua de células heterogêneas de adenocarcinoma colorretal epitelial humano

ClogP - *Compound logP*

COX – ciclo-oxigenase

CPU – *Central Processing Unit* (Unidade Central de Processamento)

Cys – cisteína

D - *distribution coeficiente* (coeficiente de distribuição)

DFT – *Densit Functional Theory* (teoria do funcional da densidade)

DLS – *dynamic light scattering* (difusão dinâmica da luz)

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido dessorribonucleico)

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EU – eugenol

eV – eletrovolts

FDA – *Food and Drug Admisnitration*

Fe³⁺ – Fe (III)

FEM – *Final Element Method*

FTIR – *Fourier transform infrared spectroscopy* (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)

Gln – glutamina (Glutamida)

Glu – glutamato (ácido glutâmico)

Gly – glicina

h – hora

hERg – gene humano relacionado ao éter-a-go-go

HF – Hartree–Fock

HIA – *human intestinal absorption* (absorção intestinal humana)

His – histidina

HOMO – *highest occupied molecular orbital* (orbital molecular ocupado de mais alta energia)

HSA – *Human serum albumin* (albumina sérica humano)

Hz – Hartz

ID – identidade

Ile – isoleucina

iLOGP - *implicit log P method*

IR – *infrared*

K – Kelvin

k – quilo

K_a – constante de acidez

K_{eq} – constante de equilíbrio de ligação

LCAO – *linear combination of atomic orbitals* (orbitais moleculares combinados linearmente)

Leu – leucina

LH – ligação de hidrogênio

ln – logaritmo natural

Log – logaritmo

Log BB – partição entre o sangue do plasma e do tecido cerebral

Log de P - coeficiente de partição n-octanol/água

LOX – lipoxigenase

LT – leucotrienos

LTB₄ – leucotrienos B₄

LTD₄ – leucotrienos D₄

LTE₄ – leucotrienos E₄

LUMO – *lowest unoccupied molecular orbital* (orbital molecular desocupado de mais baixa energia)

LYP – funcional de Lee–Yang–Parr

Lys – lisina

MD – *molecular dynamic* (dinâmica molecular)

MDCK – *Madin-Darby Canine Kidney* (Rim canino de Madin-Darby)

MDDR - *Molecular Detection of Drug Resistance* (Detecção Molecular de Resistência a Medicamentos)

Met – metionina

mg.L⁻¹ – miligramas por litro

mg.mL⁻¹ – miligramas por mililitro

min – minutos
mL – mililitros
MlogP – método de Moriguchi
MM – mecânica molecular
MOs – *molecular orbitals* (orbitais moleculares)
ms – milissegundos
mW – miliwatts
MWT – *molecular weight* (peso molecular)
NAB – *nanoparticle albumin-bound*
NIR – *next infrared*
nm – nanômetro
nm/sec – nanometro por segundo (em inglês)
NPs – nanopartículas
NTP – *National Toxicology Program*
P - *partition coeficiente* (coeficiente de partição)
PBS – *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)
pdb – formato de arquivo *Protein Data Bank*
PDB – *Protein Data Bank*
pdbqt – *Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)*
PGD2 – prostaglandina D2
PGE2 – prostaglandina G2
PGF2 – prostaglandina F2
PGG2 – prostaglandina G2
PGH2 – prostaglandina H2
PGHS – endoperóxido prostaglandina H sintase
PGI2 – prostaciclina
PGs – prostaglandinas
pH – produto hidrogeniônico
Phe – fenilalanina
PPB – *plasma protein bond* (ligação a proteína plasmática)

Pro – prolina

QM – quanto-mecânica

R – constante universal dos gases perfeitos

r – raio atômico

RHF – *restricted Hartree-Fock* (Hartree-Fock restrito)

RMSD – *Root Mean Square deviation* (desvio médio quadrático da raiz)

rpm – rotações por minutos

Rprop - *resilient backpropagation*

S.D. – *Standard Deviations* (desvio padrão)

SDF – *Spatial Data File*

Ser – serina

SERS – *Surface enhanced Raman spectroscopy* (Espectroscopia Raman amplificada por superfície)

SKlogP – LogP calculado por tipos atômicos pelo método de Sundaresan e Krishnaswamy

SMILES – *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (Especificação de entrada de linha de entrada molecular simplificada)

SNC – Sistema nervosa central

SS – ligação de enxofre

T – temperatura absoluta

TA - *Titrateable Acid* (ácido titulável)

TDDFT – *Time-dependent density functional theory* (Teoria funcional da densidade dependente do tempo)

TERS – *Tip-enhanced Raman spectroscopy* (Espectroscopia Raman com ponta aprimorada)

Thr – treonina

Trp – triptofano

TxA2 – tromoxano

Tyr – tirosina

UHF – *unrestricted Hartree-Fock* (Hartree-Fock não restrito)

US – *United States*

Uv – ultravioleta

Val – valina

VWN – funcional de Vosko, Wilk e Nusair

WDI – *Word Drug Index*

X-Ray – raio X

Z – número atômico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	3
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
3.1. Processos inflamatórios	4
3.2. Câncer de Mama	7
3.3. Nanopartículas	9
3.4. Albumina	10
3.4.1. <i>Nanopartículas de albumina</i>	11
3.4.2. <i>Infravermelho</i>	13
3.4.3. <i>Espectroscopia Raman</i>	15
3.5. Sonoquímica	17
3.6. Eugenol	19
3.7. Análise <i>in Silico</i> de ADMET	22
3.7.1. <i>PreADMET</i>	23
3.7.2. <i>SwissADME</i>	26
3.8. Ancoragem molecular	27
3.8.1. <i>Processo de ancoragem</i>	27
3.8.2. <i>Métodos Quânticos</i>	29
4. METODOLOGIA	32
4.1. Materiais	32
4.2. Análise <i>in silico</i>	32
4.2.1. Ensaio de administração, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET).....	32
4.2.2. Ancoragem Molecular	32
4.2.3. Métodos Quânticos	33
4.3. Produção das nanopartículas de BSA	34
4.3.1. Preparação das nanopartículas de albumina por dessolvatação assistida por ultrassom	34
4.3.2. Caracterização das nanopartículas de BSA e BSA@EU	34
4.3.3. Ensaio de atividade hemolíticas	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Ensaio de ADMET	37

5.2. Ancoragem Molecular	40
5.2.1. Ancoragem molecular do eugenol em BSA	40
5.2.2. Ancoragem molecular do eugenol e dos AINES diclofenaco e aspirina na COX.....	45
5.2.3. Ancoragem molecular do eugenol na 5-LOX.....	50
5.3. Validação da Processo de Ancoragem Molecular	52
5.3. Caracterização das nanopartículas de BSA e BSA@EU	55
5.3.1. Tamanho e morfologia.....	55
5.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	57
5.3.4. Espectroscopia Raman	60
5.4. Hemólise	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	79
APRÊNDICE A – ESPECTROS TEÓRICOS DE FTIR E RAMAN DA ALBUMINA E DO EUGENOL	80
APRÊNDICE B – INTERAÇÕES NO SÍTIO ATIVO DA COX-2	84
APRÊNDICE C – INTERAÇÕES NO SÍTIO ATIVO DA 5-LOX	86
APRÊNDICE D – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MOLÉCULAS ANALISADAS	88
ANEXOS	89

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta fisiológica normal que possui papel crucial na recuperação dos sistemas teciduais lesionados (MURATA, 2018). O processo inflamatório desempenha um papel importante na proteção do corpo contra lesões e infecções, mas também pode contribuir para o desenvolvimento de doenças graves, como o câncer. Doenças inflamatórias crônicas aumentam o risco de alguns tipos de câncer, e há fortes evidências epidemiológicas de que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), particularmente a aspirina, são poderosos agentes quimiopreventivos podendo ser associados a quimioterápicos (CRUSZ & BALKWILL, 2015). Esta descoberta oferece alvos para a prevenção e tratamento de doenças malignas e trouxe um grande potencial para novas estratégias de prevenção e tratamento do câncer.

O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais comum e uma das causas mais importantes de mortalidade entre as mulheres em todo o mundo; o número de mortes causados pela doença deve alcançar o número de 11 milhões por ano até 2030 (MOMENIMOVAHED, 2019). É uma doença clinicamente heterogênea que liga uma variedade de contribuintes e interações complexas que estão intimamente relacionadas à inflamação endógena. Evidências sugerem que a ciclo-oxigenase (COX-2), a aromatase, as prostaglandinas além de radicais livres podem estar envolvidas na patogênese do câncer de mama; e a COX-2 encontra-se superexpressa em 40% (quarenta por cento) no câncer de mama humano invasivo, estando relacionada à proliferação de células tumorais, metástase, sobrevida e níveis elevados de prostaglandina endógena. (BASU *et al*, 2015).

A literatura tem relatado o uso de diversos fitoquímicos naturais na prevenção e tratamento de diferentes tipos de cânceres inclusive do câncer de mama. O eugenol (2-metóxi-4-propen-2-enilfenol), principal componente do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), um fenilpropeno acessível, conhecido pela humanidade e utilizado como agente medicinal desde a antiguidade (KAUFMAN, 2015), mostra uma série de atividades farmacológicas diversas, incluindo ações antioxidantes, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, antidepressivas, antígenotóxicas e anticancerígenas (ZHANG *et al*, 2013), sendo empregado inclusive na formulação de composições para prevenção e tratamento de doenças inflamatórias e artrites (KAUFMAN, 2015; ZHAO *et al*, 2001), tratamento de câncer (BEZERRA & MORAIS, 2017), e no tratamento e prevenção do câncer de mama como regulador do processo de aromatase (ENAN, 2005). Atuando inclusive na indução de apoptose celular

(JAGANATHAN & SUPRIYANTO, 2012; MAKUNGA & BRECHT, 2016), além de apresentar ação anti-metastase (ABDULLAH *et al*, 2018).

Os efeitos farmacológicos do eugenol são complexos e dependem da concentração livre de eugenol à qual o tecido humano se encontre exposto (HIDALGO *et al*, 2009). A biodisponibilidade da substância está relacionada a forma como um fármaco é administrado sendo um pré-requisito para seus efeitos terapêuticos, e depende da velocidade e da extensão da sua absorção pelo organismo. A solubilidade de uma substância é determinante para sua liberação e absorção pelo organismo e extremamente importante na sua biodisponibilidade (BONAMICI, 2009). Por ser uma substância hidrofóbica o eugenol pode apresentar problemas de biodisponibilidade dependendo da forma como o composto for administrado.

Nanopartículas de albumina podem oferecer várias vantagens na entrega de substâncias e fármacos hidrofóbicos (GARRIGUE *et al*, 2005), como o eugenol, incluindo proteção da degradação enzimática, liberação controlada após administração oral, aumento da absorção intestinal e biodisponibilidade oral (NOSRATI *et al*, 2018). Também melhoram as propriedades físico-químicas dos fármacos em comparação com os sistemas convencionais; além de apresentarem benefícios adicionais como farmacocinética melhorada e uma diminuição significativa da toxicidade do fármaco (ONOUÉ, YAMADA, & CHAN, 2014). Oferecendo, além disso, a vantagem de poderem ser produzidas sob condições brandas por coacervação, dessolvatação controlada ou formação de emulsões (SALEHIABAR *et al*, 2018).

Devido à sua biocompatibilidade e funcionalidade química, a albumina tem sido proposta na literatura como uma das biomacromoléculas mais promissoras para a fabricação de sistemas nanoestruturados para administração controlada de fármacos (KUDARHA & SAWANT, 2017; ELZOGHBY, SAMY & ELGINDY, 2012). Nanopartículas de albumina também permitem melhorar as propriedades físico-químicas dos fármacos em comparação com os sistemas convencionais e apresentam ainda vantagens como farmacocinética melhorada e uma diminuição significativa na toxicidade do fármaco. Além de serem aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 2005 (VENTOLA 2017). O Abraxane[®], composição de nanopartículas de albumina incorporadas com paclitaxel (GREEN *et al*, 2006), foi o primeiro nanomaterial proteico aprovado pela FDA; após o Abraxane várias NPs adicionais ligadas à albumina (NABs) entraram em ensaios clínicos com o objetivo de melhorar a eficácia e a segurança de outras drogas, como NAB-docetaxel e Ontak[®] (PILLAI, 2014; VENTOLA, 2017).

As características vantajosas apresentadas pela albumina no desenvolvimento de nanopartículas proteicas para o carreamento de fármacos, bem como as características farmacológicas do eugenol e sua atuação anti-inflamatória e anticancerígena comprovada aliadas a aplicabilidade da sonoquímica na produção e funcionalização de materiais nanoestruturados permitiram que se desenvolvesse um novo método para produção de nanoesferas proteicas de albumina carregadas com eugenol utilizando-se um sistema de síntese pelo método de dessolvatação assistida por ultrassom.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a ação anti-inflamatória do eugenol e sua potencial ação anticancerígena e preparar nanocarreadores de albumina para administração da substância.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Investigar as características químicas e farmacocinéticas do eugenol através de ensaios *in silico* de absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade (ADMET).
- 2) Prever por meio de ancoragem molecular as interações do eugenol com os sítios ativos da albumina, para aplicação como nanosistemas.
- 3) Analisar a ação anti-inflamatória, e a possível ação antitumoral da substância pela análise das interações das moléculas de eugenol com os fragmentos de aminoácidos nos sítios ativos da COX e da LOX, obtidas por estudos de ancoragem molecular.
- 4) Preparar nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA), e albumina sérica bovina carregadas com eugenol, pelo método de dessolvatação assistida por ultrassom.
- 5) Estudar a morfologia, tamanho e estabilidade hidrodinâmica das nanopartículas produzidas por meio das técnicas de DLS, AFM e potencial zeta.
- 6) Analisar as interações entre a molécula de eugenol e a estrutura proteica da BSA por meio de técnicas espectroscópicas de FTIR e Raman.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Processos inflamatórios

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico a estímulos prejudiciais, como patógenos, células danificadas, compostos tóxicos ou irradiação; e está relacionada à patogênese de muitas doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e intestinais, diabetes, artrite e câncer (CHEN *et al*, 2018).

Embora os processos de resposta inflamatória dependam da natureza precisa do estímulo inicial e de sua localização no corpo, todos compartilham um mecanismo comum, que pode ser resumido da seguinte forma:

- 1) Reconhecimento dos estímulos prejudiciais por receptores da superfície celular;
- 2) Ativação das vias inflamatórias;
- 3) Liberação de marcadores inflamatórios; e
- 4) Recrutamento das células pró-inflamatórias.

Em resposta à lesão tecidual o corpo inicia uma cascata de sinalização química que estimula respostas destinadas a curar os tecidos afetados. Esses sinais ativam a quimiotaxia de leucócitos da circulação geral para locais de dano. Esses leucócitos ativados produzem citocinas que induzem respostas inflamatórias (CHEN *et al*, 2018). As prostaglandinas tem efeito sobre a produção de citocinas moduladoras da atividade inflamatória e desempenham um papel fundamental na geração da resposta inflamatória. Sua biossíntese é significativamente aumentada no tecido inflamado e eles contribuem para o desenvolvimento dos sinais cardinais da inflamação aguda (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

As prostaglandinas (PGs), metabólitos lipídicos do ácido araquidônico produzidos pela ação da enzima ciclo-oxigenase (COX); de funções homeostáticas, mediam mecanismos patogênicos, incluindo a resposta inflamatória, além de atuarem como fatores-chave na regulação fisiológica da homeostase gastrointestinal e renal. Como são produzidos a partir do ácido araquidônico pela ação das isoenzimas da ciclo-oxigenase (COX) sua biossíntese é bloqueada por medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), incluindo os seletivos para a inibição da COX-2.

A via da síntese das prostaglandinas se dá pela ciclo-oxigenase (COX-1/2) após a liberação catalítica do ácido araquidônico dos fosfolipídios da membrana celular pela

fosfolipase A2 dependente de cálcio. Após a conversão do ácido araquidônico pela ciclo-oxigenase em prostaglandina G2 (PGG₂), a PGG₂ é convertida em prostaglandina H2 (PPH₂) é metabolizado em prostaglandinas D₂, E₂, F₂, tromboxano (TxA₂) e prostacilina (PGI₂) por sínteses específicas. Como alternativamente a via da ciclo-oxigenase, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pela via lipoxigenase (LOX-5, LOX-12, e LOX-15) ou citocromo p450 em leucotrienos, lipoxinas e ácidos graxos hidroxilepoxieicosatetraenóicos (FIGURA 1).

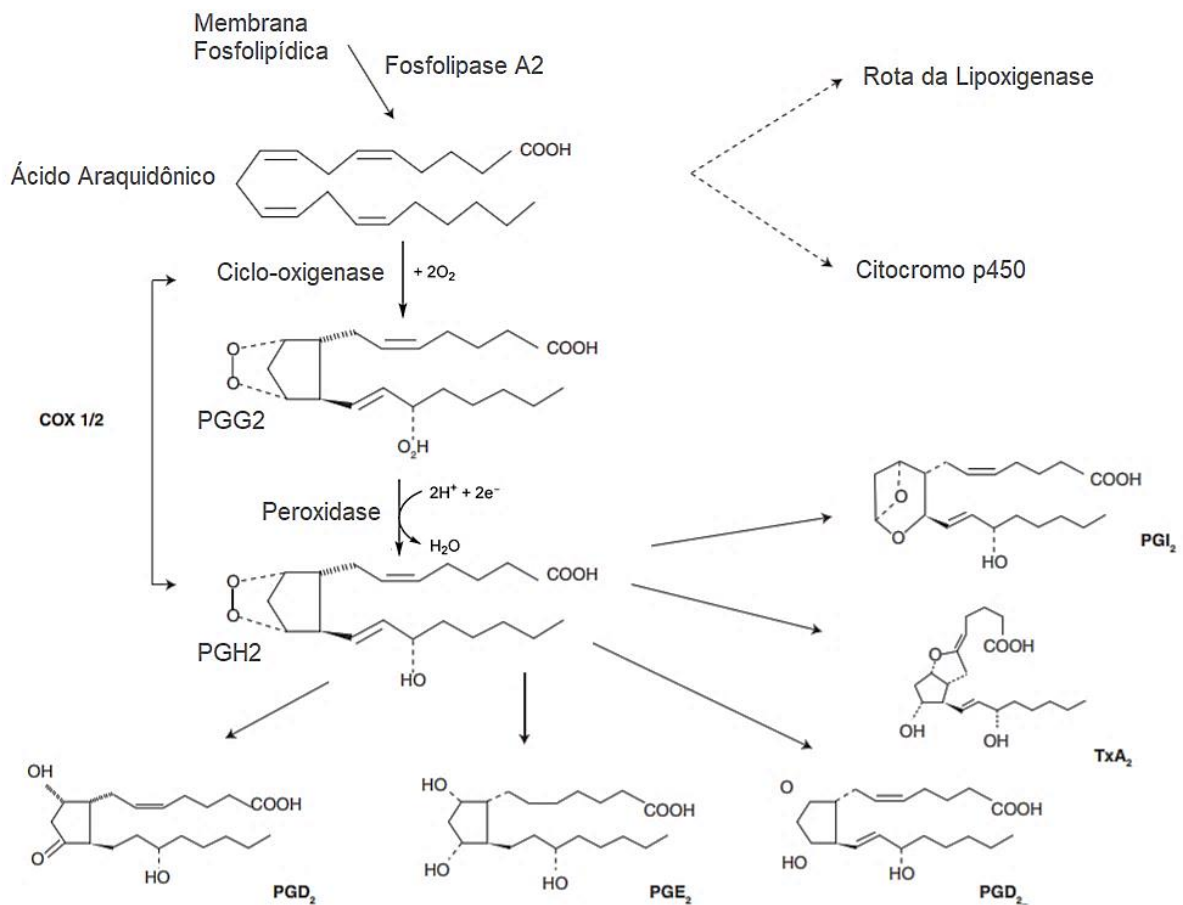


FIGURA 1. Síntese de prostaglandinas via ciclo-oxigenase (COX) da liberação catalítica do ácido araquidônico.

Fonte: Adaptado de Rajakariar *et al*, 2006.

Tanto os AINEs convencionais quanto os inibidores seletivos da COX-2 exercem sua atividade principalmente reduzindo a produção de PGs induzidas no processo inflamatório. A síntese de PGs é apenas uma parte da via do ácido araquidônico, sendo esse precursor um substrato que dá origem a muitos outros mediadores lipídicos, como os leucotrienos (LT) e as lipoxinas (LXs). Os próprios leucotrienos têm um papel importante no desenvolvimento e persistência do processo inflamatório; os PGs e LTs têm efeitos complementares, enquanto a

produção de LXs pode neutralizar as ações inflamatórias dos LTs (MARTEL-PELLETIER *et al*, 2003), (FIGURA 2). A inibição da ciclo-oxigenase (COX) e a inibição resultante da prostaglandina e outras sínteses eicosanóides mitigam dor, febre e inflamação.

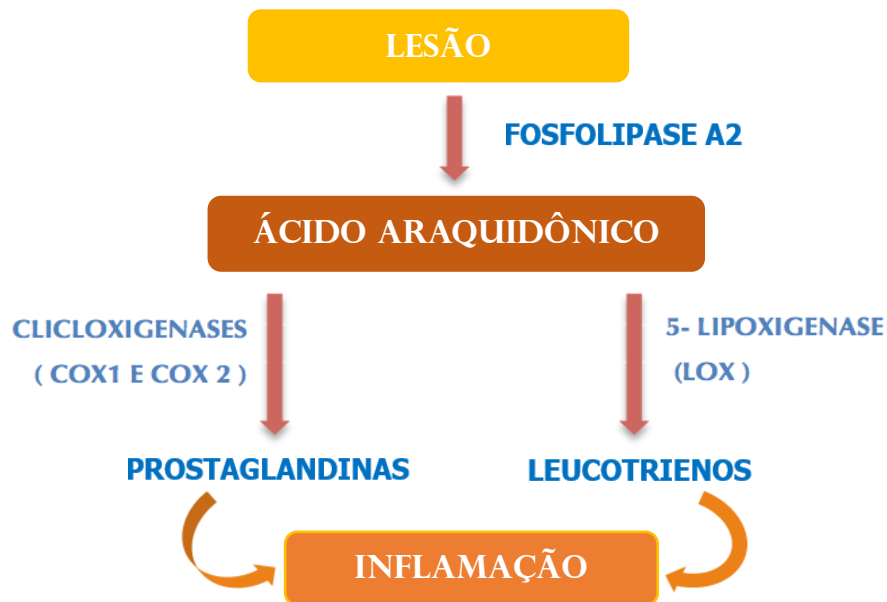


FIGURA 2. Cascata do ácido araquidônico
Fonte: adaptado de odontologistas.com.br

A enzima ciclo-oxigenase (COX), também conhecida como endoperóxido prostaglandina H sintase (PGHS), existe em duas isoformas: PGHS-1 ou COX-1 e PGHS-2 ou COX-2 (DRAHANSKY *et al*, 2016). Existem várias características comuns entre os sítios ativos de COX-1 e COX-2, o principal canal hidrofóbico, o resíduo catalítico Ser-530 e a presença de resíduos polares como Arg-120.

A COX-1 é caracterizada por apresentar um canal hidrofóbico principal mais estreito (MOHAMED *et al*, 2018) resultante da troca da val-523 na COX-2 por um resíduo de isoleucina (Ile), relativamente volumoso na COX-1 na mesma posição do sítio ativo da enzima (ZARGHI e ARFAEI, 2011) que torna o sítio ativo da isoenzima COX-2 (volume = 394 Å³) cerca de 25% maior do que o sítio ativo da isoenzima COX-1 (volume = 316 Å³). Essa abertura maior do sítio ativo da COX-2 permite maior acessibilidade de moléculas maiores que não seriam capazes de interagir com o sítio ativo da COX-1.

As isoformas de COX possuem dois sítios ativos, ciclo-oxigenase e peroxidase dependente de heme, que catalisam a conversão de AA em prostaglandina G₂ (PGG₂) e sua posterior conversão em PGH₂, respectivamente. No lado oposto da proteína do domínio de

ligação à membrana fosfolipídica, o sítio ativo da peroxidase consiste em um grupo heme posicionado no fundo de uma fenda rasa (ROUZER & MARNETT, 2009), (FIGURA 3).

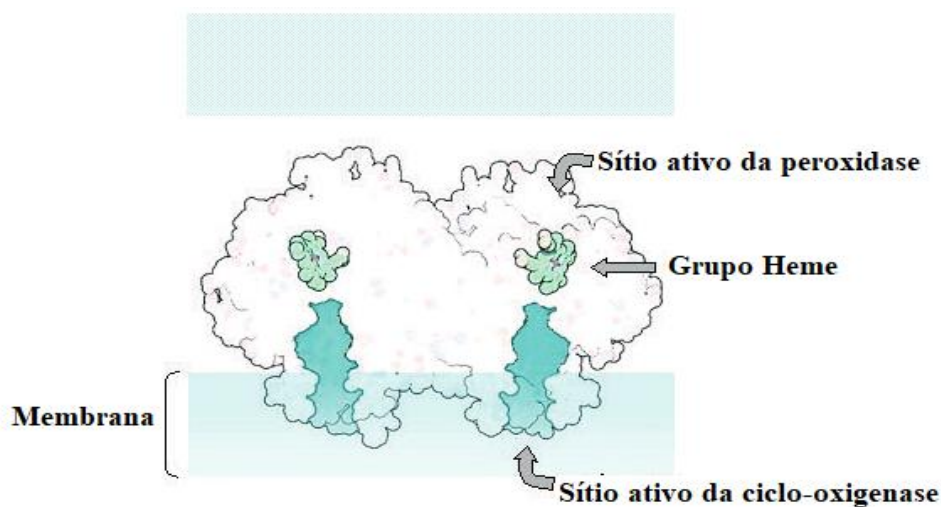


FIGURA 3. Sítios ativos da COX1/2
Fonte: Adaptado de Cardillo *et al*, 2005

Os inibidores seletivos de COX-2 ligam-se explicitamente ao sítio ativo do canal hidrofóbico resultando na inibição específica da atividade da proteína. Inibidores de COX-2 altamente potentes e seletivos devem possuir um farmacoforo que possa se ligar seletivamente no sítio ativo da proteína e entregar volume estérico suficiente para bloquear o canal hidrofóbico (BHARDWAJ *et al*, 2017). Entre os AINEs apenas a aspirina mostra-se capaz de ligar-se a ambos os sítios ativos da COX.

3.2. Câncer de Mama

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres e uma das causas mais importantes de mortalidade feminina em todo o mundo. É uma doença clinicamente heterogênea que liga uma variedade de contribuintes e interações complexas que estão intimamente relacionadas à inflamação endógena.

A ciclo-oxigenase (COX-2), a aromatase, as prostaglandinas além de radicais livres podem estar envolvidas na patogênese do câncer de mama (BASU *et al*, 2015). A COX-2 induzida pela inflamação pode estar superexpressa em até 40% (quarenta por cento) no câncer de mama humano invasivo estando correlacionada à proliferação de células tumorais, metástase, sobrevida e a níveis elevados de prostaglandina endógena. A prostaglandina E2

(PGE2), o principal prostanóide resultante da atividade da COX-2, é responsável pela promoção de múltiplos eventos celulares responsáveis pela progressão do câncer de mama: paralisia das células imunes antitumorais do hospedeiro, estimulação da migração e invasão das células tumorais, angiogênese associada a tumores e linfangiogênese resultantes da regulação positiva de fatores linfangiogênicos em células cancerígenas ou macrófagos infiltrantes em tumores (MAJUMDER *et al*, 2018).

Existem vários tipos de tumores que podem se desenvolver em diferentes áreas da mama: cistos (pacotes acumulados de líquido), fibrose (formação de tecido conjuntivo semelhante a cicatriz), nódulos e áreas de espessamento, sensibilidade ou dor na mama. A maioria dos cânceres de mama começa nas células que revestem os ductos (câncer ductal). Alguns começam nas células que revestem os lóbulos (câncer lobular), enquanto um pequeno número começa nos outros tecidos (SHARMA *et al*, 2010), (FIGURA 4).

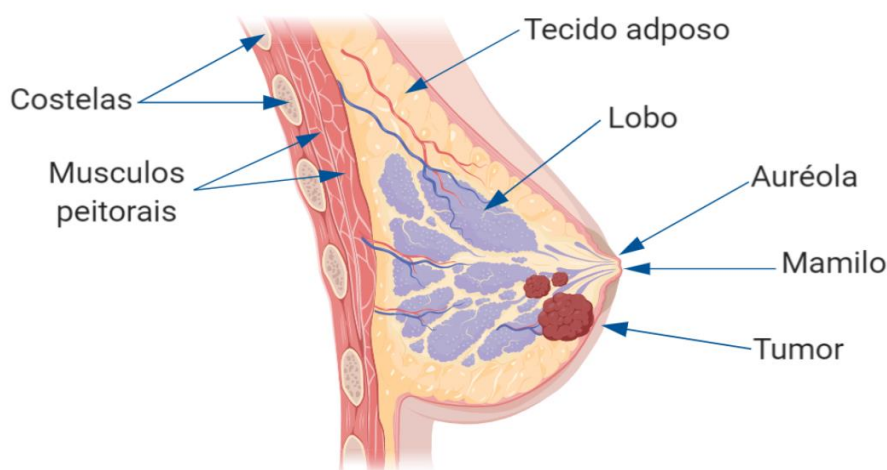


FIGURA 4. Mama feminina com presença de cânceres mamários

Fonte: Autor

Quanto aos tipos de tratamento do câncer de mama, os tratamentos convencionais removem ou destroem a doença na mama, mas afetam também os tecidos próximos, como os linfonodos. Esses tratamentos incluem: mastectomia, remoção do tumor e dos tecidos ao seu redor; radioterapia, que utiliza ondas de alta energia para matar células cancerígenas; quimioterapia, uso de drogas para matar células cancerosas; terapia hormonal, uso de drogas para impedir que os hormônios, especialmente o estrogênio, estimulem o crescimento de células de câncer de mama. E são usados geralmente de forma combinada e provocam diferentes efeitos colaterais.

A aplicação farmacológica de nanodispositivos e nanosistemas é uma nanotecnologia que tem permitido novas possibilidades de aplicações da nanotecnologia no diagnóstico, tratamento e prevenção de câncer de mama, dado que o tamanho pequeno característico e a possibilidade de revestimento especial das nanopartículas facilitam a entrega de drogas anticâncer hidrofóbicas a locais específicos com opsonização reduzida por mecanismos de defesa do corpo (HUSSAIN, KHAN & MURTAZA, 2018).

O uso de nanopartículas para liberar drogas diretamente em um tumor é uma área crescente de pesquisas sobre o câncer. A tecnologia usa nanopartículas para liberação controlada de fármacos diretamente no local do tumor, oferecendo efeitos colaterais bastante reduzidos. Além disso, a abordagem direcionada possibilita que uma menor carga de drogas seja necessária para matar as células cancerígenas.

3.3. Nanopartículas

O uso de nanopartículas para entrega de fármacos têm vantagens tais como proteger o fármaco encapsulado da degradação enzimática, capacidade de penetrar através de barreiras biológicas, libertar o fármaco aprisionado ou adsorvido numa taxa controlada e predeterminada e a capacidade de atingir o nível intracelular (WILSON *et al*, 2015).

O desenvolvimento de nanossistemas e nanopartículas para administração de fármacos é aceito como tendo um papel importante no tratamento de várias doenças potencialmente fatais por fornecerem efeitos terapêuticos seguros. Nanopartículas de matriz proteica apresentam resultados promissores para administração nas formas nasal, pulmonar, oral e ocular, entrega de genes não virais, penetração barreira hematoencefálica, e ação como adjuvante imunológico (SEKAR *et al*, 2017; VERMA *et al*, 2018; MAITI *et al*, 2018). Existem numerosos métodos químicos e físicos para a fabricação de NPs proteicas, incluindo coacervação de pH, dessolvatação e homogeneização de alta pressão (SAFAVI *et al*, 2017; KOUCHAKZADEH & SAFAVI, 2015).

Existe uma variada gama de aplicações para bionanomateriais; nanopartículas de proteína, como por exemplo, apresentam um enorme potencial em aplicações biomédicas, principalmente devido à sua biocompatibilidade e estabilidade química (BHOGALE *et al*, 2014). Nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA NPs) são muito populares como sistemas de veículos não tóxicos e não-virais para administração de drogas usados em várias

estratégias terapêuticas a serem consideradas no combate a cânceres, tumores, doenças hormonais associadas e neurodegenerativas (BHOGALE *et al*, 2014).

3.4. Albumina

A albumina apresenta vantagens no emprego para o desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos por ser um polímero natural biocompatível não-imunogénico, atóxico, biodegradável e hidrossolúvel; e seus produtos de degradação não são prejudiciais ao organismo (WILSON *et al*, 2015). Além disso, apresenta destaque pela ampla gama de aplicações biomédicas, como tecido e órgão artificiais, sistema de liberação de drogas, biossensor, imunoensaio em fase sólida, separação de células imunomagnéticas e enzimas e/ou catalisadores imobilizados e assim por diante (ASHA JHONSI, KATHIRAVAN & RENGANATHAN, 2009).

Albumina sérica é uma importante proteína de transporte em meios humorais do sistema circulatório (NASHAAT *et al*, 2018). Ao contrário das outras proteínas de transporte, que interagem seletivamente com classes particulares de ligantes, a albumina é capaz de carrear compostos de diferentes naturezas químicas (TAN & HO, 2018). Isto é possível porque existem algumas áreas conformacionalmente lábeis na estrutura da proteína que são capazes de se adaptar a diferentes grupos químicos e formar centros de ligação altamente ativos em interação com diferentes tipos de ligantes (FIGURA 5).

A albumina sérica bovina (BSA) e a albumina sérica humana (HSA) são as duas albuminas séricas mais extensivamente estudadas e empregadas no desenvolvimento de nanodispositivos e nanopartículas proteicas; apresentam alta similaridade em sua conformação, número de ligações dissulfeto, série de alças e montagem em subdomínios (MANJUBAASHINI *et al*, 2018). Estas albuminas séricas têm uma alta analogia pela sua capacidade de ligação – apresentam vários sítios de ligação com fármacos, e também possuem ampla aplicação para o *design* de sistema de liberação de fármaco (SEKAR *et al*, 2017). O que justifica sua aplicação como matriz de liberação de fármacos à base de nanopartículas (FONSECA, KHALIL & MAINARDES, 2017).

Nanopartículas de albumina apresentam vantagens para a entrega seletiva de drogas para tratamento de câncer, uma vez que células tumorais são recrutadoras de albumina, além de que, drogas aprisionadas em nanopartículas proteicas, como as nanopartículas de albumina,

podem ser facilmente liberadas no meio celular pela ação da enzima protease (VERMA *et al*, 2018).

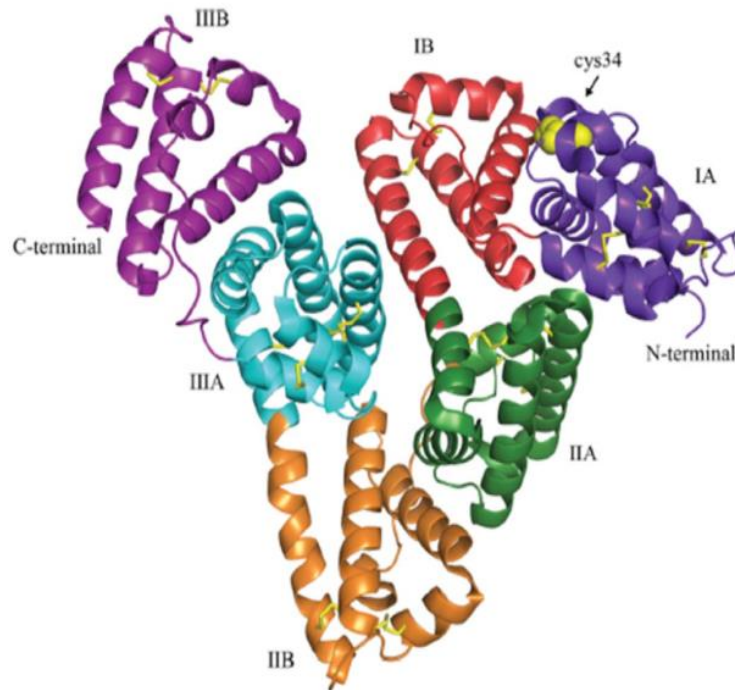


FIGURA 5. Principais domínios e subdomínios da HSA
Fonte: Kudarha e Sawant 2017.

3.4.1. Nanopartículas de albumina

Devido à sua biocompatibilidade e funcionalidade química, a albumina tem sido vista como uma das biomacromoléculas mais promissoras para a fabricação de sistemas nanoparticulados (HAZANI *et al*, 2016). Em 2005, as primeiras nanopartículas baseadas em albumina sérica humana contendo paclitaxel, abraxane1, foram aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA), (WILSON *et al*, 2014; JENITA, WILSON & CHOCALINGAM, 2014).

Além de permitir o desenvolvimento de diversos tipos de dispositivos nanoparticulados (FIGURA 6) a albumina ainda oferece a vantagem de poderem ser produzidas sob condições brandas por coacervação, dessolvatação controlada ou formação de emulsões (SALEHIABAR *et al*, 2018).

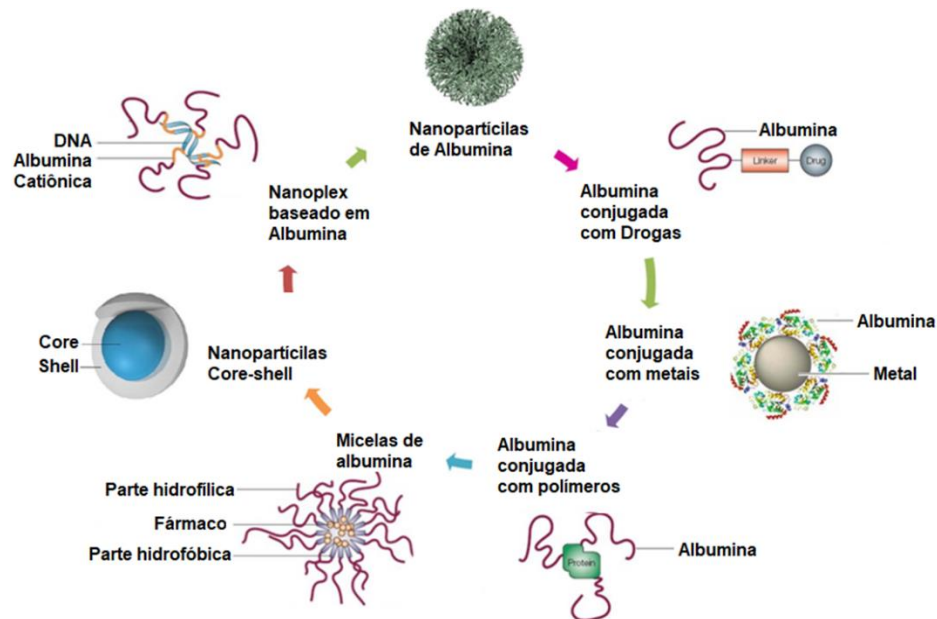


FIGURA 6. Diferentes tipos de nanopartículas baseadas em albumina
Fonte: Adaptado de Kudarha & Sawant 2017

As nanopartículas de albumina podem oferecer várias vantagens para a entrega de fármacos, incluindo proteção da degradação enzimática, liberação controlada após administração oral, aumento da absorção intestinal e biodisponibilidade oral (NASHAAT *et al*, 2018). Também melhoram as propriedades físico-químicas dos fármacos em comparação com os sistemas convencionais e apresentam várias vantagens com farmacocinética melhorada e uma diminuição significativa da toxicidade do fármaco (FONSECA, KHALIL & MAINARDES, 2017).

A análise das alterações conformacionais induzidas pela ligação na estrutura secundária de biomoléculas *in vitro* após interação com nanopartículas é um parâmetro muito significativo em termos de determinação de sua biocompatibilidade *in vivo* (SEKAR *et al*, 2017). E podem ser investigadas por espectroscopia vibracional e, inclusive, podem ser utilizadas para a caracterização e determinação dos diferentes tipos de nanopartículas de albumina, por meio de diferentes técnicas espectroscópicas, como técnicas de infravermelho e Raman.

Espectroscopia vibracional, incluindo infravermelho (IR) e espectroscopia Raman medem as oscilações de átomos em moléculas. A observação das transições vibracionais produz informações sobre os níveis de energia de vibração molecular, que por sua vez estão ligadas a conformação molecular, estrutura, interação intermolecular e ligação química.

O efeito Raman é um fenômeno inelástico de dispersão de luz, previsto em 1923 por Smekal e descoberto experimentalmente em 1927 por Raman e Krishnan. Foi aplicado

posteriormente como um meio de investigação em vibrações e rotações moleculares (LI & CHURCH, 2014).

Sinais de Raman e Infravermelho (FTIR) são capazes de revelar produção de NP's de matriz proteica, como nanopartículas de BSA por exemplo, observando-se as mudanças no rearranjo conformacional em proteína, bem como a incorporação de fármacos as NPs produzidas. O espectro Raman pode ainda confirmar forma esférica das NPs e a adsorção de estruturas à sua superfície, além de fornecer dados sobre a manutenção da estrutura secundária da proteína.

3.4.2. Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (IR) é comumente relatada na literatura como técnica para a caracterização de nanopartículas de natureza diversa, incluindo NPs metálicas e nanomateriais de carbono, bem como nanopartículas de *core-shell* e híbridas. A caracterização de carreadores por análise de infravermelho pode ser usada para identificar as interações químicas funcionais de NPs, podendo ser empregada para caracterizar o carregamento de: o fármaco desejado; ingredientes ativos biológicos; moléculas hormonais; DNA quimérico com sistema de entrega alvo eficiente; portadores de nanodispositivos e nanoveículos biocompatíveis atóxicos, não-alérgicos e não-virais (RANI, 2016).

É uma técnica que fornece dados altamente discriminatórias devido à excitação de transições vibracionais fundamentais inerentemente específicas características de espécies moleculares. Nanopartículas de natureza diversa, e os grupos funcionais presentes em sua superfície, podem ser caracterizadas e determinadas usando diferentes técnicas espectroscópicas na faixa do infravermelho. Os métodos de IR fornecem também informações complementares e dinâmicas insuperáveis sobre a composição química desses materiais, o que idealmente complementa a caracterização exaustiva de outros métodos (LÓPEZ-LORENTE & MIZAIKOFF, 2016).

A espectroscopia de IR também permite a identificação dos diferentes ligantes ligados à superfície dessas nanopartículas de acordo com a presença das bandas características nos espectros vibracionais; é uma técnica que pode ser empregada de maneira rápida, precisa e não destrutiva. A espectroscopia de Infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) é uma técnica que fornece informações sobre os detalhes estruturais das proteínas em solução com maior resolução espacial e temporal (VERMA *et al*, 2018).

Para análise de nanopartículas de albumina, espectroscopia FTIR pode ser projetada para ser escaneada na faixa de 400-4000 cm^{-1} (RANI, 2016). Esse tipo de espectroscopia não permite apenas a identificação das NPs de albumina, mas também torna possível o estudo da interação proteína-proteína ou com outras moléculas, e ainda pode ser usada para analisar o encapsulamento de moléculas bioativas nas NPs (YADAV *et al*, 2014).

As características moleculares das NPs de BSA também podem ser caracterizadas por FTIR (RANI, 2016). As nanopartículas de albumina podem ser diretamente avaliadas devido à absorção intrínseca do infravermelho, também podem ser caracterizados os grupos funcionais ligados à sua superfície. Os grupos funcionais de albuminas são marcadores importantes para a caracterização de infravermelho, em razão de que qualquer ligação de um fármaco pode alterar a superfície das nanopartículas, no entanto, o principal problema para o estudo de infravermelho em proteínas hidrossolúveis é a deformação de grupos OH referentes às moléculas de água na região do modo vibracional das amidas primárias, entre 1600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} , sobrepondo diretamente o modo vibracional de flexão de OH em 1640 cm^{-1} (BOUHEKKA & BÜRGI, 2012). Como a albumina é solúvel em água, os resíduos de água devem ser removidos das amostras antes da análise do espectro de proteínas.

As bandas características de adsorção de BSA em 1644 cm^{-1} e 1525 cm^{-1} são atribuídos à adsorção por vibração de deformação de amida primária (R-NH₂) e amida secundária (R-NH-R), respectivamente (SALEHIABAR *et al*, 2018). Normalmente, a posição da banda da amida primária para a BSA ocorre na região de 1600-1700 cm^{-1} e a banda da amida secundária perto de 1548 cm^{-1} (JHONSI, KATHIRAVAN & RENGANATHAN, 2009), uma banda adicional próxima a 1700 cm^{-1} correspondem a estiramento de C=O (SEKAR *et al*. 2017).

Bandas intensas são esperados próximo a 3380 cm^{-1} referente a vibração de alongamento de OH, a 3110 cm^{-1} atribuído aos grupos metila; a 1700 cm^{-1} de amida primária (principalmente vibrações de estiramento C=O), a 1530 cm^{-1} de amida secundária (fase de acoplamento da vibração de flexão de NH e alongamento de vibração de bandas CN) e em 1240 cm^{-1} , atribuído a amida terciária (fase combinação de NH em flexão e alongamento CN), (RANI, 2016).

Bandas no FTIR características de NPs de BSA preparados usando o método de dessolvatação podem ser observadas em 3381 cm^{-1} , atribuídos à vibração de estiramento de OH; em 2958 e 2932 cm^{-1} vibrações de estiramento atribuídas a C-H e em 2873 cm^{-1} vibração C-H de compostos metóxi; em 1642 e 1292 cm^{-1} , atribuídas a vibração aproximada do grupo amida, estiramento C-C e C-N, respectivamente (RANI, 2016). Outras bandas de forte

intensidade de C = C aromático aparecem entre 1630 e 1515 cm^{-1} ; e bandas de intensidade média entre 1143 e 1019 cm^{-1} de C-O-C (FIGURA 7).

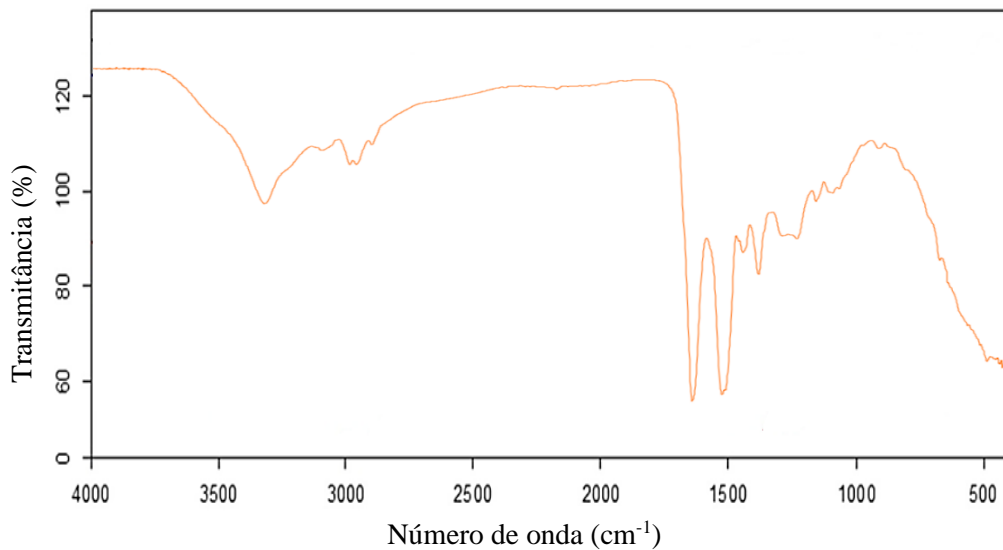


FIGURA 7. Espectros teóricos de infravermelho da albumina
Fonte: Adaptado de spectrabase.com

A espectroscopia de FTIR permite, além da identificação da formação das NPs por meio das observações das perturbações na estrutura secundária das proteínas (LEDESMA *et al*, 2017; ABROSIMOVA, SHULENINA & PASTON, 2016), analisar o encapsulamento de moléculas bioativas nas NPs (YADAV *et al*, 2014), fornecendo informações complementares sobre alterações conformacionais induzidas por adsorção. Assim, a técnica pode ser utilizada tanto para a interpretação da estrutura de nanopartículas de albumina preparadas quanto da incorporação de fármacos à sua estrutura.

3.4.3. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de análise óptica que detecta a luz Raman difundida, a amostra é irradiada com radiação UV, visível ou próxima IR (NIR). Permitindo revelar a composição química dos materiais e pode determinar a distribuição dos constituintes; e por não ser destrutivo permite uma análise sem preparação mais demorada de amostras (LI & CHURCH, 2014) .

A espectroscopia Raman permite analisar a conformação da proteína e ambientes locais, tanto em solução como na forma cristalina. Pode analisar amostras em soluções aquosas, preservando sua atividade biológica, permitindo o estudo de alterações conformacionais sutis, e como eles ocorrem.

A SERS (espectroscopia Raman de superfície aumentada), técnica baseada no espalhamento Raman, onde materiais metálicos nanoestruturados, geralmente ouro ou prata, são usadas para aumentar a intensidade de espalhamento Raman sobre as moléculas do analito, que ficam adsorvidas em sua superfície, mostraram um alargamento das bandas Raman das proteínas atribuídas à contribuição de diferentes configurações das proteínas (REYMOND-LARUINAZ *et al*, 2016).

No caso particular de detecção de proteínas, diferentes estratégias de SERS foram relatadas na literatura com base na detecção direta de marcadores ou na detecção indireta de marcadores ligados à proteína (POZZI *et al*, 2013; DIAZ *et al*, 2014; REYMOND-LARUINAZ *et al*, 2016). A SERS também é muito útil para detectar mudanças conformacionais e estruturais de moléculas em uma superfície metálica (JOSHI & SONI 2014; VALENTI & GIACOMELLI, 2015) que é de grande interesse no caso de proteínas adsorvidas em nanopartículas metálicas (REYMOND-LARUINAZ *et al*, 2016).

Tanto a técnica de espalhamento Raman com superfície melhorada (SERS) quanto a espectroscopia Raman com ponta otimizada (TERS) apresentam potencial para a caracterização de nanomateriais (isto é, nanotubos de carbono ou grafeno) bem como para avaliação de nanopartículas (LÓPEZ-LORENTE & MIZAIKOFF, 2016).

A técnica de Raman também tem sido extensivamente empregada para avaliar a conformação de pontes dissulfídicas em proteínas e peptídeos, porque a frequência de um modo de estiramento de SS da ponte dissulfeto é sensível à sua conformação. A frequência da característica SS ocorre de 503 cm^{-1} a 515 cm^{-1} na BSA e com uma largura de meia intensidade (LEDESMA *et al*, 2017; REYMOND-LARUINAZ *et al*, 2016).

Os picos atribuídos aos resíduos de aminoácidos, como triptofano (1608 cm^{-1} e 1412 cm^{-1}), tirosina (1204 cm^{-1} , 1175 cm^{-1} , 848 cm^{-1} , 831 cm^{-1} e 643 cm^{-1}) e fenilamina (1204 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 1003 cm^{-1} e 622 cm^{-1}) surgem devido à vibração do anel aromático presentes nessas estruturas (BHOGALE *et al*, 2014). Um pico intenso também pode ser observado em 1420 cm^{-1} , característico do pico da amida terciária (α -hélice) da BSA devido ao acoplamento do alongamento C–N e do modo de curvatura N–H (FIGURA 8).

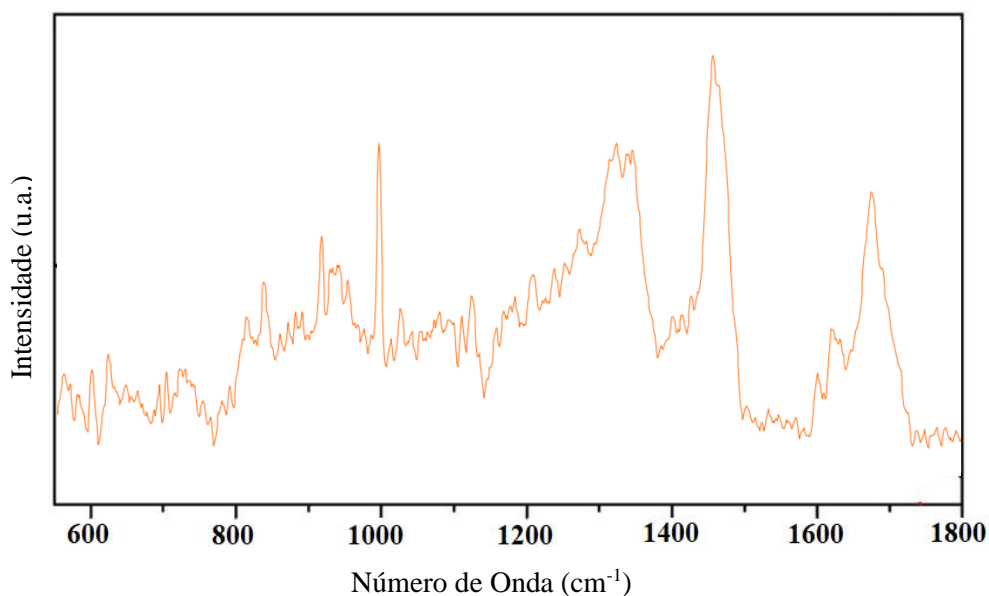


FIGURA 8. Gráfico teórico de Espectroscopia Raman da albumina sérica bovina
Fonte: Adaptado de spectrabase.com

A espectroscopia Raman possui várias vantagens distintas sobre a espectroscopia de infravermelho na análise de NPs de Albumina. A água tem bandas de absorção IR muito intensas, mas é um dispersor Raman fraco e, portanto, os espectros Raman exibem muito menos interferência de água. Isso fornece a espectroscopia Raman uma vantagem sobre a espectroscopia de infravermelho para se investigar sistemas biológicos aquosos, como é o caso das NPs de Albumina, tornando-a uma técnica importante para a pesquisa no desenvolvimento de carreadores baseados em albumina.

3.5. Sonoquímica

A aplicação de ondas de ultrassom a reações químicas – sonoquímica, tem um enorme potencial para inovação em química, principalmente no desenvolvimento de métodos ecoeficientes de química verde (MICHELON, NORA & BORGES, 2017). Demonstrando capacidade inclusive de emprego na síntese de materiais nanoestruturados com atividades aprimoradas para aplicações eficazes para fins farmacológicos, medicinais, ambientais e industriais (YARIV *et al*, 2015).

A sonoquímica é um método bem-sucedido de produção de nanoemulsões e nanodispersões e já vem sendo empregado para a preparação de nanolipossomas cuja matriz

são lipossomas, moléculas anfifílicas derivadas ou baseadas em lipídios biológicos da membrana celular (CANAVESE *et al*, 2018a; HUANG *et al*, 2013).

A cavitação é a principal responsável pelos efeitos sonoquímicos: quando atinge um tamanho crítico, a cavidade implode, liberando calor e pressão muito elevados em intervalos muito curtos de tempo e em locais específicos do líquido (POLLONI, 2014). A energia liberada pela implosão das microbolhas pode ser utilizada para induzir reações químicas: emulsificações, polimerização, funcionalização, etc.

O banho de ultrassom apresenta uma potência suficiente para gerar uma grande tensão de cisalhamento, que é responsável por romper as gotas de monômero em gotas cada vez menores, até a obtenção de partículas nanométricas. O tamanho da nanopartícula é diretamente proporcional ao tamanho das bolhas de cavitação, que por sua vez são inversamente proporcionais à frequência do equipamento (GONZÁLEZ-CORTÉS, SERGIO & IMBERT, 2018).

O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do microambiente em função do efeito cavitacional que pode ser aplicado para reduzir o tamanho das partículas e conseqüentemente aumentar a área de superfície entre a enzima e o substrato, e/ou pode perturbar interações fracas e induzir alterações conformacionais na estrutura das proteínas, o que pode facilitar o acesso de um substrato ao sítio ativo da enzima (BIN, 2011). As ondas de ultrassom atuam promovendo um aumento da estabilidade, bem como da atividade enzimática, elevando, conseqüentemente, a atividade catalítica (MA *et al*, 2015).

Em sistemas que envolvem líquidos imiscíveis, o colapso das bolhas de cavitação na interface entre os dois líquidos, causará rompimento e mistura, resultando na formação de emulsões muito finas. Os efeitos locais intensos (mecânicos, térmicos e químicos) devido ao súbito colapso destas bolhas micrométricas estão na origem de todas as aplicações da sonoquímica, inclusive no processo de preparação e síntese das nanopartículas (GREGORY, 2016). Além de diminuir a probabilidade de contaminação do material sob agitação, o processo de cavitação provoca a diminuição do tamanho do material nanoparticulado obtido e melhora a estabilidade do sistema nanoparticulado devido a ação das bolhas de cavitação (HIELSCHER, 2005).

A cavitação ultrassônica é uma tecnologia bem aceita na literatura para desaglomerar e dispersar nanomateriais (TAUROZZI, HACKLEY & WIESNER, 2011; CANAVESE *et al*, 2018b), inclusive a aplicação do ultrassom para a obtenção nanoemulsões.

A sonoquímica pode ser usada para a preparação de compostos de tamanho nanométrico do tipo *bottom-up* levando a um tamanho de partículas menor e de elevada uniformidade (CHARITIDIS *et al*, 2014).

Essa perturbação no meio reacional provoca uma homogeneização mais eficiente da temperatura e o aumento na mobilidade das moléculas do meio disperso causado pelo cisalhamento imposto pelas ondas de ultrassom favorecem a reação dos grupamentos funcionais NCO – OH dos fragmentos de aminoácidos das proteínas (RODRIGO & COSTA, 2013), facilitando o acesso ao sítio ativo da proteína.

3.6. Eugenol

O eugenol (2-metoxi-4-prop-2-enilfenol), o principal componente do óleo essencial do cravo, é um fenilpropeno prontamente disponível, conhecido pela humanidade desde a antiguidade, e utilizado como agente medicinal antimicrobiano e de ação geral, com propriedades analgésicas. Em altas concentrações, ele tem um efeito bactericida atribuído a grupos fenol: por degeneração de proteínas pode danificar a membrana celular, no entanto, com baixas concentrações, ela tende a estabilizar as membranas celulares. Portanto, os efeitos farmacológicos do eugenol são complexos e dependem da concentração livre de eugenol à qual o tecido humano está exposto (HIDALGO *et al*, 2009).

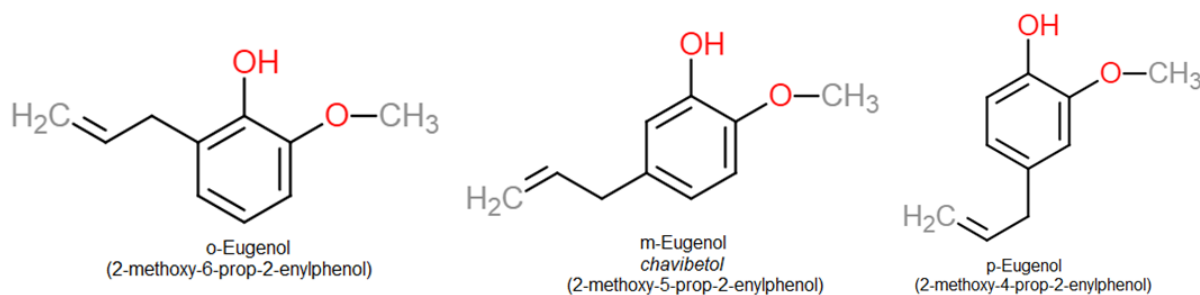


FIGURA 9. Isômeros de posição do eugenol.

Fonte: Autor

O eugenol, composto do constituinte da classe alilbenzeno, é encontrado em várias plantas, como cravo ou manjeriço, é considerado não cancerígeno, não mutagênico e tem sido utilizado como analgésico e medicamento antisséptico em odontologia e possui efeito anestésico (KOTANI *et al*, 2017). Além disso, esse composto mostra várias outras atividades biológicas interessantes como: antioxidantes, anti-inflamatórios, antiespasmódicos,

antidepressivos, antígenotóxicos e anticarcinogênicos (ZHANG *et al*, 2013; KAUFMAN, 2015; FUJISAWA & MURAKAMI, 2016). A prova do interesse neste composto é o número surpreendentemente elevado de artigos que revisam essas propriedades, que foram publicados nos últimos tempos (KOTANI *et al*, 2017).

A ação anti-inflamatória do eugenol sugere a inibição da síntese de prostaglandinas, possivelmente pela inibição da ação da COX - enzima responsável pela produção elevada de prostaglandinas durante o processo inflamatório, fator que parece contribuir para o desenvolvimento do câncer (KURUMBAIL *et al*, 1997; COSTA-JUNIOR *et al*, 2009; DA SILVA-SOUZA *et al*, 2014). A expressão de COX-2 é elevada em um grande número de malignidades e há um número crescente de evidências sugerindo que a expressão ciclo-oxygenase (COX), aromatase e prostaglandinas podem estar envolvidas na patogênese do câncer de mama (BASU *et al*, 2015).

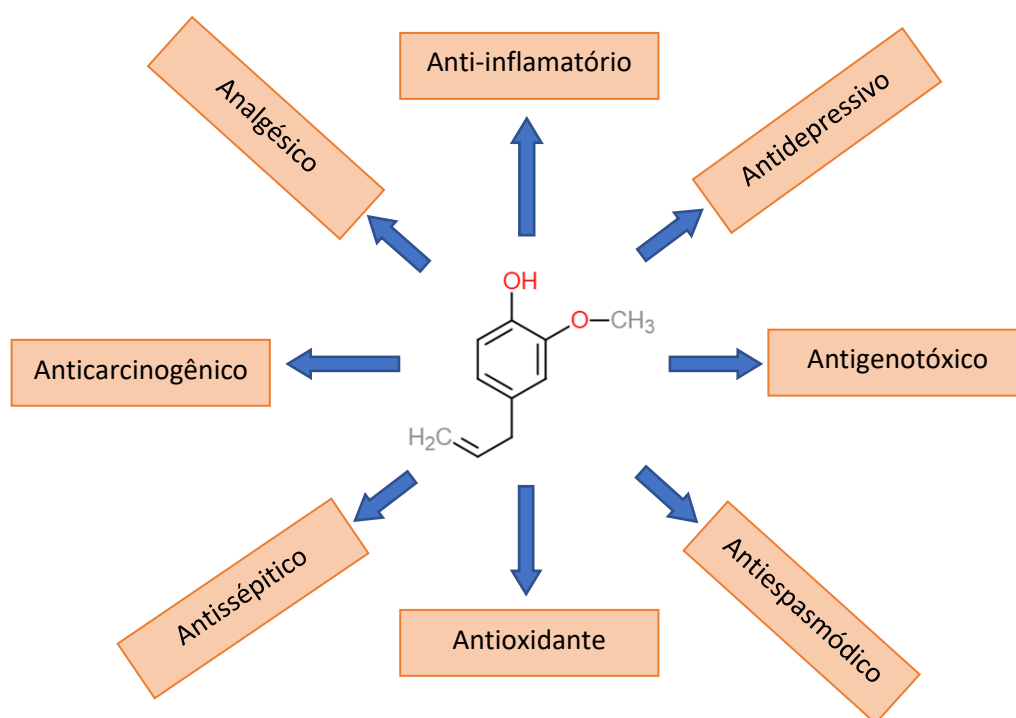


FIGURA 10. Características farmacológicas do eugenol
Fonte: Autor

Por ser um composto bioativo natural componente do óleo essencial de cravo possui muito menos desvantagens do em relação a outros compostos preparados sinteticamente (RAJA *et al*, 2015). Sendo empregado inclusive na formulação de composições para prevenção e

tratamento de doenças inflamatórias e artrites (KAUFMAN, 2015; ZHAO *et al.*, 2001), tratamento de câncer (BEZERRA & MORAIS, 2017), e no tratamento e prevenção do câncer de mama como regulador do processo de aromatase (ENAN, 2005). Atuando inclusive na indução de apoptose celular (JAGANATHAN & SUPRIYANTO, 2012; MAKUNGA & BRECHT, 2016), além de apresentar ação anti-metastase (ABDULLAH *et al.*, 2018). Seus efeitos farmacológicos são complexos e dependem da concentração livre de eugenol à qual o tecido humano se encontre exposto (HIDALGO *et al.*, 2009).

O eugenol apresenta uma massa molecular de $164,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ponto de fusão de $-7,5 \text{ }^\circ\text{C}$, ponto de ebulição de $254 \text{ }^\circ\text{C}$, uma densidade de $1,06 \text{ g}/\text{cm}^3$ e um pKa (a 25°C) de 10,19. É pouco solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos. A substância apresenta alto potencial como agente terapêutico que pode ser incorporado no tratamento de cânceres, leishmaniose e vários outros distúrbios. Serve como uma droga de amplo espectro contra infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias. A terapia combinatória de eugenol com drogas padrão, apresenta ainda, um grande potencial para eliminar as cepas resistentes às drogas.

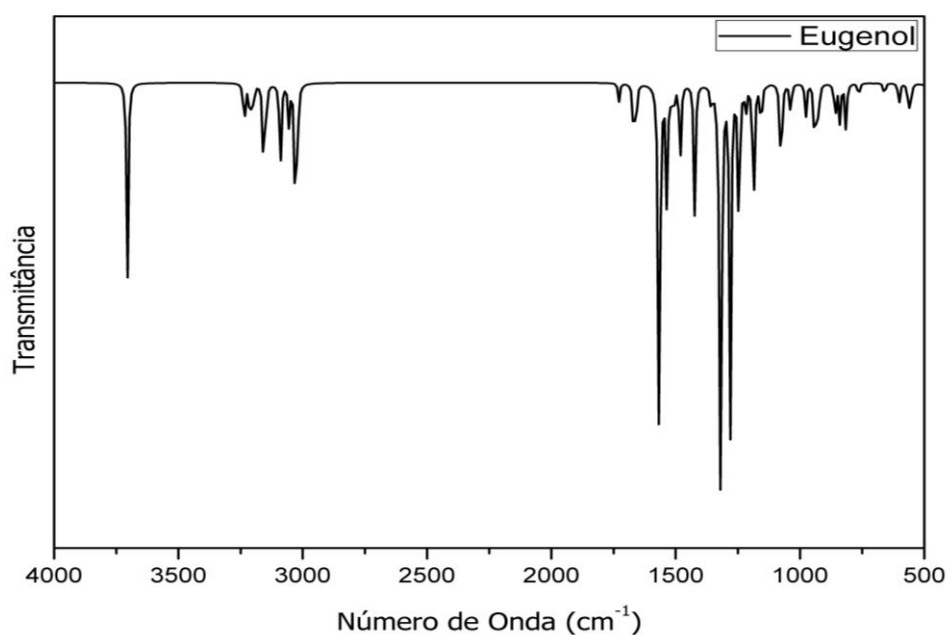


FIGURA 11. Espectro teórico de IR do eugenol obtido no Gaussian por cálculo de DFT
Fonte: Autor

Os espectros de FTIR do eugenol apresentam bandas características de ligações O-H e C-O em torno de 3417 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} , respectivamente. Outras bandas características aparecem na região de $720\text{-}1250 \text{ cm}^{-1}$, correspondentes à região C=C. Além disso, também

podem ser encontrados bandas intensas em 1640, 1610 e 1510 cm^{-1} , de estiramento C=C da fração aromática (NUCHUCHUA *et al*, 2009); e a presença de absorção de IR em torno de 1100-1200 cm^{-1} a presença grupo funcional éter na molécula (LERRICK, 2009).

Tabela 1. Principais bandas do espectro FTIR do eugenol

Número de onda de referência (cm^{-1})	Grupo Funcional
~3500	Hidroxila (-OH)
>3000	Alcenos (C-H)
<3000	Alcanos (C-H)
1500 e 1600 800 (singleto)	Anel aromático substituído
1370	Metil (CH_3)
1450	Metileno (CH_2)

Fonte: Adaptado de Riyanto *et al*, 2016.

A tabela acima, mostra, com base nos dados espectrais de FTIR, os grupos presentes nas moléculas de eugenol, de acordo com a observação resultante da presença das bandas principais, relativas aos modos vibracionais dos grupos funcionais da molécula, e suas regiões espectrais.

3.7. Análise *in Silico* de ADMET

Na descoberta de novas drogas, as propriedades farmacológicas (a condição farmacocinética) devem ser levadas em consideração o mais cedo possível, por exemplo, em testes *in silico* (VISTOLI, PEDRETTI & TESTA, 2008). Os métodos computacionais tornam-se particularmente importantes, uma vez que os estudos experimentais tornam-se mais difíceis (LIPINSKI *et al*, 1997) como resultado dos obstáculos de desenvolvimento adicionais colocados no caminho dos programas de pesquisa farmacêutica e a redução percebida no número de alvos plausíveis nas últimas décadas (GLEESON, 2008).

Estudos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) são fundamentais nos estudos de novas drogas e devem ser consideradas desde o início, durante a fase de projeto um novo fármaco. A disponibilidade de melhores tecnologias analíticas e de automação aumentou drasticamente a capacidade dos pesquisadores em compreender os fundamentos da ADMET em decorrência do desenvolvimento de métodos *in silico* cada vez

mais poderosos (EDDERSHAW, BERESFORD & BAYLISS, 2000). As técnicas *in silico* têm como objetivo auxiliar na descoberta de fármacos, na triagem virtual das estruturas propostas para garantir que as propriedades de ADMET são favoráveis antes de realizar sua síntese e/ou testes *in vitro* e/ou *in vivo*.

Os métodos *in silico* para a configuração e descoberta precoce podem lidar com um grande número de compostos e servem, por exemplo, como filtros que direcionam para compostos com maior probabilidade de atividade farmacodinâmica e farmacocinética e tornou-se uma ferramenta essencial para facilitar o processo de descoberta de fármacos (LAGORCE *et al*, 2008).

O desenvolvimento de tecnologias de triagem mais rápidas e inteligentes, fator que tem se tornado relevante na determinação do futuro papel da ADMET dentro de descoberta de drogas, tem avançado devido o advento de técnicas *in silico* para a racionalização e previsão cada vez mais acurada dessas propriedades (EDDERSHAW, BERESFORD & BAYLISS, 2000)

3.7.1. PreADMET.

Apenas algumas poucas ferramentas ADMET estão disponíveis *on-line* gratuitamente, e geralmente podem avaliar apenas um composto por vez, enquanto os pacotes comerciais são mais completos e conseguem trabalhar uma grande quantidade de dados por vez, porém geralmente possuem preços elevados (MITEVA *et al*, 2006). O PreADMET é um aplicativo baseado em *web* de acesso gratuito para prever dados ADME (SEKHAR *et al*, 2014) e criar biblioteca *drug-like* usando o método *in silico*. Foi desenvolvido pela Universidade Yonsei da Coreia do Sul, e pode ser acessado por navegadores populares, como Mozilla, Chrome ou Internet Explorer.

O PreADMET é uma ferramenta *online* para realização de testes *in silico* que consiste em quatro partes principais, como segue:

1. Cálculo do Descritor Molecular: relaciona as propriedades ADMET a descritores farmacocinéticos (físico-químicos), como lipofilicidade (logP), peso molecular, área de superfície polar e solubilidade em água.

2. Predição de semelhança de drogas: o PreADMET contém um módulo de previsão de semelhança de drogas com base nas regras da regra de Lipinski ("regra dos cinco"), (LIPINSKI *et al*, 1997) e na regra de Lead-like (TEAGUE *et al*, 1999)
3. Predição de ADME: fornece modelos de predição no modelo *in silico* para HIA (absorção intestinal humana) e o modelo de permeabilidade da pele pode prever e identificar possíveis medicamentos para entrega oral e transdérmica. Na distribuição, a penetração de BBB (barreira hematoencefálica) pode fornecer informações sobre drogas terapêuticas no sistema nervoso central (SNC), além de apresentam um modelo de ligação às proteínas plasmáticas na sua disposição e eficácia.
4. Previsão de toxicidade: apresenta um modelo confiável que pode facilmente classificar a mutagenicidade de espécies de Ames - Salmonela TA100, TA98, TA1535; e carcinogenicidade de roedores comparável a 2 anos de teste de camundongo e rato por eliminação retrógrada e método de rede neural Rprop.

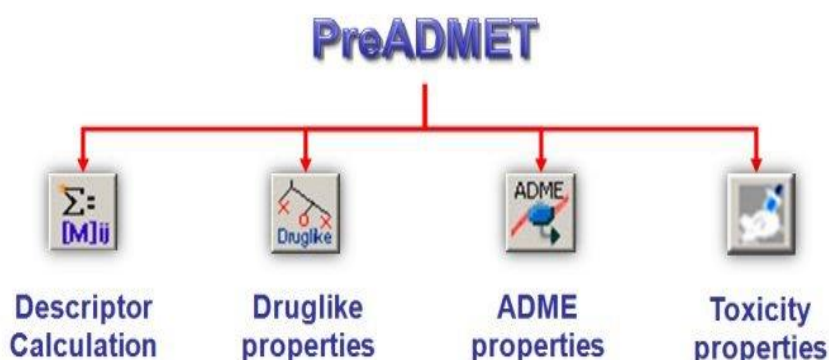


FIGURA 12. Análise *in silico* no preADMET

Fonte: preadmet.bmdrc.kr

3.7.1.1. PreADMET: *druglikeness*

Druglikeness envolve características moleculares que são compatíveis com um comportamento adequado do fármaco no organismo, principalmente absorção, distribuição e excreção (VISTOLI, PEDRETTI & TESTA, 2008). Lipinski *et al* (1997) têm o mérito da descoberta da configuração de "a regra dos 5" que prevê que uma absorção ou permeabilidade fraca é mais provável quando existem mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio, 10

aceitadores de ligação de hidrogênio, o peso molecular (MWT) é superior a 500 e o Log de P (CLogP) é maior do que 5 (ou MlogP. 4.15), (LIPINSKI *et al*, 1997).

Outras análises de drogas são as análises de *leadlike* proposta por Teague *et al* (TEAGUE *et al*, 1999). Teague começa a partir da consideração das fontes comuns de *leads* para descoberta de drogas. Estes foram divididos em três tipos. Os primeiros são compostos de baixa afinidade ($> 0,1 \mu\text{m}$) que possuem baixo peso molecular e ClogP pequeno. A segunda principal fonte de *leads* é tipificada por alta afinidade e alto peso molecular. O terceiro tipo tem baixa afinidade e peso molecular de *druglike* (350 ± 500) e lipoafinidade (3 ± 5), (TEAGUE *et al*, 1999)

A regra de CMC, publicado por Arup K. Ghose *et al*, 1999, é similar à regra de cinco. Os autores definiram o caráter de semelhança de drogas para o banco de dados do CMC, onde são removidas várias classes de compostos, como agentes de diagnóstico por imagem, solventes e auxiliares farmacêuticos. Neste estudo o intervalo de qualificação (que cobre mais de 80% dos compostos) com forme o Tabela 2.

Tabela 2. Faixa de qualificação no banco de dados do CMC.

Classe de drogas	AlogP (80%)	AMR (80%)	Peso Molecular (80%)	Número de átomos (80%)
CMC	-0.4 ~ 5.6	40 ~ 130	160 ~ 480	20 ~ 70
inflamatório	1.4 ~ 4.5	59 ~ 119	212 ~ 447	24 ~ 59
depressivo	1.4 ~ 4.9	62 ~ 114	210 ~ 380	32 ~ 56
psicótico	2.3 ~ 5.2	85 ~ 131	274 ~ 464	40 ~ 63
hipertensivo	-0.5 ~ 4.5	54 ~ 128	206 ~ 506	28 ~ 66
hipnótico	0.5 ~ 3.9	43 ~ 97	162 ~ 360	20 ~ 45
neoplástico	-1.5 ~ 4.7	43 ~ 128	180 ~ 475	21 ~ 63
infecioso	-0.3 ~ 5.1	44 ~ 144	145 ~ 455	12 ~ 64

Fonte: preadmet.bmdrc.kr

A regra tipo MDDR, publicada por Tudor I. Oprea (OPREA, 2000), concluiu que o teste de regra de cinco não pode ser usado para discriminar drogas e não-drogas. Os descritores usados para a regra tipo MDDR passam a ser o número de anéis, o número de frações rígidas e o número de ligações rotativas.

A probabilidade de encontrar um composto *druglike* é maior nos intervalos (por exemplo, N° . Rings bonds ≥ 3 , No. Ligações rígidas ≥ 18 , Número de ligações rotativas ≥ 6),

enquanto a probabilidade de encontrar um composto *no-druglike*" é maior nos intervalos (por exemplo, N° . Rings bonds ≤ 2 , Número de Ligações rígidas ≤ 17 , Número de Ligações rotativas ≤ 5).

O processo de Pre-DAMET também calcula a semelhança de drogas pela norma WDI, uma medida baseada em compostos que possuem propriedades moleculares dentro do limite superior de 90% encontrado no WDI (World Drug Index).

3.7.1.2. PreADMET: Toxicidade

O PreADMET também prevê toxicidade e a carcinogenicidade. Para a previsão de toxicidade o preADMET usa dados *in silico* para análise de TA98, TA100 e TA1535, que são frequentemente usados no teste de Ames (AMES *et al*, 1972). E o resultado pode ser calculado tanto em consideração do metabolito (ativação metabólica por homogeneizado de 10% de fígado de rato, + S9) como sem metabolismo (Sem ativação metabólica, -S9). O valor real do resultado de predição é "positivo" ou "negativo".

A carcinogenicidade é uma toxicidade que induz a formação câncer nos tecidos. Geralmente o teste de carcinogenicidade requer tempo longo (geralmente 2 anos), atualmente apenas métodos de teste *in vivo* são estabelecidos. Normalmente, o teste usa camundongos ou ratos, expondo-os a um composto. E a variável a ser observada é a existência de câncer. Os resultados previstos pelo PreADMET são construídos a partir dos dados do NTP (*National Toxicology Program*) e US FDA, que são os resultados dos testes de carcinogenicidade *in vivo* de camundongos e ratos durante 2 anos.

3.7.2. SwissADME

A ferramenta *Web SwissADME* (www.swissADME.ch), desenvolvida pelo Instituto Suíço de Bioinformática, permite o cálculo das principais propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, parâmetros relacionados para uma ou várias moléculas, permitindo a especialistas em quimiologia ou química computacional o acesso a modelos preditivos adaptados a renomadas publicações, abordagens e métodos originais internos, especialmente desenvolvidos e cuidadosamente comparados para apoiar seus esforços de descoberta de drogas

O SwissADME oferece acesso gratuito a um conjunto de modelos preditivos rápidos e robustos para propriedades físico-químicas, farmacocinética, semelhança a

medicamentos por meio de métodos proficientes internos como o *BOILED*Egg, iLOGP e o radar de biodisponibilidade. Além disso, a interoperabilidade permite acesso a outras ferramentas da *Web SwissDrugDesign*, projetadas para apoiar toda a comunidade (especialistas e não especialistas) no desenvolvimento de drogas (DAINA, MICHIELIN & ZOETE, 2017).

3.8. Ancoragem molecular

A ancoragem molecular engloba todas as técnicas computacionais utilizadas para simular o comportamento das interações moleculares no sítio ativo de uma enzima de interesse. A ancoragem molecular juntos com outras técnicas do campo da modelagem molecular são amplamente utilizadas nos campos de química computacional e desenvolvimento de fármacos para estudar sistemas biológicos, podendo ser aplicado, portanto, na descoberta de inibidores de enzimas (SOUZA *et al*, 2015). Além disso é ferramentas importantes para a implementação bem-sucedida de vários métodos de descoberta/desenho de drogas auxiliados por métodos computacionais para previsão e otimização de toxicidade para propriedades fisiológicas favoráveis (LEELANANDA & LINDERT, 2016).

3.8.1. Processo de ancoragem

O processo de reconhecimento molecular é dirigido por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos é governado pela termodinâmica do sistema, e podem ser estimados através da energia livre de ligação de Gibbs:

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K_{eq} \quad (\text{Equação 1})$$

onde ΔH é a variação da entalpia, T é a temperatura absoluta, ΔS é a variação da entropia, R é a constante universal dos gases, e K_{eq} é a constante de equilíbrio de ligação, determinada experimentalmente e pode ser representada pela constante de associação:

$$K_{eq} = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (\text{Equação 2})$$

onde $[P]$ é a concentração do receptor, $[L]$ a concentração do ligante e $[PL]$ a concentração do complexo receptor-ligante.

A contribuição entálpica para a energia livre reflete a especificidade e a força das interações proteína-ligante (ligações iônicas, halógenas e de hidrogênio, interações eletrostáticas e de van der Waals, polarização da interação de grupos, entre outros). E as alterações na entropia de ligação refletem a perda de movimento causada por alterações nos graus de liberdade de translação e rotação dos parceiros que interagem (DRAHANSKY *et al*, 2016).

A ancoragem molecular fornece uma previsão dessas interações das estruturas proteína-ligante usando métodos de computação. Idealmente, os algoritmos devem possibilitar explorar a superfície da energia livre de Gibbs de ligação a fim de encontrar as melhores conformações do ligante durante de ancoragem. Se os efeitos entálpicos e entrópicos forem corretamente modelados pela função de energia, então o mínimo global da superfície de energia estará associado ao modo de ligação receptor-ligante encontrado experimentalmente (MENG *et al*, 2011).

O tratamento de mudanças conformacionais muito grandes no receptor induzido pelo ligante ou pela ligação às proteínas é um dos maiores desafios nos cálculos das energias livres de ligação (DRAHANSKY *et al*, 2016); encontrar os graus de liberdade - rotacionais, translacionais e conformacionais, relevantes requer aproximações, e devido às aproximações necessárias para os cálculos das interações moleculares introduzidas no modelo, nem sempre o mínimo global satisfaz este importante requisito, tornando-se importante por tanto a escolha do processo de ancoragem molecular que possa satisfazer o modelo em estudo (ADCOCK & MCCAMMON, 2006).

Os diferentes modelos e métodos de ancoragem podem ser obtidos a partir de três estratégias distintas relativas à flexibilidade receptor-ligante: (1) a proteína é considerada rígida e apenas os graus de liberdade translacionais e rotacionais do ligante são explorados, (2) a proteína é considerada rígida e todos os graus de liberdade do ligante são explorados (translacional, rotacional e conformacional) e, (3) a proteína é considerada totalmente ou parcialmente flexível e todos os graus de liberdade do ligante são considerados.

A maioria dos algoritmos de ancoragem considera a proteína rígida e o ligante flexível, permitindo rotações das ligações do tipo sp^3 , e mantendo o comprimento e os ângulos das ligações fixos (GUEDES, DE MAGALHÃES & DARDENNE, 2014). A escolha do modelo, então, precisa levar em consideração, as características dos sistemas, a confiabilidade dos dados do que se deseja produzir

3.8.2. Métodos Quânticos

Métodos quânticos (MQ) são amplamente utilizados como um método de simulação poderoso em muitos campos da modelagem molecular. No contexto do encaixe, movendo cada átomo separadamente no campo dos átomos restantes, a simulação de dinâmica molecular (MD) representa a flexibilidade do ligante e da proteína com mais eficiência do que outros algoritmos e são frequentemente eficientes na otimização local. Assim, uma estratégia atual tem sido usar a busca aleatória para identificar a conformação do ligante, seguida pelas simulações sutis de MD (MENG *et al*, 2011).

Modelos e métodos matemáticos podem ser usados para fazer os cálculos teórico em Química Computacional, os chamados FEM (*Final Element Method*), usando matrizes: método que corta o espaço N-dimensional em pequenos subsistemas que podem ser descritos por N equações lineares.

3.8.3. Cálculos Quânticos

Um modelo teórico é uma maneira de modelar um sistema usando um conjunto específico de aproximações. Essas aproximações são combinadas com um algoritmo de cálculo e aplicadas a orbitais atômicos, definidos pelo conjunto de bases, a fim de calcular orbitais moleculares e/ou suas respectivas energias. Em geral, os métodos podem ser separados em 4 tipos principais: semiempírico, *ab initio*, funcional de densidade (DFT), mecânica molecular (MM). A seleção do modelo teórico depende do tamanho do sistema e do nível de aproximação desejado.

Métodos *ab initio* são baseados apenas em princípios teóricos-matemáticos, sem a utilização de dados experimentais. Os inúmeros métodos têm a mesma abordagem básica, mas diferem nas aproximações matemáticas usadas (BLUM *et al*, 2009). Estes são os tipos mais populares de modelos, apesar do tempo de execução dos cálculos.

Hartree-Fock é o modelo básico do método *ab initio*. Ele usa uma aproximação para o cálculo da repulsão coulombica elétron-elétron, conforme a equação abaixo, em vez de considerar as interações explícitas de repulsão (aproximação do campo central). E sua principal desvantagem do método HF é a exclusão da correlação eletrônica.

$$V_{n,n} = \sum_{\alpha}^K \sum_{\beta}^L \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta}}{r_{\alpha\beta}} \quad (\text{Equação 3})$$

Existem duas maneiras de calcular orbitais moleculares usando HF: UHF (irrestrito) ou RHF (restrito). O UHF, empregado para íons, estados excitados, radicais, etc., usa um orbital separado para cada elétron, mesmo se eles estiverem emparelhados, ficando os elétrons distribuídos entre dois grupos de orbitais (α e β) semelhantes, porém distintos, um para tipo de *spin* permitindo a polarização dos elétrons emparelhados pela ação do elétrons desemparelhados, levando a estimativas adequadas de densidade de *spin*. O RHF usa a mesma função espacial orbital para elétrons no mesmo par sendo indicado para espécies com *spin* resultante igual a zero, ou seja, com cada orbital vazio ou totalmente preenchido, de forma que os *spins* opostos se cancelem (BARREIRO & FRAGA, 2015).

Na teoria de Hartree-Fock, a energia tem a forma:

$$E_{HF} = V + \langle hP \rangle + 1/2 \langle PJ(P) \rangle - 1/2 \langle PK(P) \rangle \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

V - energia de repulsão nuclear.

P - matriz de densidade.

$\langle hP \rangle$ - energia de um elétron (cinético mais potencial).

$1/2 \langle PJ(P) \rangle$ - repulsão clássica de coulomb dos elétrons.

$- 1/2 \langle PK(P) \rangle$ - troca de energia resultante da natureza quântica (férmion) dos elétrons.

Os métodos semiempíricos usam um certo número de dados experimentais ao longo do cálculo (DRAL, WU & THIEL, 2019). Por exemplo, comprimentos de ligação de um tipo específico terão um valor fixo independentemente do sistema (a ligação C = C sempre será considerada 134 pm, por exemplo). Isso acelera drasticamente o tempo computacional, mas em geral não é muito preciso. Geralmente, métodos semiempíricos são usados para sistemas muito grandes, pois eles podem lidar com grandes quantidades de cálculo (LIMA *et al*, 2018).

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT) é um método que emprega mecânica quântica (QM) usado em química e física para calcular a estrutura eletrônica de átomos, moléculas e sólidos (VAN MOURIK, BÜHL & GAIGEOT, 2014). Os métodos DFT estão se tornando cada vez mais populares porque os resultados obtidos são comparáveis aos obtidos usando os métodos *ab initio*, no entanto, o tempo da CPU é drasticamente reduzido. A DFT difere dos métodos baseados nos cálculos de HF por empregar a estimativa da densidade

eletrônica para calcular a energia, ao invés de uma função de onda. B3LYP é o modelo DFT mais popular (EJUH *et al*, 2018). Esse método é chamado de híbrido, porque usa correções para correlações de gradiente e de troca (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Há vários funcionais híbridos que incluem uma mistura de Hartree-Fock com correlação com DFT, existem diferentes variações dessa funcionalidade híbrida, a mais comum, B3LYP, usa a correlação não local fornecida pela expressão LYP e o funcional de correlação VWN para correlação local. Como o LYP inclui termos locais e não locais, a correlação funcional usada é:

$$C * E_C^{LYP} + (1 - C) * E_C^{VWN} \quad (\text{Equação 5})$$

Em outras palavras, o VWN é usado para fornecer o excesso de correlação local necessária, pois o LYP contém um termo local essencialmente equivalente ao VWN, e C é uma constante.

Os métodos semiempíricos aproximam átomos como esferas e ligações como molas. Eles usam uma equação algébrica para o cálculo da energia, ao invés de uma função de onda ou densidade de elétrons. As constantes na equação são obtidas a partir de dados experimentais ou outros cálculos e são armazenadas em uma biblioteca de dados e permitem trabalhar com modelos que apresentam grande quantidade de dados (WANG *et al*, 2006).

Os orbitais moleculares (MOs) são calculados usando o modelo teórico selecionado, combinando linearmente os AOs (LCAO); esses cálculos requerem a especificação de um conjunto de bases para sua realização. Um conjunto de bases é um conjunto de funções de onda que descreve a forma dos orbitais atômicos (AOs). O conjunto de bases selecionado influencia, entre outros, a qualidade das superposições, enquanto o modelo teórico influencia o tipo de cálculos aos quais as matrizes serão submetidas. O nível de aproximação do cálculo computacional também está diretamente relacionado ao conjunto de bases usado. Para a escolha do conjunto de bases é necessário ter em conta a relação entre precisão dos resultados e tempo de processamento de dados.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

Todos os reagentes utilizados no processo de produção das nanopartículas de albumina foram adquiridos da Sigma Aldrich e são de grau analítico, sem necessidade de purificação adicional: BSA, 99% de pureza; eugenol ($\geq 98\%$), etanol anidro ($\geq 99,5\%$), gliceraldeído ($\geq 90\%$), etilenoglicol anidro (99,8%), e água destilada.

4.2. Análise *in silico*.

4.2.1. Ensaio de administração, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET).

As propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de administração, distribuição de drogas, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), tais como absorção no intestino humano - HIA, ligação às proteínas plasmáticas - PPB e coeficiente de partição hematoencefálica ($\log BB$) das substâncias foram analisadas por estudos *in silico* realizados nas bases de dados farmacocinéticos *on-line* PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr>) e SwissADME (<http://www.swissadme.ch>), (DAINA, MICHIELIN e ZOETE 2017; VIMAL *et al*, 2017). Foram utilizadas extensões SDF (arquivo de dados de estrutura) e SMILES (sistema simplificado de entrada de linha de entrada molecular) como arquivos de *input* na geração dos dados de ADMET. Os resultados obtidos foram analisados e comparados.

4.2.2. Ancoragem Molecular

4.2.2.1. Classes Alvo

O estudo para se identificar as classes-alvo preferidas das moléculas de eugenol foi realizado usando o SwissTarget (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), (GFELLER *et al*, 2014), uma ferramenta *web* que permite prever os alvos proteicos mais prováveis de moléculas pequenas (DAINA, MICHIELIN & ZOETE 2019). Os dados de todos os compostos em estudo foram comparados e os principais alvos analisados pelo método *docking* molecular.

4.2.2.2. Preparação das estruturas das proteínas e dos ligantes

As estruturas cristalinas das proteínas foram obtidas como arquivos .pdb do site do Protein Data Bank (www.rcsb.org). Os biopolímeros iniciais foram simplificados pela exclusão de todos os ligantes e água presentes nas estruturas cristalinas utilizando-se o software Discovery Studio[®] (versão 2016). Foram selecionadas e preparadas a cadeia A de cada proteína para o estudo de ancoragem molecular das proteínas. Os seguintes códigos de acesso das estruturas cristalina do Protein Data Bank (www.rcsb.org) foram baixados e empregados para os estudos de ancoragem: BSA (3V03, 4F5S, 4JK4, 4OR0), COX-1 (3N8W, 3N8X, 3N8Y), COX-2 (3LN1, 1CVU, 4OJT), e 5-LOX (3O8Y, 3V99). As estruturas moleculares 2D e 3D dos ligantes foram baixadas como arquivos do tipo .sdf a partir do banco de dados do Zinc Library (<http://zinc15.docking.org/substances>) e otimizado nos programas PyMOL (versão 2.1.1) e Discovery Studio[®], e salvos como arquivos .pdb. As estruturas cristalinas foram otimizadas utilizando-se os programas PyMOL e Discovery Studio[®] e salvas como arquivos dos tipos .pdb e .pdbqt. O processo de ancoragem molecular foi performado na ferramenta da *Web* para triagem virtual rápida SwissDock (<http://swissdock.ch>) e revalidado por meio de *redocking* no software AutoDock Vina (versão 1.1.2).

4.2.2.3. Ancoragem

As interações do eugenol com a BSA, bem como do eugenol, diclofenaco e aspirina com as enzimas COX-1, COX-2 e LOX-5 foram realizadas por ancoragem molecular usando o SwissDock (<http://swissdock.ch>), uma ferramenta da *Web* para rastreamento virtual rápido baseado em bibliotecas ultragrande de ligantes de moléculas pequenas (ZOETE & MICHIELIN, 2011). Após a conclusão do processo de ancoragem, para a confirmação das ligações proteína-ligante, os *seeds* exibindo maior afinidade de ligação e menores energias de conformação foram escolhidas e fez-se o *redocking* no Autodock Vina (TROTT & OLSON 2009). As ligações de hidrogênio, comprimentos de ligação e interações hidrofóbicas entre as proteínas e os ligantes foram determinados usando PyMol. Os programas Chimera, PyMol e Discovery Studio[®] também foram usados para inspeção visual e representações gráficas dos resultados da ancoragem molecular.

4.2.3. Métodos Quânticos

As geometrias moleculares, orientações espaciais e energias dos estados excitados do eugenol e dos AINEs diclofenaco e aspirina foram calculadas utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (TDFT) utilizando-se os softwares IQMol (versão 2.11.1) e Gaussian 09 para a realização dos cálculos computacionais (TAYLOR *et al*, 2014). O funcional B3LYP foi utilizado com o conjunto de bases 6-31G* para prever as propriedades estruturais, bem como as excitações que envolvem a transferência de carga (AVCI & ATALAY, 2015). A escolha do método se deu devido ao fato dessa base ser considerada universalmente funcional e apresentar excelente desempenho quando aplicada a uma variedade de sistemas a um custo computacional relativamente baixo (ARTHUR & UZAIRU, 2019).

4.3. Produção das nanopartículas de BSA

4.3.1. Preparação das nanopartículas de albumina por dessolvatação assistida por ultrassom

Prepararam-se uma fase orgânica pela diluição de eugenol em álcool etílico, e uma fase aquosa pela diluição de BSA em água destilada sob vigorosa agitação (JAHANBAN-ESFAHLAN, DASTMALCHI & DAVARAN, 2016). Gotejou-se a fase orgânica para dispersão na fase aquosa, onde a albumina fora previamente dissolvida, em condições brandas, temperatura ambiente (24 °C) e pressão atmosférica sob sonicação a 40 kHz durante 30 min. Após o processo de gotejamento o sistema permaneceu por mais 15 min (quinze minutos) sob sonicação, e depois passou por processo de reticulação e purificação (PAIK *et al*. 2013). Todos os processos anteriores e também o processo de purificação se deu na ausência de luz.

4.3.2. Caracterização das nanopartículas de BSA e BSA@EU

4.3.2.1. Espalhamento dinâmico da luz (DLS)

O tamanho hidrodinâmico das nanopartículas produzidas foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico da luz usando equipamento marca Horiba modelo SZ-100. As soluções iniciais foram diluídas de 1:4 e em seguida transferidas para as células de vidro (1,2 mL) até a marca de aferição. As análises foram realizadas na temperatura de 25 °C, pressão atmosférica e em ângulo de incidência da luz de 90°. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.3.2. *Potencial Zeta*

As medidas de potencial zeta foram realizadas com base na mobilidade eletroforética das partículas em meio líquido utilizando-se células de potencial zeta (100 μL) no mesmo equipamento citado anteriormente, sob as mesmas condições de diluição, temperatura e pressão. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.3.3.3. *Microscopia de força atômica (AFM)*

Microscopia de força atômica (AFM) foi utilizada para elucidar as características estruturais das nanopartículas de albumina (BSA) e das nanopartículas de albumina carregadas de eugenol (BSA@EU). As amostras para AFM foram preparadas depositando-se uma solução de 10 mL de BSA ou BSA@EU (diluição 1:10 em água Milli-Q) em mica recentemente clivada a temperatura ambiente. Após 5 min a amostra foi lavada três vezes com água e finalmente seca em estufa por de 10 min a 40° C. As imagens foram realizadas em um modelo AFM TT-AFM (AFM Workshop, EUA) em modo de contato intermitente. Utilizaram-se *cantilevers* (ACT-20) com uma frequência de ressonância de 360 kHz e raio de ponta nominal <10 nm (ACT, AppNano, EUA). As imagens foram processadas usando o software Gwyddion[®] 2.45.

4.3.3.4. *Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

As análises por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidas utilizando um sistema FTIR Perkin Elmer Spectrum 100 GX ajustado para medir 16 varreduras cumulativas a 4 cm^{-1} em uma faixa de 600 a 4000 cm^{-1} . Os espectros das BSA NP's e das BSA@EU NP's foram obtidos da seguinte forma: primeiramente a amostra foi espalhada sobre a superfície do cristal de ATR, em seguida, foi realizada a obtenção do espectro e, por fim, para a obtenção de novos espectros, a cela foi limpa com acetona P.A. Os gráficos de FTIR foram analisados e plotados utilizando-se o software Origin[®] 8. Para a investigação da manutenção da estrutura secundária da proteína (BSA) usou-se a função de Lorentz (L(x)) na região da banda de 1600 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} , banda de amina primária, para a deconvolução da banda a fim de se investigar os seus modos vibracionais constituintes.

4.3.3.5. Espectroscopia Raman

As amostras foram maceradas até se obter pequenas partículas. Posteriormente, transferiu-se uma pequena porção do material para uma placa de vidro para se realizar a aquisição dos espectros no instrumento. O equipamento utilizado foi um espectrômetro Raman da marca BRUKER com microscópio modelo SEMTERRA II, com o controle do equipamento e armazenamento de dados através de um microcomputador acoplado. As análises foram executadas utilizando os parâmetros: potência de 100 mW; tempo de integração de 500 ms equivalente para 10 coadições, em temperatura ambiente. As medidas de espalhamento Raman foram realizadas na região espectral entre 0 a 4000 cm^{-1} . Os espectros Raman obtidos foram analisados pelo software Matlab R2016a empregando-se rotinas escritas especificamente para a realização de pré-tratamentos (suavização com filtro Savitzky-Golay e correção da linha de base). Para a suavização utilizou-se o filtro Savitzky-Golay com janelas de 19 a 21 pontos variando de 2 unidades e um polinômio de grau 3 para o ajuste por quadrados mínimos dentro da janela. A correção das linhas de base foi realizada por cálculos de quadrados mínimos assimétricos. Posteriormente os gráficos foram plotados para análise dos modos vibracionais e os números de onda de cada material com o auxílio do software Origin[®] 8.

4.3.3. Ensaios de atividade hemolíticas

Para a avaliação da atividade hemolítica utilizou-se eritrócitos de carneiro coletados com anticoagulante (EDTA). Os eritrócitos coletados foram diluídos na proporção de 1:4 em PBS. Diluiu-se uma solução estoque (20mg/mL) em PBS para 2mg/mL: retirou-se uma alíquota de 20 μL aplicou-se no primeiro poço e completou-se com 180 μL de PBS (1:10). Retirou-se 80 μL de cada poço ajustando o volume para 100 μL . Executou-se o mesmo procedimento para todos poços, variando-se as concentrações de 1 a 0,01 mg.mL^{-1} . Por fim cada poço ainda recebeu 100 μL de hemácias. A placa foi incubada por 2 h a 37 °C. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para leitura a um comprimento de onda de 550 nm a fim de quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e o 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e detergente, respectivamente. Os resultados foram plotados em gráficos no GraphPad Prisma 6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaios de ADMET

Estudos *in silico* de administração, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) do eugenol demonstram que o composto apresenta característica de semelhança de drogas; apresentando boa penetração na barreira hematoencefálica e alta absorção pelo sistema nervoso central, o que explica sua potente ação analgésica; permeabilidade através do epitélio intestinal; boa absorção intestinal; e boa permeabilidade celular, interagindo fortemente com a membrana plasmática. A substância é muito pouco solúvel em água ou em solução tamponada é bastante lipossolúvel e apresenta boa absorção cutânea (Tabela 1).

O eugenol exibiu um comportamento muito semelhante aos AINEs diclofenaco e aspirina (Tabela 1) quando exposto aos dispensadores de medicamentos. Uma vez que se adequa aos critérios de cumprimento das regras de CMC (GHOSE, VISWANADHAN & WENDOLOSKI, 1999), Regra dos Cinco (LIPINSKI *et al*, 1997) e regra *leadlike* (TEAGUE *et al*, 1999); moléculas como o eugenol, por não violarem essas regras, não apresentam problemas de biodisponibilidade e são qualificado como composto de semelhança de drogas.

Tabela 3. ADME: comparação entre o eugenol e os AINES diclofenaco e aspirina.

ID	EUGENOL	DICLOFENACO	ASPIRINA
BBB	2,25544	1,39652	0.715999
Solução Tampão (mg.L ⁻¹)	1036,58	687,124	26109.5
CACO2 (nm/sec.)	46,8865	24,5317	20.091
HIA (%)	96,774447	95,95708	90.17676
MDCK	342,148	51,4637	37.9518
PPB (%)	100	91,95465	37.42363
Solubilidade em Água (mg.L ⁻¹)	862,745	6,17953	5844.64
Permeabilidade Cutânea	-1,31092	-2,57397	-2,02531
SKlogP_valor	2,66241	4,29906	1.36321

Fonte: preadmet.bmdrc.kr

O Eugenol, no entanto, viola a regra MDDR (OPREA, 2000) em dois parâmetros: (1) o número de ligações em anel e (2) quanto ao número de ligações de rotativas, devido ao número de violações é classificado como estrutura farmacológica média. A redução do número de anéis aromáticos de uma molécula pode melhorar suas propriedades físico-químicas, como a solubilidade aumentando sua biodisponibilidade. Por outro lado, interações envolvendo anéis aromáticos são os principais contribuintes para o reconhecimento de proteína-ligante e concomitantemente importantes para o *design* de drogas. Por conseguinte, os *leadlikes* são geralmente moléculas menores, como o eugenol, e permitem incorporações estruturais para aumentar sua eficácia e podem ser incorporados em processos de otimização de *leads* (SAURAV *et al*, 2014).

A Absorção Intestinal Humana (HIA) é a primeira barreira que a substância bioativa deve transpor até atingir o local da ação farmacológica. O eugenol mostra uma absorção intestinal muito alta (96,8%); e exibe uma boa permeabilidade nas células Caco2 e MDCK, o que corrobora sua capacidade de permear através do epitélio intestinal e também da membrana plasmática, com resultados superiores aos fármacos diclofenaco e aspirina.

A Ligação às Proteínas do Plasma (PPB) é um parâmetro que fornece o modelo de ligação às proteínas plasmáticas, sua disposição e eficácia (HARIKA, 2017). Análises *in silico* demonstraram que o eugenol, semelhante aos AINEs diclofenaco e aspirina, possui boa capacidade de ligação com as proteínas plasmáticas, contudo apresenta um desempenho superior a esses fármacos (Figura 13).

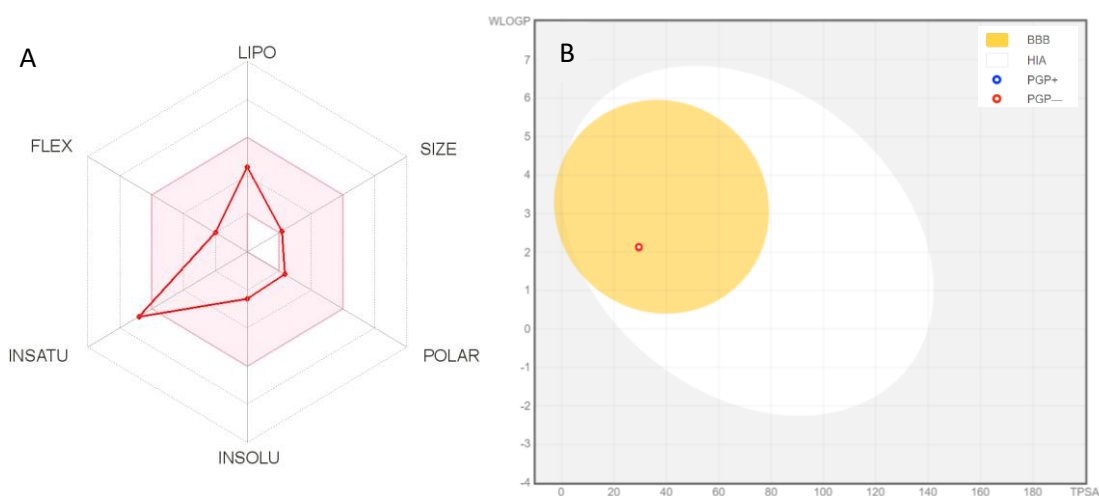


FIGURA 13. (A) Gráfico de biodisponibilidade do Eugenol, a área rosa representa o intervalo ótimo para cada propriedade (B) *Boiled-Egg* Eugenol.

Fonte: SwissADME.ch

O eugenol apresenta uma capacidade de transposição da barreira hematoencefálica muito superior a essas drogas, o que indica uma forte capacidade das substâncias em atuar sobre o SNC. As substâncias que apresentam um coeficiente de partição hematoencefálica elevados, como eugenol, são consideradas ideais para formulação de compostos bioativos que atuem sobre o sistema nervoso central.

Quanto à solubilidade em água o eugenol é praticamente insolúvel em água apresentando uma solubilidade de apenas $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, bem como em solução tamponada (pH = 7,4), em cuja solubilidade é de $6,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Os parâmetros físico-químicos que se relacionam à lipofilicidade de substâncias químicas, como o SKlogP (AMES *et al*, 1972), mostram que o eugenol é bastante lipossolúvel, o que indica sua disponibilidade na membrana plasmática quando absorvido pelo organismo (Tabela 2).

Tabela 4. Toxicidade: comparação entre o eugenol e os AINES diclofenaco e aspirina.

ID	EUGENOL	DICLOFENACO	ASPIRINA
Teste de Ames	mutagem	mutagem	mutagem
Carcino_camundongo	positivo	negativo	negativo
Carcino_rat	positivo	negativo	positivo
Inibidor_hERG	médio risco	médio risco	baixo risco
TA100_10RLI	positivo	negativo	positivo
TA100_NA	positivo	negativo	positivo
TA1535_10RLI	positivo	negativo	positivo
TA1535_NA	positivo	negativo	positivo

Fonte: preadmet.bmdrc.kr

Testes de toxicidade *in silico* (Tabela 2) para o teste de Ames (AMES *et al*, 1972) previram toxicidade semelhante aos AINES para o eugenol. Em relação a TA100 e TA1535, duas estirpes de *Salmonella typhimurium* que são frequentemente utilizadas no teste de Ames contendo a mesma mutação de substituição de pares de bases hisG46 (PRIVAL & ZEIGER, 1998), o eugenol exibe características semelhantes à aspirina.

O modelo previu resultados carcinogênicos positivos para o eugenol em ratos e camundongos, demonstrando não haver nenhuma evidência de atividade carcinogênica da substância; resultado semelhante ao encontrado para a aspirina em testes com ratos. Todos os

compostos apresentam um risco médio de inibição do gene hERG, responsável por codificar o canal de potássio envolvido na repolarização cardíaca. Esses resultados apontam para o uso possivelmente seguro do eugenol quando comparado aos fármacos analisados.

Os AINEs específicos para COX-2 são ácidos orgânicos fracos e lipofílicos; assim, quanto menor o pH, maior é a sua lipofilicidade: características compartilhadas como o eugenol. Essa combinação de propriedades químicas permite que compostos similares aos AINEs, como o eugenol, cruzem as membranas lipídicas, incluindo a barreira hematoencefálica, e se acumulem em tecidos ácidos como o estômago, medula renal, e locais de inflamação (MENGLER-GAW & SCHWARTZ, 2002), onde passam a agir na inibição do processo inflamatório.

5.2. Ancoragem Molecular

A técnica de ancoragem molecular foi utilizada para prever os requisitos de energia de ligação com as moléculas alvo, mecanismos enzimáticos e as interações moleculares entre o eugenol e a BSA, como forma de se avaliar a capacidade de carregamento das NP's produzidas. O processo de ancoragem molecular também foi utilizado para se comparar as interações do eugenol no sítio ativo da COX/LOX com os AINES e a analisar sua capacidade de atuação como anti-inflamatório, assim como sua possível atividade antitumoral.

5.2.1. Ancoragem molecular do eugenol em BSA

As diferentes áreas conformacionalmente lábeis na estrutura da albumina são capazes de se adaptar a vários grupos químicos e formam centros de ligação altamente ativos capazes de interagir com diferentes tipos de ligantes, desde moléculas hidrofóbicas a moléculas polares. Tanto a albumina sérica bovina (BSA), quanto a albumina sérica humana (HSA) apresentam uma alta afinidade pela sua capacidade de ligação – apresentam vários sítios de ligação, e uma ampla aplicação para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada

Tabela 5. Tipos de Interação e Aminoácidos envolvidos na Inibição da de Cox-2.

Ligante	Ligação de Hidrogênio (LH)	Comprimento da ligação LH	Ligação de Van der Waals	Ligações Pi-sigma/ Pi-enxofre e Pi-amida	Ligações Pi-Alquila e Pi-Arila	Ligações Pi-Pi e T-Shaped
Arac_Ac	Ser 530	1,8	Arg 120	-	Ile 345	-
	Tyr 385	1,9	Gly 526		Leu 531	
			Leu 384		Leu 117	
			Leu 359		Met 535	
			Leu 352			
			Met 113			
			Met 522			
			Phe 518			
			Phe 381			
			Phe 209			
			Phe 205			
			Ser 353			
			Thr 206			
			Trp 387			
			Tyr 355			
			Tyr 348			
			Tyr 206			
			Val 523			
			Val 349			
		Val 344				
		Val 116				

Diclofenaco	Ser 530 Tyr 385	1,8 1,9	Gly 526 Met 522 Phe 381 Phe 205 Ser 353 Tyr 355 Tyr 385 Tyr 348	Val 349 (Pi-sigma)	Ala 527 Leu 352 Val 523	Trp 387 Phe 518
Aspirina	Ser 530 Val 523	2,1 2,1	Ala 527 Glu 524 Leu 384 Leu 352 Phe 381 Phe 518 Tyr 348 Val 349	Gly 526 (Pi-amida) Met 522 (Pi-enxofre)	-	Trp 385 Try 385
Eugenol	Ser 530	2,2	Gly 526 Phe 518 Phe 381 Ser 353 Trp 387 Tyr 385 Tyr 348	Leu 352 (Pi-sigma)	Val 523 Val 349	-

Fonte: Autor

No sítio ativo principal da proteína (FIGURA 14.1) observam-se por ligação de hidrogênio, entre o átomo de oxigênio do grupo éter da molécula de eugenol e o hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral da Ser 428. Na mesma região da estrutura proteica (FIGURA 14.2) observa-se, também, interação por ligação de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo fenólico da molécula de eugenol e o oxigênio do grupo acila da Arg 144; e a ocorrência de ligação salina entre a nuvem eletrônica do anel aromático da molécula de eugenol e as aminas primárias desprotonadas da cadeia lateral da Arg 458.

No sítio 3 (FIGURA 14.3) observa-se a ocorrência de interação por ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo fenólico do eugenol e o hidrogênio da amina secundária da Arg 208. No quarto sítio de interação (FIGURA 14.4) identificam-se interações por ligação de hidrogênio entre o grupamento éter do eugenol e o hidrogênio do grupo amida da cadeia lateral da Asn 390. No sétimo sítio de ligação (FIGURA 14.7) constatam-se interações de hidrogênio entre o oxigênio do grupo fenólico do eugenol e o hidrogênio da amina secundária da Arg 256. Nos demais sítios ativos as interações identificadas ocorrem basicamente por forças de van der Waals.

Os dados de ancoragem apontam para a capacidade da albumina de carrear moléculas de eugenol. Esses dados evidenciam a albumina como uma excelente alternativa para a produção de nanopartículas de matriz proteica para a administração de eugenol, oferecendo várias vantagens para a administração da substância, incluindo proteção contra degradação enzimática, liberação controlada após administração oral, aumento da absorção intestinal e biodisponibilidade.

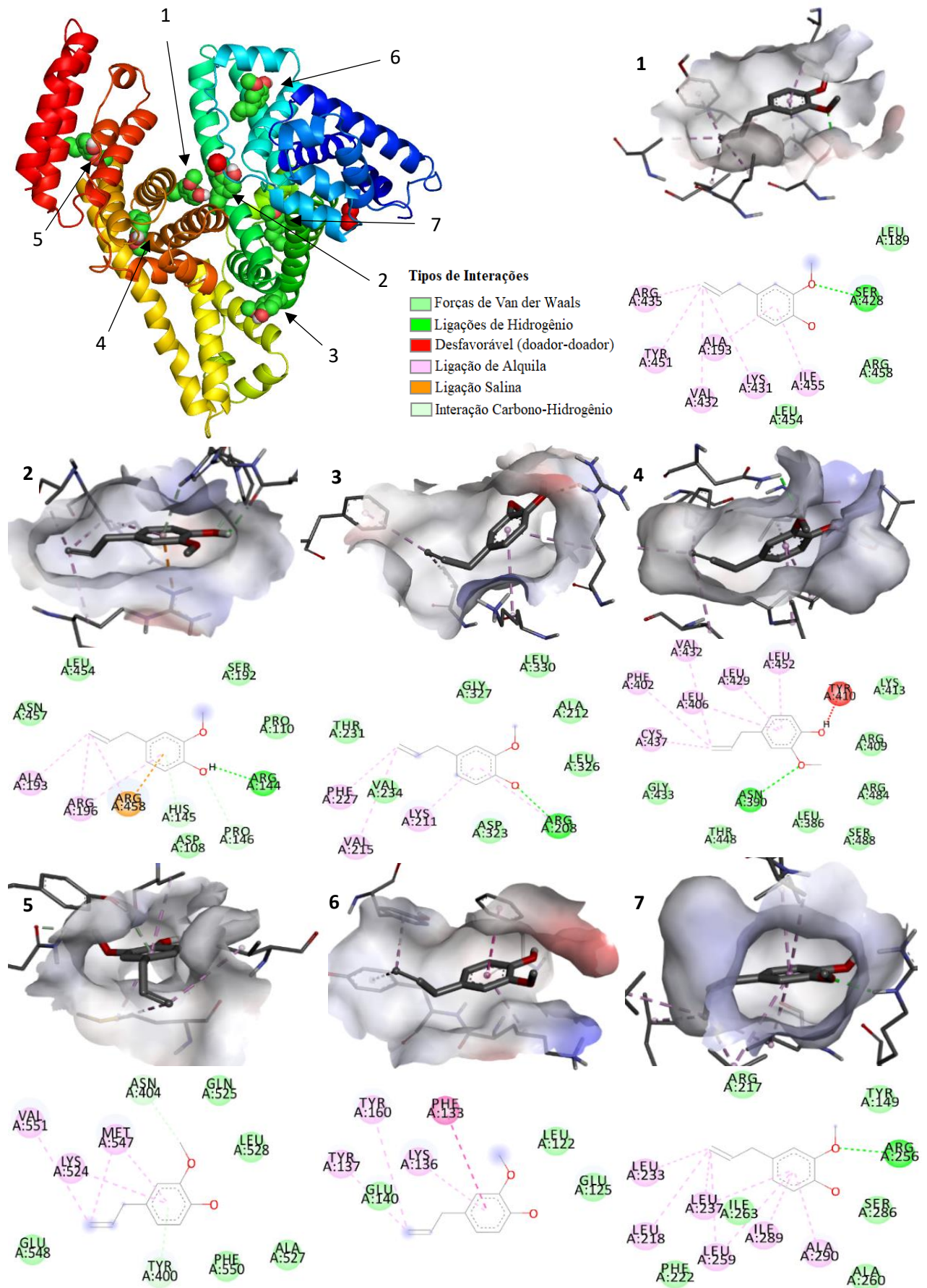


FIGURA 14. Principais sítios ativos da albumina, e interações das moléculas de eugenol com os sítios ativos da albumina. **Fonte:** Autor

5.2.2. Ancoragem molecular do eugenol e dos AINES diclofenaco e aspirina na COX

O Eugenol demonstrou, por meio de estudos de ancoragem molecular, ação inibitória da ação das proteínas COX e LOX, responsáveis pela biossíntese de metabólitos proinflamatórios no organismo. Inibidores, como o eugenol, que demonstram especificidade dupla para COX e LOX têm a vantagem óbvia de inibir trajetos múltiplos do metabolismo do ácido araquidônico. Esses inibidores são capazes de bloquear os efeitos inflamatórios das prostaglandinas (PG), bem como dos leucotrienos múltiplos (LT) inibindo, ou mesmo, limitando sua produção; incluindo os efeitos de vasodilatação, vasopermeabilidade e quimiotáticos dos PGE₂, LTB₄, LTD₄ e LTE₄, também conhecidos como as substâncias de anafilaxia de reação lenta (SCHAUBERGER *et al*, 2017).

A Figura 15.B apresenta a formação de ligações de hidrogênio entre o oxigênio do grupamento éter das moléculas de eugenol e o hidrogênio da hidroxila da serina 530 da COX-2, resíduo responsável pela inibição do sítio ativo da molécula onde ocorre a oxidação do ácido araquidônico em prostaglandina G₂ (BLOBAUM, MARNETT & INTRODUCTION, 2007; MEEK, LAAR & VONKEMAN, 2010; ORLANDO & MALKOWSKI, 2016); que por sua vez é reduzida ao intermediário instável, prostaglandina H₂ pelo sítio da peroxidase, localizado no lado oposto ao sítio da ciclo-oxigenase. A peroxidase não é inibida pelos compostos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES); porém, diferente dos AINES, o eugenol também demonstra a capacidade de formar ligações salinas com os oxigênios desprotonados das cadeias laterais da porfirina no grupo heme da proteína (FIGURA 15-D).

O sítio ativo da COX-2 consiste em resíduos de aminoácidos apolares Alanina (Ala 527), Valina (Val 523, Val 349, Val 344, Val 116), Fenilalanina (Phe 518, Phe 381, Phe 209, Phe 205), Leucina (Leu 534, Leu 531, Leu 384, Leu 359, Leu 352, Leu 117), Isoleucina (Ile 345), Metionina (Met 535, Met 522, Met 113), Triptofano (Trp 387), Metionina (Met 508); e resíduos de aminoácidos polares Serina (Ser 530, Ser 353), Tirosina (Tyr 385, Tyr 355, Tyr 348), Glicina (Gly 526) e Arginina (Arg 120), (KIEFER *et al*, 2000). Por ser uma molécula pequena o eugenol apresenta capacidade de inibir tanto a COX-1 quanto a COX-2 (FIGURAS 15-A e 15-B).

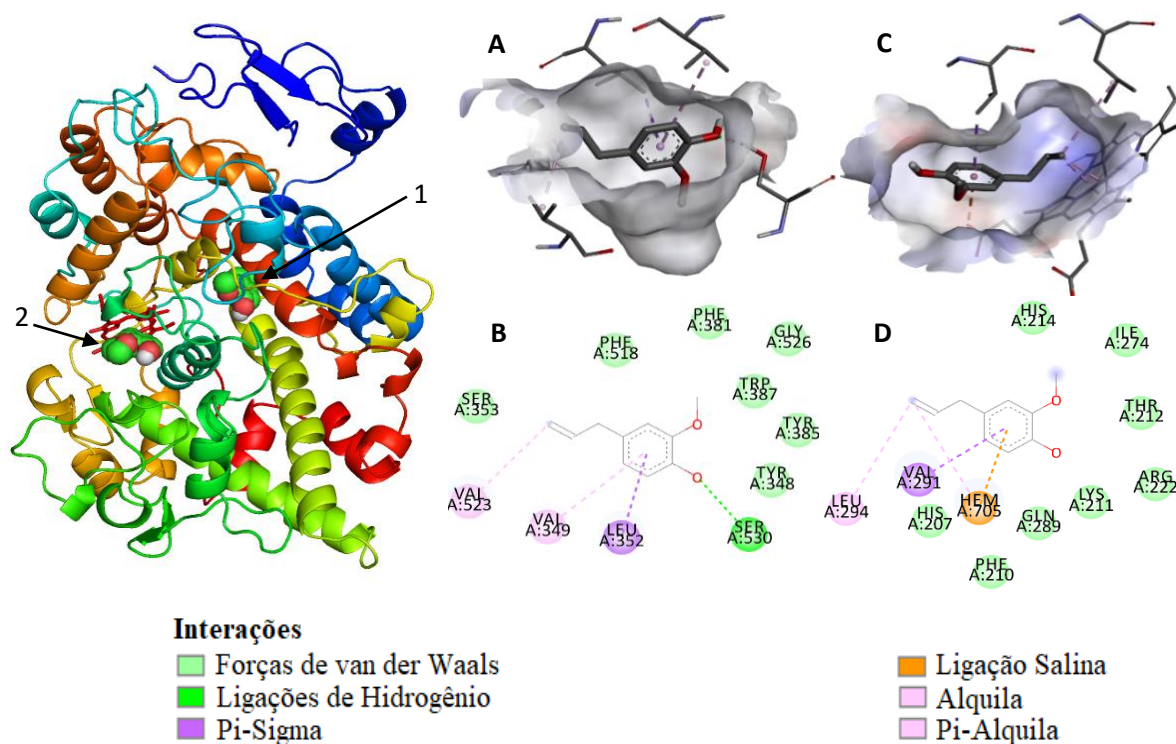


FIGURA 15. Sítios ativos e Ancoragem molecular do Eugenol na COX-2.

Fonte: Autor

O diclofenaco (ácido 2- [2- (2,6-dicloroanilino) fenil] acético) é um inibidor não-seletivo da COX-2 muito comumente empregado para o tratamento de sintomas inflamatórios (dor, vermelhidão, calor e edema) por meio do bloqueio da formação de prostaglandinas, resultando na redução da inflamação aguda e crônica.

Os dados computacionais mostraram que a ancoragem do diclofenaco na COX-2 apresenta interações por ligação de hidrogênio com os resíduos catalíticos de ciclo-oxigenase ativos Tyr385 Ser 530 e Ser 385; por interações π - π T-shaped entre os resíduos Phe 518, Trp 387 e anel aromático não clorado. Foram observadas ligações alquila e π -alquila entre a molécula de diclofenaco e os fragmentos Val 523, Val 349, Ala 527, Leu 352, havendo interações da nuvem de elétrons π sobre um grupo aromático e grupo eletrônico dos grupos alquila.

Já os resíduos Tyr 355, Tyr 348, Ser 353, Phe381, Phe 205, Gly 526 e Met 522 interagem com a molécula de diclofenaco por forças de van der Waals. Todas essas interações permitem que a molécula de diclofenaco atue bloqueando o canal por impedimento estérico, fazendo com que seu estreitamento impeça o acesso do ácido araquidônico ao local ativo onde ocorre sua conversão catalítica à prostaglandina (FIGURA 16).

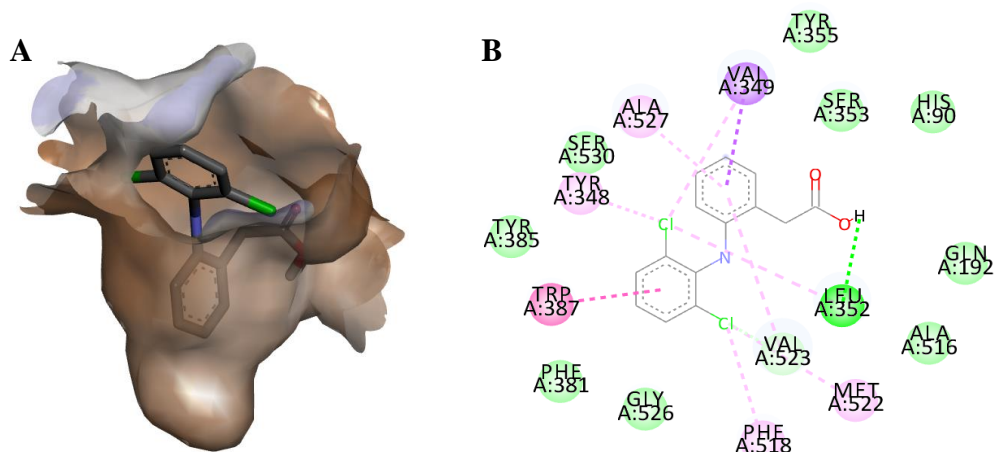


FIGURA 16. Ancoragem Molecular do diclofenaco na bolsa hidrofóbica COX-2
Fonte: Autor

A aspirina (ácido 2-acetoxibenzóico) é um outro fármaco anti-inflamatório não esteroideal dirigido às enzimas ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) para bloquear a formação de prostaglandinas, resultando na redução da inflamação aguda e crônica.

De forma similar ao diclofenaco, a aspirina demonstra sua ação bloqueando o canal hidrofóbico no sítio ativo da ciclo-oxigenase. A ancoragem molecular da aspirina na COX-2 mostra interações por ligações de hidrogênio com os resíduos catalíticos do sítio ativo da ciclo-oxigenase, Ser 530 e Tyr 385. Podem ser observadas interações π - π T-shaped entre as moléculas de aspirina e os fragmentos de aminoácidos Tyr 385 e Trp 387; assim como interações π -amida com os fragmentos Gly 526 e interações π -enxofre com Met 522. Os fragmentos Ala 527, Glu 524, Phe 381, Phe 518, Leu 352, Leu 384, Tyr 348 e val 349 522 interagem por forças de Van der Waals com aspirina. Diferentemente do diclofenaco, aspirina também inibe a conversão da prostaglandina G2 em prostaglandina H2 no sítio ativo da peroxidase (FIGURA 17).

A aspirina é o único AINE capaz de modificar covalentemente a COX acetilando a Ser 530 no sítio ativo da ciclo-oxigenase (LUCIDO, ORLANDO e VECCHIO, 2016). A acetilação da COX-1 leva à completa perda de atividade, enquanto a acetilação da COX-2 resulta na geração do produto de mono-oxigenação ácido 15 (R)-hidroxiexosicosatetraenóico (15R-HETE), (LUCIDO *et al*, 2016).

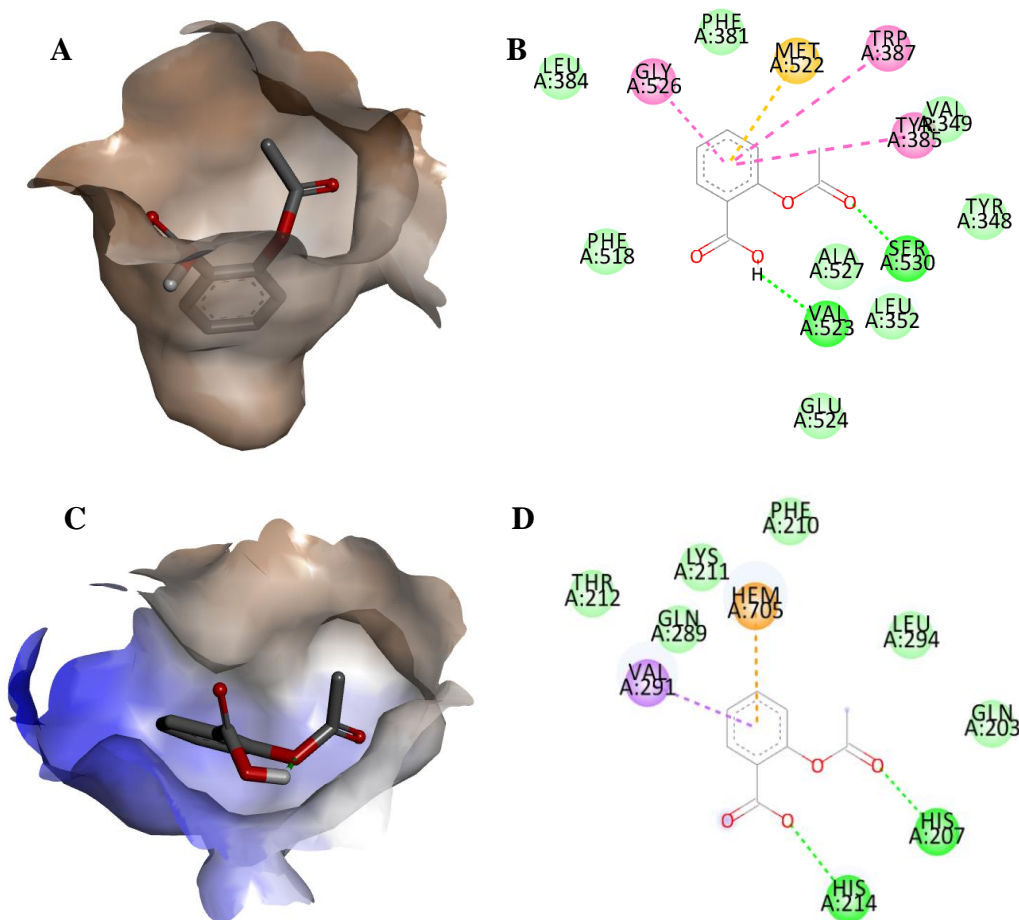


FIGURA 17. Ancoragem Molecular da aspirina nos sítios ativos da COX-2
Fonte: Autor

O eugenol, semelhante ao diclofenaco e a aspirina, também bloqueia o canal do sítio ativo hidrofóbico da COX por meio de ligações de hidrogênio com o fragmento Ser 530, além de apresentar interações hidrofóbicas com o fragmento Tyr 385, responsável pela conversão de AA em prostaglandina G2 pela transferência de um elétron da Tyr-385 para o grupo heme da proteína para gerar o radical tirosil no sítio ativo da ciclo-oxigenase. Fragmentos importantes para a inibição de COX-2 por vários compostos além de aspirina (ROWLINSON *et al*, 2003; KIEFER *et al*, 2000).

Assim como o diclofenaco e a aspirina, o eugenol demonstrou a capacidade de inibir a catálise do ácido araquidônico em prostaglandina G2 no sítio ativo do canal hidrofóbico da COX por interação polar com o Ser 530. Esta inibição explícita no sítio ativo de ligação da proteína pode resultar na inibição específica da atividade da COX-2.

No sítio ativo do canal hidrofóbico da COX a molécula do eugenol se liga a Ser 530 por ligação de hidrogênio. No mesmo sítio a molécula também interage por forças hidrofóbicas

com os fragmentos de aminoácidos Ser 353, Phe 381, Phe 518, Gly 526, Trp 387, Tyr 348, Tyr 385; e por interação de alquila com Val 349; e π -Alquila com a Val 523 e π -Sigma com a Leu 352 (FIGURA 18).

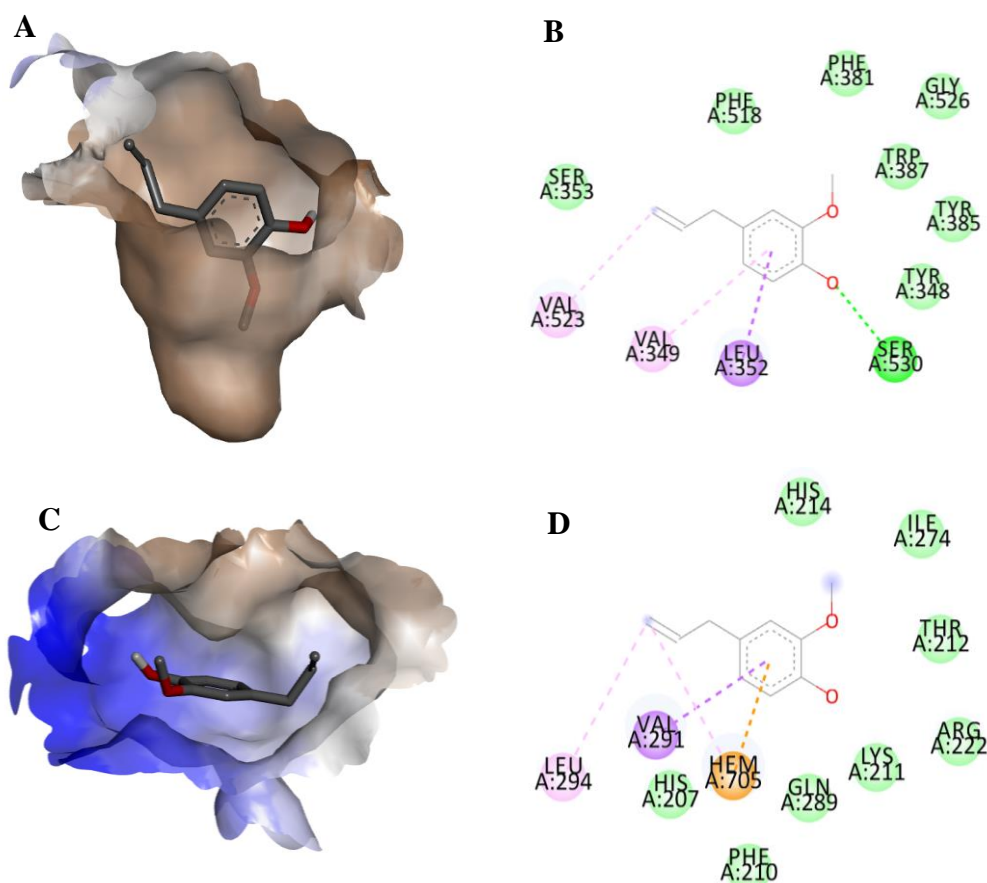


FIGURA 18. Ancoragem Molecular do eugenol nos sítios ativos da COX-2
Fonte: Autor

O eugenol também demonstrou agir sobre a inibição do sítio ativo no qual a peroxidase é responsável pela conversão da prostaglandina em G2 em prostaglandina H2 pela interação com o grupo heme por meio dos radicais metila laterais dos anéis de pirrole por ligação salina, que pouco contribuem para a estabilidade da proteína, mas são cruciais contribuições para a estabilidade de ligação ligante-proteína. O eugenol interage ainda com fragmentos do sítio ativo da peroxidase por interação de van der Waals com os fragmentos de aminoácidos Ala 274, Arg 222, Gln 289, His 2014, His 207, lie 274, Lys 211 e Thr 212; Interações π -alquila com a Leu 294- e π -sigma com a Val 291.

O sítio de peroxidase apresenta o grupo heme como cofator. O cofator heme não está ligado covalentemente à PGHS e existem relativamente poucas interações proteína-heme

– interações de Van der Waals. O ferro heme é coordenado no lado proximal com um nitrogênio de um His 207. A coordenação com um His 207 é conservada pelas peroxidases heme dependentes, no entanto, nesta peroxidase, o comprimento da ligação é muito maior que o normal. Uma relação entre a ligação heme-nitrogênio sugere que as interações na face distal do grupo heme afetam o comprimento da ligação proximal e o potencial de redução da PGHS.

As forças de ligação do eugenol com a enzima são muito próximas em relação ao diclofenaco e a aspirina (Tabela 4); interações mais fracas entre o ligante e a proteína evidenciam a capacidade da substância de ter sua ação inibidora revertida, o que pode ser uma boa indicação quanto à reversão dos efeitos colaterais causados pela inibição contínua da COX-1 em pacientes crônicos que precisam fazer uso contínuo de AINEs. Embora ligantes mais volumosos parecem ser mais seletivos na inibição da ação catalítica da COX-2, pois bloqueiam melhor o sítio ativo da enzima, o eugenol pode vir a ser um importante precursor para o desenvolvimento de novos fármacos COX-2 seletivos.

Tabela 6. Energias de ligação entre o eugenol e os AINEs e os sítios ativos da COX-2

Fonte: Autor

	<i>lead</i>	AINEs		ácido
	eugenol	diclofenaco	aspirina	araquidônico
ΔG (kcal.mol ⁻¹)	- 6.87	- 8.08	- 7.45	- 8.82
K_i (μ M)	9,14	1,18	3,43	3,40

A constante de inibição (K_i) é útil para designar a probabilidade de que um medicamento específico iniba uma enzima específica e resulte em uma interação clinicamente relevante do medicamento com um substrato para a enzima. Valores de K_i significativamente altos (mM) provavelmente não inibirão a atividade enzimática; dependendo do sistema biológico utilizado, o K_i pode flutuar, resultando em uma faixa de até 40 μ M para o bloqueio da atividade enzimática (KERI & TOHT, 2002).

5.2.3. Ancoragem molecular do eugenol na 5-LOX

Observam-se interações por ligação de hidrogênio e por ligação salina entre a molécula de eugenol e o fragmento de aminoácido arginina 370 no principal sítio ativo da

proteína 5-LOX (FIGURA 15) e no sítio secundário por ligação de hidrogênio entre a molécula e a isoleucina 673, evidenciando a possível ação inibitória da molécula sobre a proteína.

No sítio ativo da 5-Lox há três histidinas coordenadas para o íon catalítico não-heme Fe^{3+} (His 367, His 372 e His 550), mais uma isoleucina (Ila 673) e uma valina (Val 671). Além do canal de fixação de ferro, um canal de fixação de substrato paralelo ao sítio ativo principal contendo vários resíduos hidrofóbicos e aminoácidos adicionais com os quais os inibidores de LOX podem interagir no sítio ativo da enzima (FIGURA 19). O ácido araquidônico interage no sítio ativo da 5-LOX com os fragmentos Arg 246, Val 361, Ala 453, Val 243, Leu 244 (AIN *et al*, 2016).

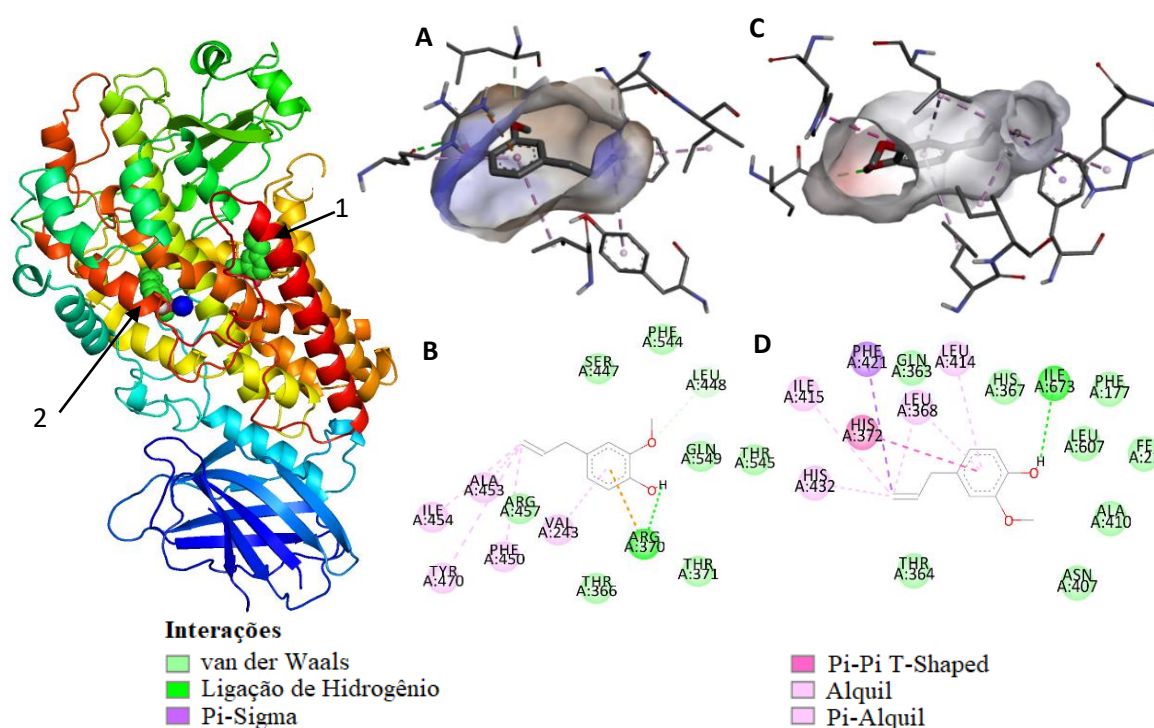


FIGURA 19. Ancoragem molecular do Eugenol com os sítios ativos da 5-LOX.

Fonte: Autor

Os dados de ancoragem molecular revelaram que o eugenol interage no sítio ativo da COX-2, assim como na 5-LOX, demonstrando capacidade de dupla inibição COX/LOX. Com os aminoácidos do sítio ativo de alvos 5-LOX, as moléculas da substância são capazes de se ligar aos fragmentos coordenados com Fe^{3+} His 367 por interações de van der Waals; His 372 por interações π - π do tipo T-shaped; His 550 e Ile 673 por ligações de hidrogênio, e a outros fragmentos perto do grupo de coordenação ao íon de ferro como a Thr 364 por interações de van der Waals. Na bolsa adicional da 5-Lox o eugenol interage com os resíduos

Val 243 e Ala 453 por interações hidrofóbicas (alquila e π -alquila) e por ligação de hidrogênio e interseção eletrostática com a Arg 370.

Tabela 7. Interações do Eugenol nos sítios ativos da COX-2 e 5-LOX.

Proteína	Sítio Ativo	Marcador	Arranjo (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	K_i (μM)
Cox-2	ciclo-oxigenase	Ser-530	-263,32	-6,69	12,4
	peroxidase	His 207	-260,96	-6,87	9,14
5-Lox	Sítio heme dependente	His 367, 372	-3474,51	-6,59	14,7
	Canal hidrofóbico	Val 234	-3472,05	-6,02	38,4

Fonte: Autor

Na interação π - π T-shaped as interações se dão entre a nuvem de elétrons π dos grupos aromáticos dos fragmentos de aminoácidos e anel aromático não clorado no diclofenaco em uma forma em T, ou seja, entre a nuvem de elétrons do anel e cabeça na nuvem de elétrons de outros anéis; essas interações são necessárias para que ocorram interações temporárias, especialmente para a ação do fármaco a ser realizada em um sistema, além das interações envolvendo anéis aromáticos serem os principais contribuintes para o reconhecimento proteína-ligante, e de grande importância para a compreensão da dinâmica dos processos de ancoragem molecular, e por conseguinte, para o *design* de drogas.

5.3. Validação da Processo de Ancoragem Molecular

Todas as estruturas cristalinas analisadas foram obtidas pelo método de difração de raios X e apresentaram resoluções menores que 2,8 Å (Tabela 4). A validação do processo de acoplamento foi realizada usando cálculos RMSD (desvio médio quadrático da raiz), calculados pela ferramenta baseada em *Web Dincdocking* (<http://dinc.kavrakilab.org>).

Tabela 8. Estruturas PBD.

Macromolécula	Código	Método	Resolução
BSA	3V03	Raio X	2,70 Å
	4F5S	Raio X	2,47 Å

	4JK4	Raio X	2,65 Å
	4OR0	Raio X	2,58 Å
Cox-1	3N8W	Raio X	2,75 Å
	3N8X	Raio X	2,75 Å
	3N8y	Raio X	2,60 Å
Cox-2	3LN1	Raio X	2,40 Å
	1CVU	Raio X	2,40 Å
	4OJT	Raio X	1,50 Å
Lox-5	3O8Y	Raio X	2,39 Å
	3V99	Raio X	2,25 Å

Fonte: Autor

Os valores de RMSD foram calculados comparando-se a conformação de menor energia com a conformação de cada fragmento, considerando todos os átomos do ligante em seu arranjo mais estável. Para a validação da ligação do ligante com os fragmentos de aminoácidos apenas as conexões com até 3,0 Å de comprimento foram consideradas e analisadas (FIGURA 20).

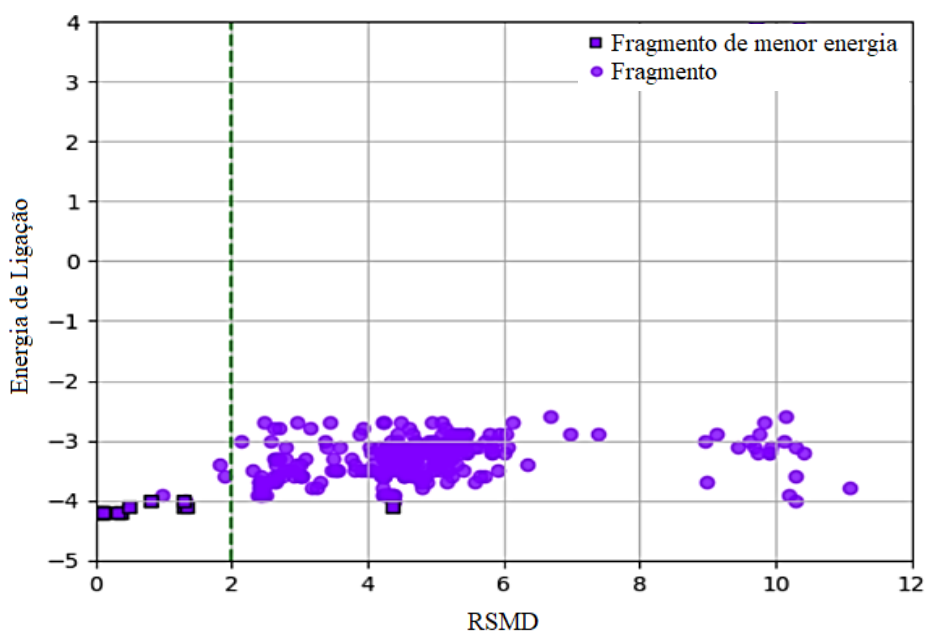


FIGURA 20. Energia de Ligação versus RMSD: interações do eugenol com COX-2

Fonte: Autor

As interações dos ligantes com as estruturas obtidas no PDB encontrados pelo algoritmo foram analisadas pelo cálculo de RMSD, que mede o grau de similaridade entre as estruturas. Valores de RMSD $< 2,0 \text{ \AA}$ e os baixos valores de Entalpia Livres de Gibbs de Ligação (ΔG) indicam semelhança atopológica entre estrutura e cavidade no sítio ativo e evidenciam a capacidade de ligação do ligante na COX-2.

A distribuição de densidade relativa de elétrons, a energia de vibração, a localização e a energia dos orbitais moleculares HOMO e LUMO, além da similaridade muito forte entre a densidade eletrônica e as energias do *gap* HOMO-LUMO entre eugenol e aspirina, 3.769 eV e 3.612 eV respectivamente (FIGURA 21), bem como a área superficial muito próxima entre essas moléculas (eugenol - 388.859 \AA^2 ; aspirina - 379.426 \AA^2) explicam o comportamento e as interações semelhantes dessas moléculas no sítio ativo do canal hidrofóbico da Cox-2.

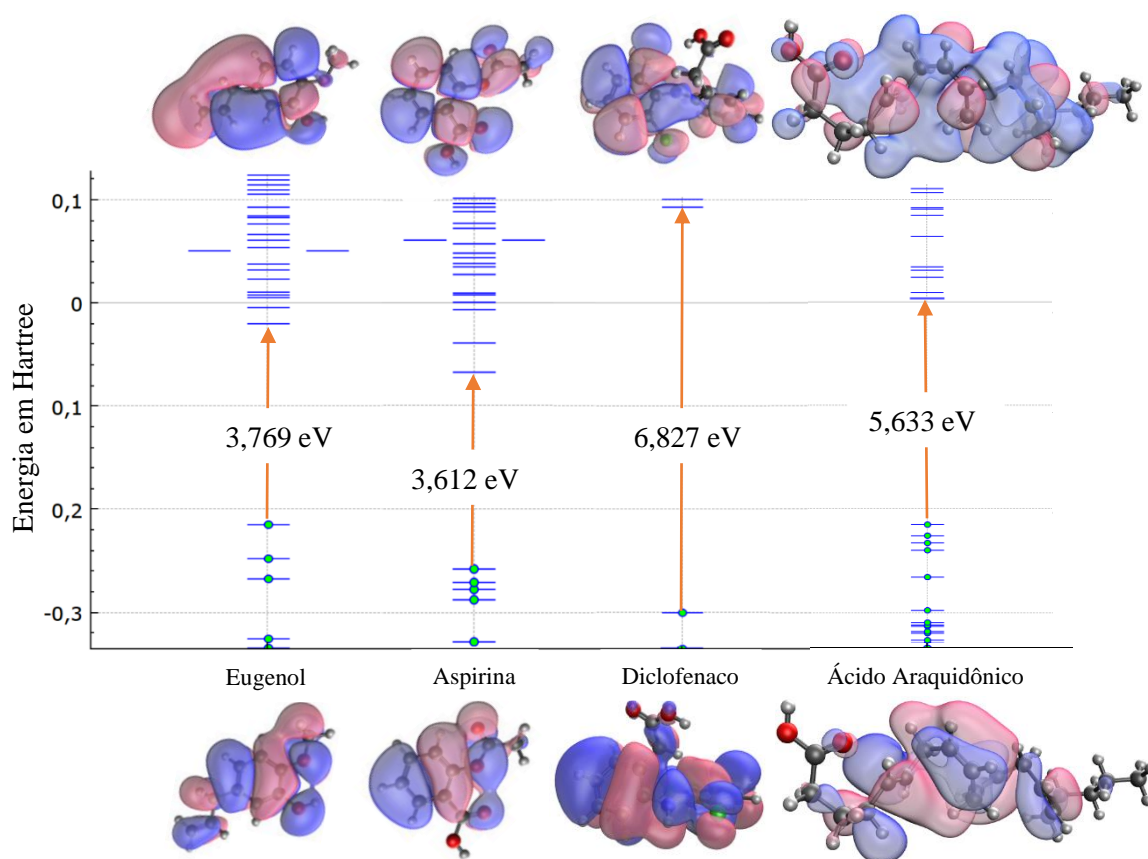


FIGURA 21. Gap HOMO-LUMO do eugenol calculado pelo método DFT

Fonte: Autor

O *gap* HOMO-LUMO muito próximo, e pequeno, é um indicativo da facilidade com que esses compostos são capazes de reagir com compostos orgânicos. O eugenol e a

aspirina apresentam os orbitais HOMO de mesma simetria, o que explica o comportamento semelhante dos dois compostos ao interagir com os sítios ativos da COX-2. Assim como a aspirina, o eugenol também apresenta uma energia de transição HOMO-LUMO menor que o ácido araquidônico, o que pode ser um indicativo da ação anti-inflamatória da substância via inibição da cascata do ácido araquidônico.

5.3. Caracterização das nanopartículas de BSA e BSA@EU

5.3.1. Tamanho e morfologia.

O processo de dessolvatação assistido por ultrassom produziu nanopartículas de albumina sérica bovina com diâmetro médio de $172,7 \pm 10,4$ nm (moda de 173,2 nm), com boa estabilidade hidrodinâmica (FIGURA 22-A) denotada pelo valor de potencial zeta de -36,8 mV.

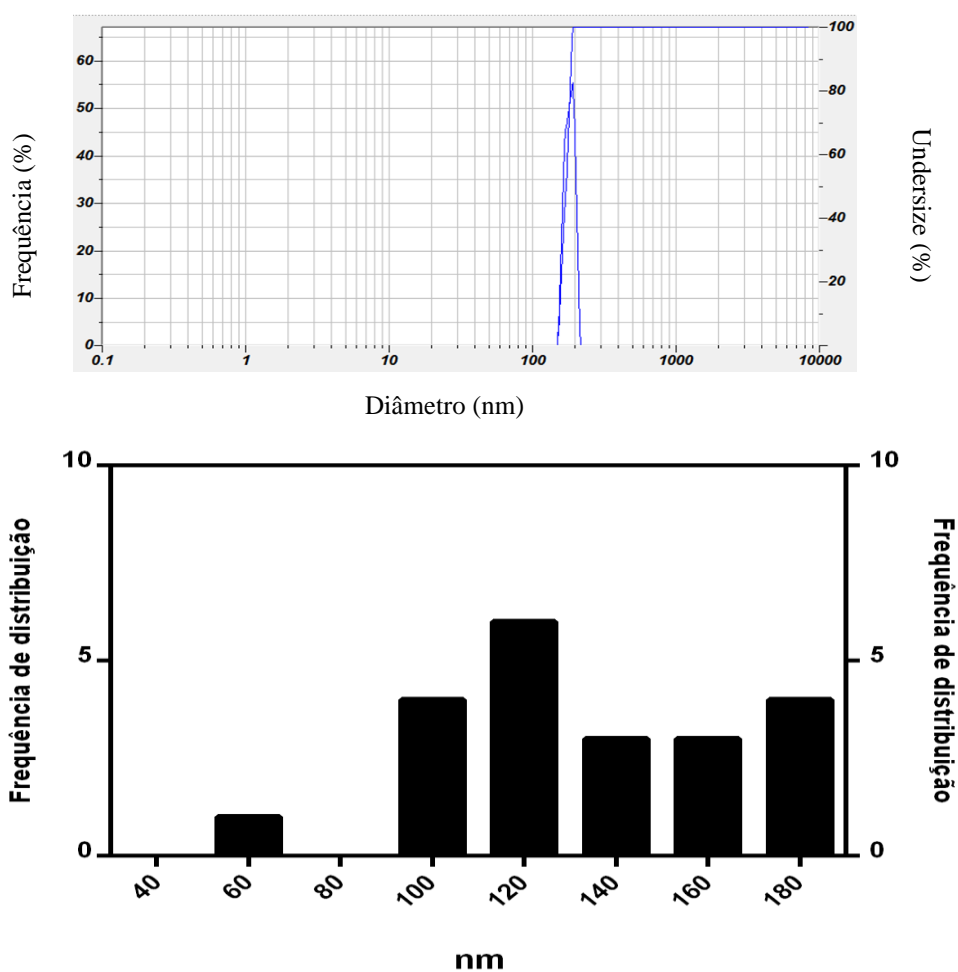


FIGURA 22. (A) DLS das nanopartículas de BSA; (B) DLS das nanopartículas de BSA@EU

Fonte: Autor

Os dados de DLS das NP's de BSA@EU (FIGURA 22-B), mostrando tamanho hidrodinâmico médio de 131,9 nm, com uma moda de 120 nm, correlacionam-se bem com os dados de DLS das NP's da albumina pura. Conforme apontam também os dados de potencial zeta dos nanossistemas.

A magnitude do potencial zeta é um indicador da estabilidade de suspensões de nanopartículas com valores de potencial zeta maiores que 25 mV, em módulo, normalmente têm altos graus de estabilidade (HONARY & ZAHIR, 2013; KASZUBA *et al*, 2010).

A análise do potencial zeta mostrou uma boa estabilidade hidrodinâmica das nanopartículas de matriz biopoliméricas produzidas pelo processo de dessolvatação assistida por ultrassom. As nanopartículas de BSA apresentam um potencial zeta de -36,80 mV, valor semelhante ao potencial zeta das NP's de BSA@EU, -38,97 mV. A estabilidade apresentada pelas nanopartículas de albumina se deve a estabilidade da BSA na faixa de pH de trabalho (KIM *et al*, 2005), de 6,56 a 7,59; assim como a capacidade tamponante intrínseca da proteína (CURVALE, SAN & SAN, 2009), capaz de manter estreita a faixa de pH de trabalho; uma vez a BSA tem uma tendência natural para agregação sob condições de estresse, como pH extremos (BRAHMA, MANDAL & BHATTACHARYYA, 2005), (FIGURA 23).

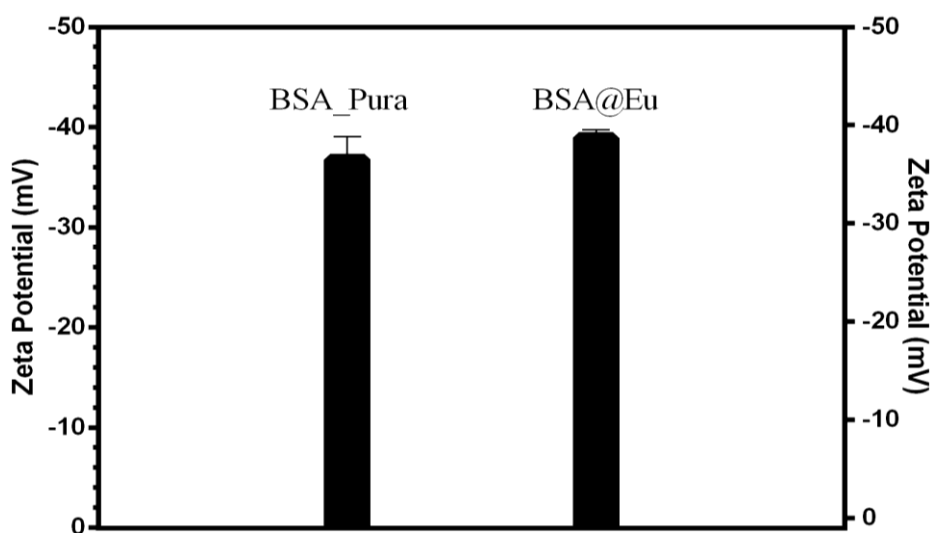


FIGURA 23. Potencial zeta das nanopartículas de BSA_Pura e BSA@EU

Fonte: Autor

A estabilidade das nanopartículas de BSA também está relacionada a aplicação de ultrassom sobre o sistema de dessolvatação. A aplicação de ultrassom causa mudanças sutis na estrutura e conformação da proteína, aumentando número de resíduos carregados que estão

presentes na superfície da molécula de proteína e expostos ao solvente, aumentando a carga global da proteína, resultando no aumento da magnitude do potencial zeta (BRAHMA, MANDAL & BHATTACHARYYA, 2005).

O tamanho nanométrico uniforme e a estabilidade dos sistemas são decorrentes do processo empregado, a cavitação ultrassônica. Essa tecnologia tem sido utilizada para desaglomerar e dispersar nanomateriais, após o tratamento sonoquímico, induzindo uma grande redução no tamanho das partículas (SHEN, 2003).

Imagens de microscopia de força atômica (AFM) confirmam que o método de dessolvatação assistida por ultrassom permitiu a produção de nanopartículas de BSA e BSA@EU de forma esférica e tamanho polidispersos, conforme observamos nas Figuras 24 A e 24 B.

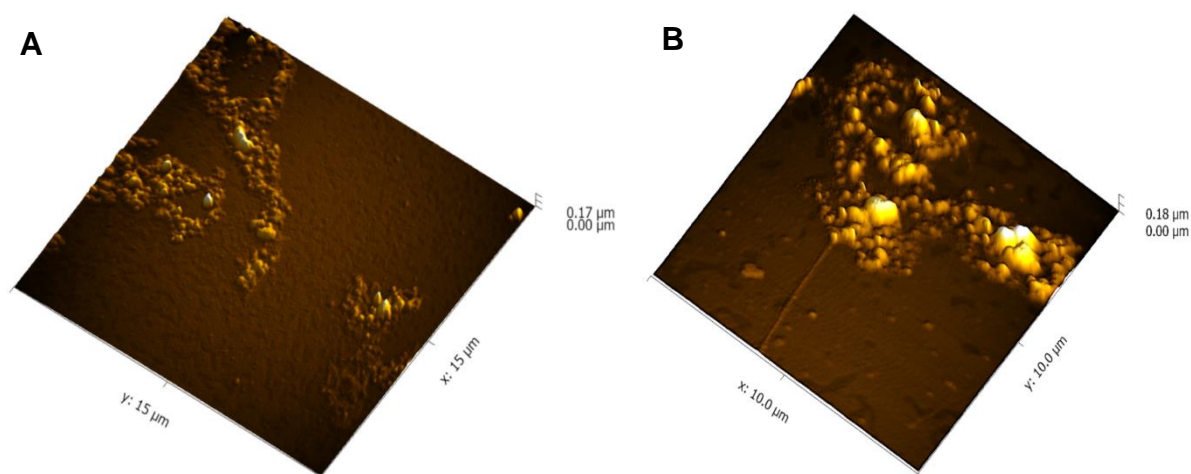


FIGURA 24. (A) Microscopia de Força Atômica (AFM) das nanopartículas de BSA pura; (B) Microscopia de Força Atômica (AFM) das nanopartículas de BSA@EU.

Fonte: Autor

5.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR evidenciam que as nanopartículas de albumina produzidas pelo método de dessolvatação assistida por ultrassom interagem quimicamente com as nanopartículas, evidenciando que as nanopartículas produzidas encontram-se carregadas com eugenol (FIGURA 25).

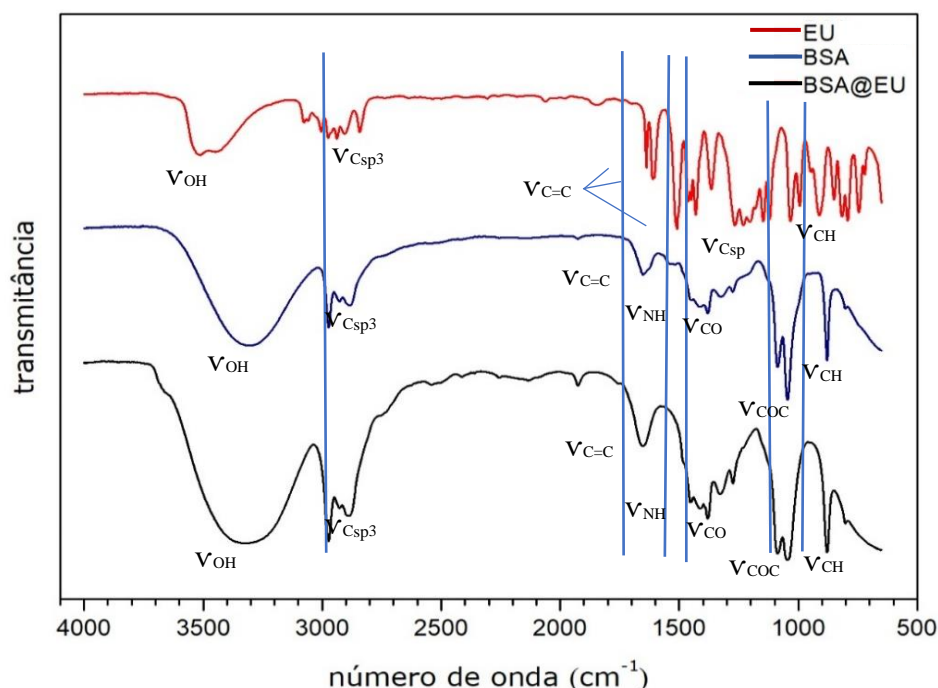


FIGURA 25. FTIR: eugenol (vermelho); BSA NP's (azul); BSA@EU (preto)
Fonte: Autor

Os dados teóricos reproduziram as características do eugenol e do BSA em boa concordância com os espectros experimentais dessas substâncias. As bandas de absorção característica no FTIR da BSA aparecem em 3311 cm^{-1} , banda intensa característica de estiramento OH; em 2975 cm^{-1} atribuído aos grupos metila; entre 1644 cm^{-1} e 1525 cm^{-1} bandas atribuídas à vibrações de flexão da amida primária (R-NH₂) e de amidas secundárias (R-NH-R), respectivamente (NOSRATI *et al*, 2018).

As bandas típicas das amidas primárias de BSA aparecem, no gráfico, em região de 1650 cm^{-1} ; e a banda de amida secundária com fase de acoplamento da vibração de flexão de NH e o alongamento de vibração das bandas CN sobrepostas em 1540 cm^{-1} (JHONSI, KATHIRAVAN, & RENGANATHAN, 2009).

Os espectros de FTIR permitem identificar a formação de NP's pela observação de perturbações na estrutura secundária de proteínas. O deslocamento e a diminuição de intensidade das bandas na região de 1700 cm^{-1} (vibração de estiramento de amina primária) evidenciam a modificação da estrutura secundária da proteína, comprovando a formação de estruturas poliproteicas que levam a formação das nanopartículas (SAURAV *et al*, 2014).

Outros bandas características da BSA aparecem em 2930 cm^{-1} e 2890 cm^{-1} de vibração de estiramento C-H, e C-H de compostos metóxi; e em 1270 cm^{-1} atribuído à amida terciária na fase de combinação de flexão de NH e alongamento de CN (RANI, 2016). As

bandas discretas em 1640 cm^{-1} e 1515 cm^{-1} representam ligação $\text{C} = \text{C}$ aromáticas; já as bandas intensas em 1087 cm^{-1} e 1047 cm^{-1} correspondem a flexões $\text{C} - \text{O} - \text{C}$.

Os espectros de infravermelho também evidenciam a interação do eugenol com as nanopartículas de BSA produzidas (linha preta no gráfico). O deslocamento e o alargamento das bandas em 3330 cm^{-1} , característica de estiramento OH ; na região de 2890 a 2975 cm^{-1} , atribuído aos grupos metílicos (C_{sp^3}) e os grupos metílicos do grupo metóxi.

Observa-se ainda o aparecimento de uma banda intensa em 1650 cm^{-1} , principalmente de estiramento $\text{C} = \text{C}$ aromático; e o aumento das contribuições de deformações de CH_2 e dos grupos CH_3 (flexão em tesoura) aparecem em torno de 1450 cm^{-1} e em 1410 cm^{-1} respectivamente.

O aparecimento das bandas próximas a 1100 cm^{-1} , linha preta, evidencia a formação de interações fortes (possivelmente das ligações de hidrogênio) entre o eugenol e os sítios ativos da proteína, evidenciando a presença de moléculas de eugenol nas nanopartículas produzidas, corroborando os dados experimentais de ancoragem molecular.

A deconvolução da banda amida I – região de 1700 a 1600 cm^{-1} (Gráfico 10), mostra as bandas características de uma α -hélice (1660 - 1650 cm^{-1}), folha β (1637 - 1614 cm^{-1}), e um β -antiparalelo (1691 - 1680 cm^{-1}), (BROWN, HASSAN & WALDMAN, 2000), evidenciando a manutenção da estrutura secundária da proteína (FIGURA 26).

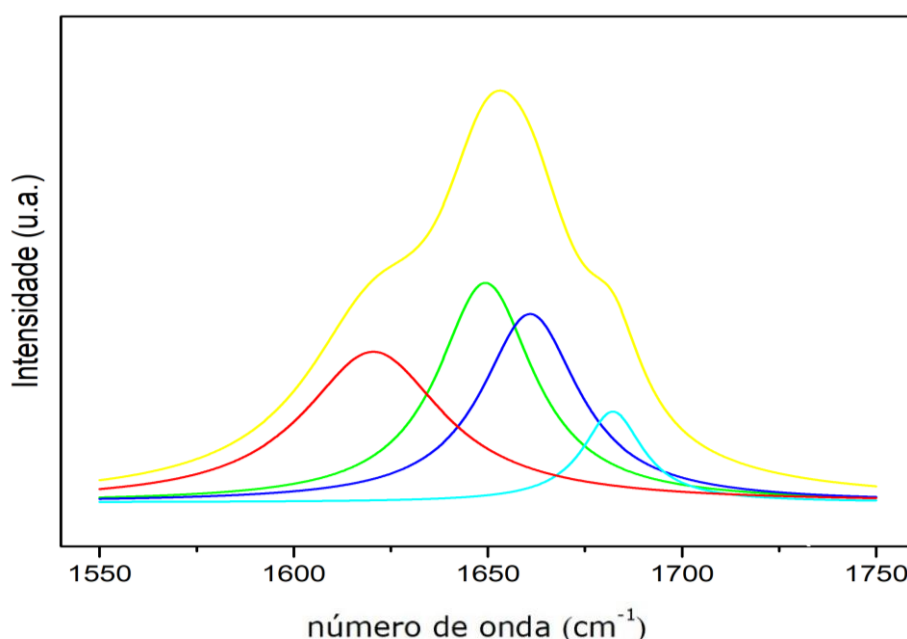


FIGURA 26. Deconvolução da banda de amida I - região de 1750 a 1550 cm^{-1}
Fonte: Autor

5.3.4. Espectroscopia Raman

Assim como os dados de FTIR, os dados experimentais de espectroscopia Raman reproduzem as características do material em boa concordância com os espectros teóricos. No caso particular do uso da espectroscopia Raman para detecção e investigação de proteínas diferentes estratégias são relatadas na literatura com base na detecção direta de marcadores ou na detecção indireta de marcadores ligados a proteínas (LI *et al*, 2014) (POZZI *et al*, 2013). A técnica também é muito útil para detectar mudanças conformacionais e estruturais (REYMOND-LARUINAZ *et al*, 2016).

Para as NP's de BSA podem se observar picos centrados em 1656 e 1339 cm^{-1} , correspondentes às amidas primárias e terciárias presentes na estrutura da proteína, os quais estão relacionados à estrutura secundária α -helicoidal da proteína. O espalhamento correspondente à banda de amida terciária é encontrado na faixa de 1230 a 1310 cm^{-1} com picos pouco intensos. Picos intensos próximos a 1450, 950 e 900 cm^{-1} , correspondentes às bandas de deformação CH_2 e CH_3 , também são observados (FIGURA 27).

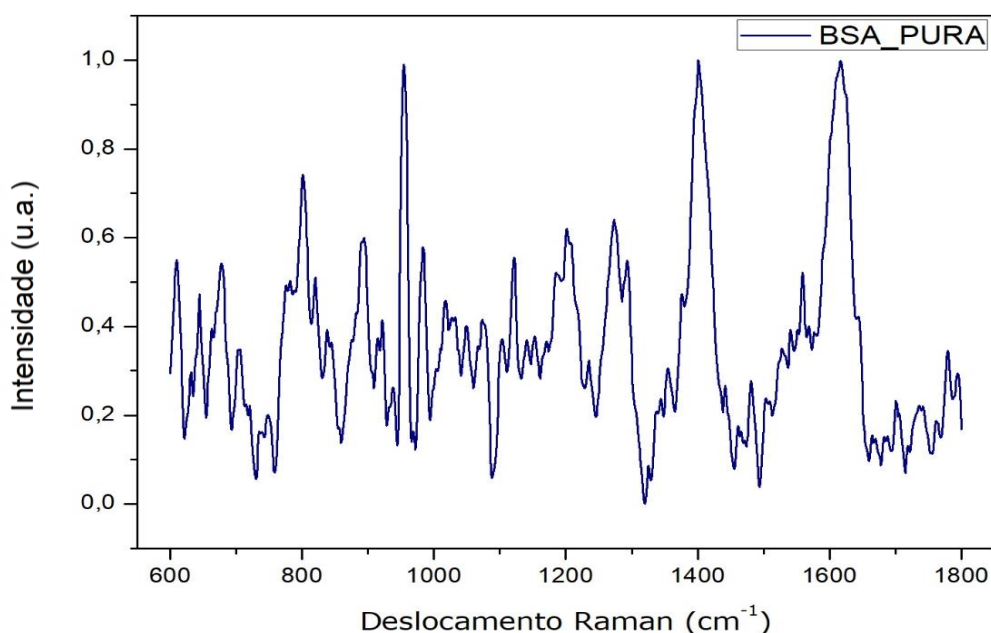


FIGURA 27. Espectro Raman das nanopartículas de albumina
Fonte: Autor

Um pico intenso de amida primária é observado na região entre 1600 e 1700 cm^{-1} , a partir do estiramento $\text{C}=\text{O}$ combinado com uma pequena quantidade de estiramento $\text{C}-\text{N}$ do

acoplamento do estiramento C-N e deformação angular N-H, obtém-se um pico característico de amida terciária entre 1200 e 1340 cm^{-1} . Estes picos principais, característicos da estrutura secundária da proteína, podem ser observados no espectro das nanopartículas de BSA e BSA@EU.

Os picos atribuídos aos resíduos de aminoácidos, como o triptofano (1650 cm^{-1} e 1380 cm^{-1}), tirosina (1200 cm^{-1} , 1180 cm^{-1} , 800 cm^{-1} , e 640 cm^{-1}) e fenilamina (1200 cm^{-1} , 985 cm^{-1} , 955 cm^{-1} e 610 cm^{-1}) surgem devido à vibração de *breathing* do anel aromático presente nessas estruturas (BHOGALE *et al*, 2014). Um pico forte também pode ser observado em 1620 cm^{-1} , característico da amida terciária (α -hélice) da BSA devido ao acoplamento do alongamento C-N com o modo de deformação angular de N-H.

Do acoplamento do estiramento C-N com a deformação angular de N-H obtém-se o pico característico de amida terciária entre 1220 cm^{-1} a 1310 cm^{-1} . A faixa de 930 cm^{-1} a 950 cm^{-1} é baseada no modo de estiramento do esqueleto N-C α -C, e sua intensidade é indicativa do conteúdo da α -hélice, evidenciando, a manutenção da estrutura secundária da proteína produzidas pelo método de dessolvatação assistida por ultrassom.

A formação de ligações dissulfeto é um processo que auxilia o enovelamento de proteínas, na constituição da estrutura quaternária da proteína. A ligação dissulfeto é uma ligação covalente entre unidades de enxofre presentes nos resíduos da proteína, crucial para manter a estrutura da proteína ativa. Os picos referentes às ligações dissulfeto da proteína podem ser observados no espectro Raman na região de 510 nm a 540 nm (FIGURA 28).

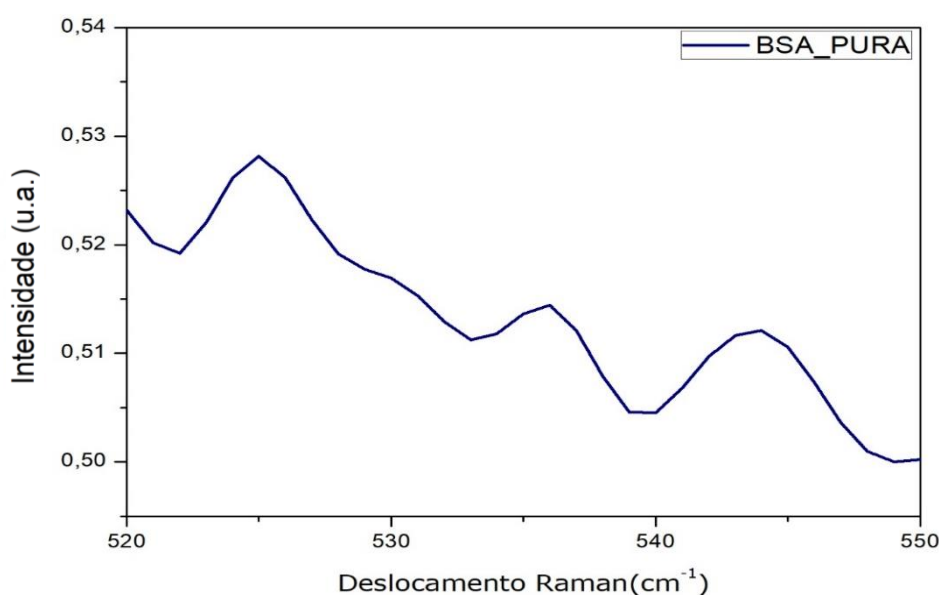


FIGURA 28. Espectroscopia Raman – ligações dissulfeto BSA_Pura NP's
Fonte: Autor

A região das interações dissulfeto das nanopartículas de BSA pode ser vista em 524, 536 e 542 cm^{-1} ; evidenciando que a estrutura quaternária da proteína é mantida após o processo de produção das nanopartículas de albumina pelo método de dessolvatação assistida por ultrassom. Indicando que o ultrassom não provoca perdas de material proteico durante o processo de produção das NP's de BSA.

No espectro das nanopartículas de BSA@EU (FIGURA 29) podemos identificar os picos característicos do eugenol em 1318, 1288 e 1266 cm^{-1} . Dentre esses picos, o de 1288 cm^{-1} é atribuído a uma vibração localizada na cadeia lateral do propenil, com contribuições dos modos vibracionais de estiramento C = C, estiramento simétrico = CH₂ e flexão CH. O pico em 1660, atribuído à vibração de alongamento da ligação exocíclica C = C. Além do pico em 793 cm^{-1} , que também aparecem no espectro de infravermelho da substância, e um pico Raman característico do modo de respiração do anel aparece em 980 cm^{-1} . E ente 1438-1480 cm^{-1} o modo de deformação angular simétrica no plano - tesoura (CH₃), para o benzeno metóxi-substituído. Evidenciando a incorporação das moléculas de eugenol aos sítios ativos da proteína.

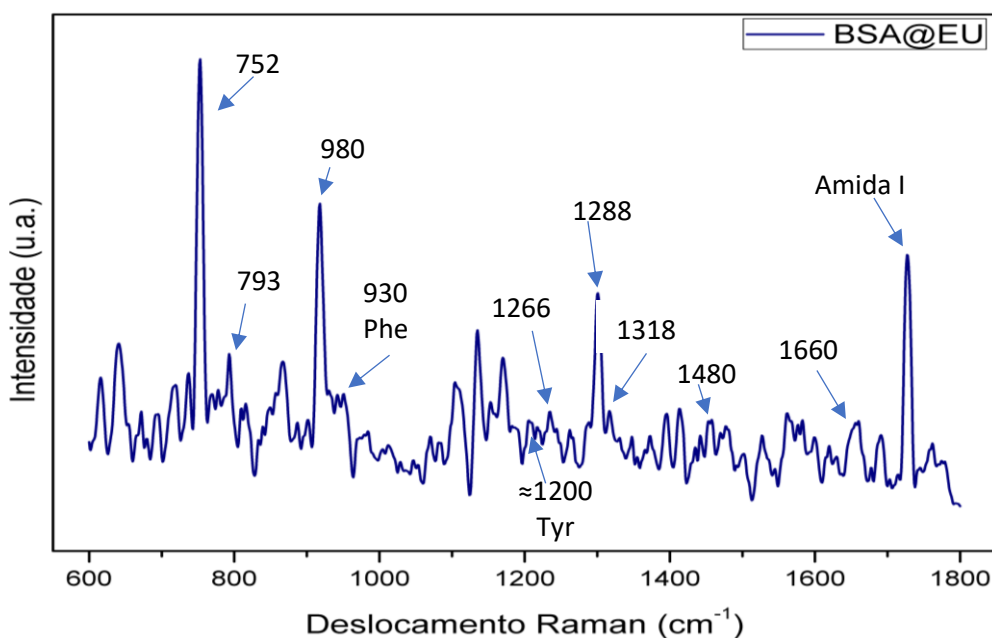


FIGURA 29. Espectroscopia Raman BSA@EU NPs

Fonte: Autor

A partir desses dados pode se inferir a incorporação do eugenol a matriz proteica das NPs de BSA, bem como a preservação da atividade da proteína, sem que haja prejuízo das

suas funções biológicas, devido a manutenção estrutura nativa da proteína, uma vez que, as proteínas apresentam elevada correlação entre sua estrutura conformacional e as suas funções biológicas.

5.4. Hemólise

As nanopartículas devem apresentar compatibilidade sanguínea com o valor mínimo de efeito hemolítico. Para avaliar o efeito hemolítico das nanopartículas o ensaio de hemólise foi utilizado para estimar a adaptabilidade do sangue às nanopartículas de BSA e BSA@EU. A atividade hemolítica das amostras foi quantitativamente especificada avaliando-se a absorbância do sobrenadante em um espectrofotômetro a 550 nm (FIGURA 30).

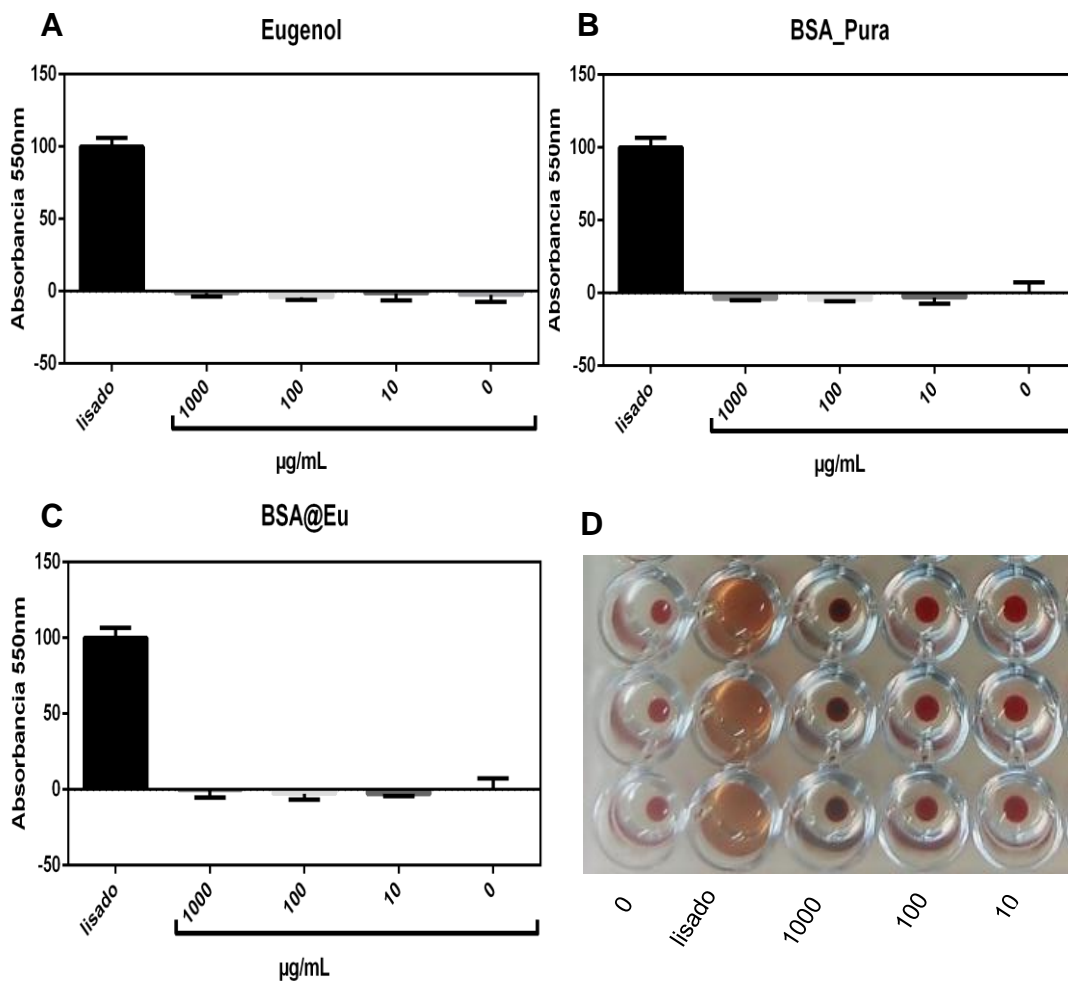


FIGURA 30. Atividade hemolítica (A) eugenol; (B) nanopartículas de BSA pura; (C) nanopartículas de BSA@EU; (D) poços – vista superior

Fonte: Autor

Os resultados do teste de atividade hemolítica *in vitro* demonstram que tanto o eugenol, quanto as nanopartículas de BSA, bem como as nanopartículas de BSA@EU, não apresentam ação hemolítica, mesmo quando em concentrações mais elevadas (1 mg.mL^{-1}). Tais resultados evidenciam a biocompatibilidade com componentes do sangue tanto do eugenol, quanto das nanopartículas de albumina; o que é desejável para sua utilização biológica, especialmente na entrega de drogas (SALEHIABAR *et al*, 2018).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de ancoragem e *redocking* realizados no *SwissDock* e *AutoDock Vina*, respectivamente, revelaram a capacidade do eugenol de inibir a atividade da COX-2 de forma semelhante a ação dos AINES aspirina e diclofenaco, interagindo por ligação de hidrogênio aos fragmentos de aminoácido do sítio catalítico da proteína, Ser 530 e Tyr 385. Os estudos de ancoragem molecular demonstraram ainda que o eugenol, teoricamente, apresenta a capacidade de dupla inibição COX/LOX, evidenciando a capacidade de dupla inibição da cascata do ácido araquidônico, demonstrando a capacidade anti-inflamatória do eugenol, e seu potencial como agente anticancerígeno.

Os efeitos do fenômeno de cavitação, ou seja, a formação, crescimento e colapso de microbolhas gasosas em fase líquida permitiram usar a dessolvatação assistida por ultrassom como um método de síntese inovador na produção de materiais nanoestruturados por meio da aplicação do ultrassom para processos de síntese, desaglomeração, dispersão, emulsificação, funcionalização e de ativação das partículas de albumina, com diversas vantagens, tais como, maior estabilidade hidrodinâmica e tamanho homogêneo devido a ação das bolhas de cavitação.

A técnica de dessolvatação assistida por ultrassom permitiu o preparo e formula de NP's de albumina usando cavitação sônica para produzir nanoemulsões de albumina por dessolvatação. A técnica de dessolvatação assistida por ultrassom permitiu a produção de nanopartículas de BSA@EU de tamanho médio de 170 nm de diâmetro, apresentando excelente estabilidade hidrodinâmica.

Foram obtidos sistemas nanoestruturados constituídos de nanopartículas estáveis e de tamanhos uniformes capazes de carrear diferentes tipos de fármacos hidrofóbicos: as nanopartículas de albumina produzidas por dessolvatação assistida por ultrassom apresentam-se como um promissor sistema para carregamentos de drogas hidrofóbicas, e as nanopartículas BSA@EU mostram-se um promissor sistema para administração de eugenol para prevenção e tratamento de doenças inflamatórias e do câncer, inclusive o câncer de mama.

Técnicas de espectroscopia FTIR e Raman evidenciaram a formação de nanoestruturas com manutenção da estrutura e função básica da proteína, bem com a capacidade de ligação do eugenol à estrutura nanoproteica dos sistemas produzidos. Os dados de ancoragem e análise de Química Computacional evidenciam a formação de ligações de hidrogênio entre o eugenol e os fragmentos de aminoácido do sítio ativo da BSA, evidenciando a capacidade de carregamento das moléculas da substância pelas nanopartículas de BSA.

Os estudos desenvolvidos neste trabalho levaram ao desenvolvimentos de nanodispositivos promissores e resultaram em dois pedidos de patentes, o depósito das patentes, a realização de testes biológicos *in vitro* e *in vivo*, o emprego do eugenol como *lead* para o desenvolvimento de novas moléculas capazes de atuar no processo anti-inflamatório e no combate ao câncer são perspectivas futuras para se dar continuidade ao trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M. L.; HAFEZ, M. M.; AL-HOSHANI, A.; AL-SHABANAH, O. “Activity of Eugenol against Triple Negative and HER2 Positive Breast Cancer Cells.” *BMC Complementary and Alternative Medicine* 5 (321): 1–11. 2018.
- ABROSIMOVA, K. V.; SHULENINA, O. V.; PASTON, S. V. “FTIR Study of Secondary Structure of Bovine Serum Albumin and Ovalbumin.” *Journal of Physics: Conference Series* 769 (1). 2016. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/769/1/012016>.
- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. “Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins.” *Chemical Reviews* 106 (5): 1589–1615. 2006. <https://doi.org/10.1021/cr040426m>.
- AIN, Q.; GREIG, N. H.; NAWAZ, M. S.; RASHID, S.; KAMAL, M. A. “Exploring N1-p-Fluorobenzyl-Cymserine as an Inhibitor of 5-Lipoxygenase as a Candidate for Type 2 Diabetes and Neurodegenerative Disorder Treatment.” *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13 (2): 197–202. 2016.
- AMES, B. N.; GURNEY, E. G.; MILLER, J. A.; BARTSCH, H. “Carcinogens as Frameshift Mutagens: Metabolites and Derivatives of 2-Acetylaminofluorene and Other Aromatic Amine Carcinogens.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (11): 3128–32. 1972. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.11.3128>.
- ARTHUR, D. E., UZAIRU, A. “Journal of King Saud University – Science Molecular Docking Studies on the Interaction of NCI Anticancer Analogues with Human Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit.” *Journal of King Saud University - Science*, no. xxxx: 1–16. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.01.011>.
- ASHA JHONSI, M.; KATHIRAVAN, A.; RENGANATHAN, R. “Spectroscopic Studies on the Interaction of Colloidal Capped CdS Nanoparticles with Bovine Serum Albumin.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 72 (2): 167–72. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.030>.
- AVCI, D.; ATALAY, Y. “Comparative Study of DFT/B3LYP, B3PW91 and HSEH1PBE Methods Applied to Molecular Structures, Spectroscopic and Electronic Properties of Flufenpyr and Amipizone.” *Canadian Journal of Chemistry* · 93 (2016): 1147–56. 2015. <https://doi.org/10.1139/cjc-2015-0176>.
- BARREIRO, C. E. J.; FRAGA, A. M. *Química Medicinal - 3.Ed.: As Bases Moleculares Da Ação Dos Fármacos*. 3rd ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 2015.
- BASU, S.; COMBE, K.; KWIATKOWSKI, F.; CALDEFIE-CHÉZET, F.; PENAULT-LLORCA.; BIGNON, Y. J.; VASSON; M. P. “Cellular Expression of Cyclooxygenase, Aromatase, Adipokines, Inflammation and Cell Proliferation Markers in Breast Cancer Specimen.” *PLoS ONE* 10 (10): 1–19. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138443>.
- Bezerra, D. P.; Morais, M. C. “The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment.” *Nutrients* 9 (1367): 1–15. 2017.

<https://doi.org/10.3390/nu9121367>.

BHARDWAJ, A.; KAUR, J.; WUEST, M.; WUEST, F. “In Situ Click Chemistry Generation of Cyclooxygenase-2 Inhibitors.” *Nature Communications* 8 (1): 1–13. 2017.
<https://doi.org/10.1038/s41467-016-0009-6>.

BHOGALE, A.; PATEL, N.; MARIAM, J.; DONGRE, P. M.; MIOTELLO, A.; KOTHARI, D. C. “Comprehensive Studies on the Interaction of Copper Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Various Spectroscopies.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113: 276–84. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.021>.

BIN, A. Z. “Use of Ultrasound in Enhancing Productivity of Biotechnological Processes.” Massey University. 2011.

BLOBAUM, A. L.; MARNETT, L. J.; “Perspecti V e Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition.” *Journal of Medicinal Chemistry* 50 (7). 2007.
<https://doi.org/10.1021/jm0613166>.

BLUM, V.; GEHRKE, R.; HANKE, F.; HAVU, P.; HAVU, V.; REN, X.; REUTER, K.; SCHEFFLER, M. “Ab Initio Molecular Simulations with Numeric Atom-Centered Orbitals.” *Computer Physics Communications* 180 (11): 2175–96. 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.cpc.2009.06.022>.

BONAMICI, D. Sistema de Classificação Biofarmacéutica e Bioinserções. Tese, Faculdade de Ciências farmacéuticas - USP. 2009.
https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-29032010-151226/publico/Dissertacao_DeniseBonamici.pdf.

BOUHEKKA, A.; BÜRGI, T. “In Situ ATR-IR Spectroscopy Study of Adsorbed Protein: Visible Light Denaturation of Bovine Serum Albumin on TiO₂.” *Applied Surface Science* 261: 369–74. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.08.017>.

BRAHMA, A.; MANDAL, C.; BHATTACHARYYA. “Characterization of a Dimeric Unfolding Intermediate of Bovine Serum Albumin under Mildly Acidic Condition.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1751: 159–69. 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.007>.

BROWN, R. D.; HASSAN, M.; WALDMAN, M. “Combinatorial Library Design for Diversity, Cost Efficiency, and Drug-like Character11Color Plates for This Article Are on Page 537.” *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 18 (4–5): 427–37. 2000.
[https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(00\)00072-3](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00072-3).

CANAVESE, G.; ANCONA, A.; RACCA, L.; CANTA, M.; DUMONTEL, B.; BARBARESCO, F.; LIMONGI, T.; CAUDA, V. “Nanoparticle-Assisted Ultrasound: A Special Focus on Sonodynamic Therapy against Cancer.” *Chemical Engineering Journal* 340: 155–72. 2018a. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.060>.

———. “Nanoparticle-Assisted Ultrasound: A Special Focus on Sonodynamic Therapy against Cancer.” *Chemical Engineering Journal* 340 (January): 155–72.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.060>. 2018b.

CHARAN RAJA, M. R.; SRINIVASAN, V.; SELVARAJ, S.; MAHAPATRA, S. K. "Eugenol: A Versatile Phytomedicine." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7: 35–40. 2015.

CHARITIDIS, C. A.; GEORGIU, P. KOKLIOTI, M. A.; TROMPETA, A. F.; MARKAKI, V. "Manufacturing Nanomaterials: From Research to Industry." *Manufacturing Review* 1. 2014. <https://doi.org/10.1051/mfreview/2014009>.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. "Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs." *Oncotarget* 9 (6): 7204–18. 2018. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.

COSTA-JUNIOR, H. M.; MENDES, A. N.; DAVIS, G. H. N. G. CRUZ, C. M C. et al. "ATP-Induced Apoptosis Involves a Ca²⁺-Independent Phospholipase A2 and 5-Lipoxygenase in Macrophages." *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 88 (1–2): 51–61. 2009.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. "Inflammation and Cancer: Advances and New Agents." *NATURE REVIEWS*, 1–13. 2015. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.105>.

CURVALE, R. A.; SAN, N. D. E.; SAN, L. "Buffer Capacity of Bovine Serum Albumin (BSA)." *Journal of the Argentine Chemical Society* 97: 174–80. 2009.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. "SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules." *Nature Publishing Group*, no. January: 1–13. 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

———. "SwissTargetPrediction: Updated Data and New Features for Efficient Prediction of Protein Targets of Small Molecules." *Nucleic Acids Research* 47 (Web Server): 357–64. 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>.

DIAZ, R. J.; MCVEIGH, P. Z.; O'REILLY, M. A.; et al. "Focused Ultrasound Delivery of Raman Nanoparticles across the Blood-Brain Barrier: Potential for Targeting Experimental Brain Tumors." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 10 (5): 1075–87. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.12.006>.

DRAHANSKY, M.; PARIDAH, M.; MORADBAK, A.; MOHAMED, A. Z.; OWOLABI, F. A. T.; ASNIZA, M.; KHALID, S. H. P. A. "We Are IntechOpen, the World's Leading Publisher of Open Access Books Built by Scientists, for Scientists TOP 1%." *Intech i (tourism)*: 13. 2016. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.

DRAL, P. O.; WU, X.; THIEL, W. "Semiempirical Quantum-Chemical Methods with Orthogonalization and Dispersion Corrections." *Journal of Chemical Theory and Computation* 15 (3): 1743–60. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01265>.

EDDERSHAW, P.; BERESFORD, A.; BAYLISS, M. "ADME/PK as Part of a Rational Approach to Drug Discovery." *Drug Discovery Today* 5 (9): 409–14. 2000. [https://doi.org/S1359-6446\(00\)01540-3](https://doi.org/S1359-6446(00)01540-3) [pii].

- EJUH, G. W.; ABE, M. T. O.; F. NYA, T.; NDJAKA, J. M. B. "Prediction of Electronic Structure, Dielectric and Thermodynamical Properties of Flurbiprofen by Density Functional Theory Calculation." *Karbala International Journal of Modern Science* 4 (1): 12–20. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.10.001>.
- ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. "Albumin-Based Nanoparticles as Potential Controlled Release Drug Delivery Systems." *Journal of Controlled Release* 157 (2): 168–82. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>.
- ENAN, E. E.; BESSETTE, S. M. 2005. Breast cancer treatment using natural plant essential oils. WO2000/033857, issued 2005.
- FONSECA, D. P.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. "Bovine Serum Albumin-Based Nanoparticles Containing Resveratrol: Characterization and Antioxidant Activity." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 39: 147–55. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.03.017>.
- FUJISAWA, S.; MURAKAMI, Y. "Eugenol and Its Role in Chronic Diseases." *Drug Discovery from Mother Nature*, 45–66. 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6>.
- GARRIGUE, J. S.; LAMBERT, G.; RAZAFINDRATSITA, A.; BENITA, S. Self-nanoemulsifying oily formulation for the administration of poorly water-soluble drugs. EP1510206A1, issued 2005. <https://patents.google.com/patent/EP1510206A1>.
- GFELLER, D.; WIRTH, M.; DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. "SwissTargetPrediction: A Web Server for Target Prediction of Bioactive Small Molecules." *Nucleic Acids Research* 42 (Web Server): 32–38. 2014. <https://doi.org/10.1093/nar/gku293>.
- GHOSE, A. K., VISWANADHAN, V. N.; WENDOLOSKI, J. J. "A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases." *Journal of Combinatorial Chemistry* 1 (1): 55–68. 1999. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
- GLEESON, M. P. "Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb." *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (4): 817–34. 2008. <https://doi.org/10.1021/jm701122q>.
- GONZÁLEZ-CORTÉS, S.; IMBERT, F. E. *Advanced Solid Catalysts for Renewable Energy Production*. IGI Global. 2018.
- GREEN, M. R.; MANIKHAS, G. M.; ORLOV, S.; AFANASYEV, B.; MAKHSON, A. M.; BHAR, P.; HAWKINS, M. J. "Abraxane, a Novel Cremophor-Free, Albumin-Bound Particle Form of Paclitaxel for the Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *Annals of Oncology* 17 (June): 1263–68. 2006. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl104>.
- GREGORY, C. *Sonochemistry: New Opportunities For Green Chemistry*. New Jersey: World Scientific Publishing Company. 2016.
- GUEDES, I. A.; CAMILA S. M.; DARDENNE, L. E. "Receptor-Ligand Molecular Docking." *Biophysical Reviews* 6 (1): 75–87. 2014. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130->

2.

HARIKA, M. S. "Docking Studies of Benzimidazole Derivatives Using HEX 8.0." *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 8 (4): 1677–88. 2017. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8\(4\).1677-88](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8(4).1677-88).

HAZANI, M.; ZAID, M.; ABDULLAH, J.; YUSOF, N. A.; SULAIMAN, Y.; WASOH, H.; NOH, M. F.; ISSA, R. "PNA Biosensor Based on Reduced Graphene Oxide/Water Soluble Quantum Dots for the Detection of Mycobacterium Tuberculosis." *Sensors & Actuators: B. Chemical*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.045>.

HIDALGO, M. E.; DE ROSA, C. "Antioxidant Capacity of Eugenol Derivatives." *Quim. Nova* 32 (6): 1467–70. 2009.

HIELSCHER, T. "Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions." ENS'05 Paris, France, 14-16. 2005

HONARY, S.; ZAHIR, F. "Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2)." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12 (2): 265–73. 2013.

HUANG, X.; CADDELL, R.; YU, B. O.; XU, S. "Ultrasound-Enhanced Microfluidic Synthesis of Liposomes." *Anticancer Res* 30 (2): 463–66. 2013.

HUSSAIN, Z.; KHAN, J. A.; MURTAZA, S. "Nanotechnology: An Emerging Therapeutic Option for Breast Cancer." *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 28 (2): 163–75. 2018.

ISHAQ LERRICK, R. "Direct Oxidation of Eugenol Using a Permanganate." *Molekul* 4 (1): 48. <https://doi.org/10.20884/1.jm.2009.4.1.62>. 2009.

JAGANATHAN, S. K.; SUPRIYANTO, E. "Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells." *Molecules* 17: 6290–6304. <https://doi.org/10.3390/molecules17066290>. 2012.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; DASTMALCHI, S.; DAVARAN, S. "A Simple Improved Desolvation Method for the Rapid Preparation of Albumin Nanoparticles." *International Journal of Biological Macromolecules* 91: 703–9. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.032>.

JENITA, J. L.; WILSON, B.; CHOCALINGAM, V. "Albumin Nanoparticles Coated with Polysorbate 80 as a Novel Drug Carrier for the Delivery of Antiretroviral Drug-Efavirenz." *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 4 (3): 142. 2014. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.138348>.

JOSHI, D.; SONI, R. K. "Laser-Induced Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Conjugation with Protein." *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 116 (2): 635–41. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00339-013-8210-5>.

KASZUBA, M.; CORBETT, J.; WATSON, F. M.; ANDREW, J.. "High-Concentration Zeta

Potential Measurements Using Light-Scattering Techniques.” *Phil. Trans. R. Soc. A* 368: 4439–51. 2010 <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0175>.

KAUFMAN, T. S. “The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals.” *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (6): 1055–85. 2015.

KERI, G.; TOTH I. *Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research*. CRC Press, 2002.

KIEFER, J. R.; PAWIITZ, J. L.; MORELAND, K. T.; et al. “Structural Insights into the Stereochemistry of the Cyclooxygenase Reaction.” *Nature* 405 (6782): 97–101. 2000. <https://doi.org/10.1038/35011103>.

KIM, J.; TALUJA, A.; KNUTSON, K.; HAN, Y. “Stability of Bovine Serum Albumin Complexed with PEG-Poly (1-Histidine) Diblock Copolymer in PLGA Microspheres.” *Journal of Controlled Release* 109: 86–100. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.016>.

KOTANI, S.; IRIE, S.; IZUMIZAKI, M.; ONIMARU, H. “Effects of Eugenol on Respiratory Burst Generation in Newborn Rat Brainstem-Spinal Cord Preparations.” 2017. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2074-z>.

KOUCHAKZADEH, H.; SAFAVI, M. S. *Efficient Delivery of Therapeutic Agents by Using Targeted Albumin Nanoparticles. Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery*. 1st ed. Elsevier Inc. 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.11.002>.

KUDARHA, R. R.; SAWANT, K. K. “Albumin Based Versatile Multifunctional Nanocarriers for Cancer Therapy: Fabrication, Surface Modification, Multimodal Therapeutics and Imaging Approaches.” *Materials Science and Engineering C* 81 (August): 607–26. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.004>.

KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; et al. “Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Anti-Inflammatory Agents,” no. February: 0–5. 1997. <https://doi.org/10.1038/384644a0>.

LAGORCE, D.; SPERANDIO, O.; GALONS, H.; MITEVA, M. A.; VILLOUTREIX, B. O. “FAF-Drugs2: Free ADME/Tox Filtering Tool to Assist Drug Discovery and Chemical Biology Projects.” *BMC Bioinformatics* 9: 1–9. 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-396>.

LEDESMA, A. E.; CHEMES, D. M.; FRÍAS, M. A.; TORRES, M. P. G. “Spectroscopic Characterization and Docking Studies of ZnO Nanoparticle Modified with BSA.” *Applied Surface Science* 412: 177–88. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.202>.

LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. “Computational Methods in Drug Discovery.” *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 12 (January): 2694–2718. 2016. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.267>.

LI, Y.; CHENG, P.; HE, J.; HUANG, H.; DENG, J. “Disposable Amperometric A-

Fetoprotein Immunosensor Based on the Biocompatible Silk Protein Membranes- Modified Indium Tin Oxide Electrodes,” no. December: 37–41. 2014.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2011.653898>.

LI, Y. S.; CHURCH, J. S. “Raman Spectroscopy in the Analysis of Food and Pharmaceutical Nanomaterials.” *Journal of Food and Drug Analysis* 22 (1): 29–48. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.003>.

LIMA, N.; ROCHA, G.; FREIRE, R.; SIMAS, A. “RM1 Semiempirical Model: Chemistry, Pharmaceutical Research, Molecular Biology and Materials Science.” *Journal of the Brazilian Chemical Society* 30 (4): 683–716. 2018. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180239>.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P. J. “Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Setting.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 23: 3–25. 1997.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.

LÓPEZ-LORENTE, A. I.; MIZAIKOFF, B. “Recent Advances on the Characterization of Nanoparticles Using Infrared Spectroscopy.” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 84: 97–106. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.012>.

LUCIDO, M. J.; ORLANDO, B. J.; VECCHIO, A. J.; MALKOWSKI, M. G. “Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry.” *Biochemistry* 55 (8): 1226–38. 2016.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01378>.

MA, X.; WANG, W.; ZOU, M.; DING, T.; YE, X.; LIU., D. “Properties and Structures of Commercial Polygalacturonase with Ultrasound Treatment: Role of Ultrasound in Enzyme Activation.” *RSC Advances* 5: 107591–600. 2015. <https://doi.org/10.1039/C5RA19425C>.

MAITI, N.; MALKAR, V. V.; MUKHERJEE, T.; KAPOOR, S. “Investigating the Interaction of Aminopolycarboxylic Acid (APCA) Ligands with Silver Nanoparticles: A Raman, Surface-Enhanced Raman and Density Functional Theoretical Study.” *Journal of Molecular Structure* 1156: 592–601. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.12.029>.

MAJUMDER, M.; DUNN, L.; LIU, L.; HASAN, A.; VINCENT, K.; BRACKSTONE, M.; HESS, D.; LALA, P. K. “COX-2 Induces Oncogenic Micro RNA MiR655 in Human Breast Cancer.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–15. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18612-3>.

MAKUNGA, N. P.; BRECHT, A. A method and composition for treating breast cancer. WO2016/046802, issued 2016.

MANJUBAASHINI, N.; KESAVAN, M. P.; RAJESH, J.; THANGADURAI, T. D. “Multispectroscopic and Bioimaging Approach for the Interaction of Rhodamine 6G Capped Gold Nanoparticles with Bovine Serum Albumin.” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 183 (2017): 374–84. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.05.005>.

MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; PELLETIER, J. P. “Therapeutic Role of Dual Inhibitors of 5-LOX and COX, Selective and Non-Selective Non-

- Steroidal Anti-Inflammatory Drugs.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 62 (6): 501–9. 2003. <https://doi.org/10.1136/ard.62.6.501>.
- MEEK, I. L.; VAN DE LAAR, M. A. F. J.; VONKEMAN, H. E. “Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks.” *Pharmaceuticals* 3: 2146–62. 2010. <https://doi.org/10.3390/ph3072146>.
- MENG, X.; ZHANG, H.; MEZEI, M.; CUI, M. “Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery.” *Curr Comput Aided Drug Des.* 7 (2): 146–157. 2011. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- MENGLE-GAW, L. J.; SCHWARTZ, B. D. “Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Promise or Peril?” *Mediators of Inflammation* · 11: 275–86. 2002. <https://doi.org/10.1080/09629350290000041>.
- MICHAEL J. L.; ORLANDO, B. J.; VECCHIO, A. J.; MALKOWSKI, M. G. “The Crystal Structure of Aspirin Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry.” *Biochemistry* 55 (8): 1226–38. 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01378>.THE.
- MICHELON, F.; NORA, D.; BORGES, C. D. “Ultrasound Pretreatment as an Alternative to Improve Essential Oils Extraction,” *Cienc. Rural* [online]. 2017, vol.47, n.9, e20170173. Epub July 31, 2017. ISSN 1678-4596. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170173>.
- MITEVA, M. A.; VIOLAS, S.; MONTES, M.; GOMEZ, D.; TUFFERY, P.; VILLOUTREIX, B. O. “FAF-Drugs: Free ADME/Tox Filtering of Compound Collections.” *Nucleic Acids Research* 34 (WEB. SERV. ISS.): 738–44. 2006. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl065>.
- MOHAMED, M. S.; MANSOUR, Y. E.; AMIN, H. K.; EL-ARABY, M. E. “Molecular Modelling Insights into a Physiologically Favourable Approach to Eicosanoid Biosynthesis Inhibition through Novel Thieno[2,3-b]Pyridine Derivatives.” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 33 (1): 755–67. 2018. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1457657>.
- MOMENIMOVAHED, Z. “Epidemiological Characteristics of and Risk Factors for Breast Cancer in the World.” *Dovepress* 11: 151–64. 2019.
- MOURIK, T. V.; BÜHL, M.; GAIGEOT, M. P. “Density Functional Theory across Chemistry, Physics and Biology.” *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 372 (2011). 2014. <https://doi.org/10.1098/rsta.2012.0488>.
- MURATA, M. “Inflammation and Cancer.” *Environ Health Prev Med.* 1 (23): 1–8. 2018.
- NASHAAT, D.; ELSABAHY, M.; EL-SHERIF, T.; HAMAD, M. A.; EL-GINDY, G. A.; IBRAHIM, E. H. “Development and *in Vivo* Evaluation of Chitosan Nanoparticles for the Oral Delivery of Albumin.” *Pharmaceutical Development and Technology* 0 (0): 1–32. 2018. <https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1479867>.
- NOSRATI, H.; SEFIDI, N.; SHARAFI, A.; DANAFAR, H.; MANJILI, H. K. “Bovine Serum

Albumin (BSA) Coated Iron Oxide Magnetic Nanoparticles as Biocompatible Carriers for Curcumin-Anticancer Drug." *Bioorganic Chemistry* 76: 501–9. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.12.033>.

NUCHUCHUA, O.; SAESOO, S.; SRAMALA, I.; PUTTIPIATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. "Physicochemical Investigation and Molecular Modeling of Cyclodextrin Complexation Mechanism with Eugenol." *Food Research International* 42 (8): 1178–85. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.006>.

OLIVEIRA, A. F.; SEIFERT, G.; HEINE, T.; DUARTE, H. A. "Density-Functional Based Tight-Binding: An Approximate DFT Method." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20 (7): 1193–1205. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000700002>.

ONOUÉ, S.; YAMADA, S.; CHAN, H. K. "Nanodrugs: Pharmacokinetics and Safety." *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 1025–37. 2014. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38378>.

OPREA, T. I. "Property Distribution of Drug-Related Chemical Databases." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 14 (3): 251–64. 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1008130001697>.

ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G. "Substrate Selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone." *J. Biol. Chem.*, no. 13: 1–28. 2016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725713>.

PAIK, S. Y. R.; NGUYEN, H. H.; RYU, J.; CHE, J. H.; KANG, T. S.; LEE, J. K.; SONG, C. W.; KO, S. "Robust Size Control of Bovine Serum Albumin (BSA) Nanoparticles by Intermittent Addition of a Desolvating Agent and the Particle Formation Mechanism." *Food Chemistry* 141 (2): 695–701. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.059>.

PILLAI, G. "Nanomedicines for Cancer Therapy : An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development." *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 1 (2): 13. 2014.

POLLONI, A. E. "Síntese de materiais poliméricos assistida por ultrassom". Dissertação - Pós-Graduação em Engenharia Química - UFSC. Florianópolis-SC, 2014.

POZZI, F.; SHIBAYAMA, N.; LEONA, M.; LOMBARDI, J. R. "TLC-SERS Study of Syrian Rue (*Peganum Harmala*) and Its Main Alkaloid Constituents." *Journal of Raman Spectroscopy* 44 (1): 102–7. 2013. <https://doi.org/10.1002/jrs.4140>.

PRIVAL, M. J.; ZEIGER, E. "Chemicals Mutagenic in *Salmonella Typhimurium* Strain TA1535 but Not in TA100." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 412 (3): 251–60. 1998. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00196-4).

RANI, K. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Spectral Analysis of BSA Nanoparticles (BSA NPs) and Egg Albumin Nanoparticles (EA NPs)." *Research Journal of Chemical Sciences* 6 (2): 29–36. 2016.

REYMOND-LARUINAZ, S.; SAVIOT, L.; POTIN, V.; LUCAS, M. C. M. "Protein–

Nanoparticle Interaction in Bioconjugated Silver Nanoparticles: A Transmission Electron Microscopy and Surface Enhanced Raman Spectroscopy Study.” *Applied Surface Science* 389: 17–24. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.07.082>.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. “Prostaglandins and Inflammation”. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31 (5): 986–1000. 2011. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.

BRANCO, R. M. “Nanopartículas Magnéticas Obtidas Por Coprecipitação Homogênea Sonoquimicamente Assistida”. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Alfenas, MG, Poços de Caldas, 2013 . 2013.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. “Cyclooxygenases: Structural and Functional Insights.” *Journal of Lipid Research April April Supp:* 29–34. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800042-JLR200>. 2009.

ROWLINSON, S. W.; KIEFER, J. R.; PRUSAKIEWICZ, J. J.; PAWLITZ, J. L.; KOZAK, K. R.; KALGUTKAR, A. S.; STALLINGS, W. C.; KURUMBAIL, R. G.; MARNETT, L. J. “A Novel Mechanism of Cyclooxygenase-2 Inhibition Involving Interactions with Ser-530 and Tyr-385.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (46): 45763–69. 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305481200>.

SAFAVI, M. S.; SHOJAOSADATI, S. A.; YANG, H. G.; KIM, Y.; PARK, E. J.; LEE, K. C.; NA, D. H. *Reducing Agent-Free Synthesis of Curcumin-Loaded Albumin Nanoparticles by Self-Assembly at Room Temperature. International Journal of Pharmaceutics.* Vol. 529. 2017. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.087>.

SALEHIABAR, M.; NOSRATI, H.; JAVANI, E. et al. “Production of Biological Nanoparticles from Bovine Serum Albumin as Controlled Release Carrier for Curcumin Delivery.” *International Journal of Biological Macromolecules* 115: 83–89. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.043>.

SAURAV, K.; ZHANG, W.; SAHA, S. et al “In Silico Molecular Docking, Preclinical Evaluation of Spiroindimicins A-D, Lynamycin A and D Isolated from Deep Marine Sea Derived Streptomyces Sp. SCSIO 03032.” *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* 6 (3): 187–96. 2014. <https://doi.org/10.1007/s12539-013-0200-y>.

SCHAUBERGER, E.; PEINHAUPT, M.; CAZARES, T.; LINDSLEY, A. W. “Lipid Mediators of Allergic Disease: Pathways, Treatments, and Emerging Therapeutic Targets.” *Curr Allergy Asthma Rep.* 16 (7): 1–48. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0628-3.Lipid>.

SEKAR, G.; HALDAR, M.; KUMAR, D. T.; DOSS, C. G. P.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. “Exploring the Interaction between Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) and Human Serum Albumin (HSA): Spectroscopic and Docking Studies.” *Journal of Molecular Liquids* 241: 793–800. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.093>.

SEKHAR, K. C.; SYED, R.; GOLLA, M.; KUMAR, M. V. J.; YELLAPU, N. K.; CHIPPADE, A. R.; CHAMARTHI, N. R. “Novel Heteroaryl Phosphonicdiamides PTPs Inhibitors as Anti-Hyperglycemic Agents.” *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* 22 (1). 2014. <https://doi.org/10.1186/s40199-014-0076-3>.

SHARMA, G. N.; DAVE, R.; SANADYA, J.; SHARMA, A. P.; SHARMA, K. K. "Various types and management of breast cancer: an overview." *J Adv Pharm Technol Res* 1 (2): 109–26. 2010.

SHEN, S. M. Method for oral drug delivery. WO03/007913 A2, issued 2003.

SILVA-SOUZA, H. A.; LIRA, M. N.; COSTA-JUNIOR, H. M.; et al. 2014. "Inhibitors of the 5-Lipoxygenase Arachidonic Acid Pathway Induce ATP Release and ATP-Dependent Organic Cation Transport in Macrophages." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838 (7): 1967–77.

SOUZA, R. A.; FERREIRA, R. S.; SANCHEZ, E. F.; RODRIGUEZ, D. S.; FERNANDEZ, N. D. "Identificação de Inibidores Das Metaloproteases de Veneno de Serpente Atroxlisina-I e Leucurolisina-a Através de Triagem Virtual, Dinâmica Molecular e Avaliação Experimental". UFMG. 2015.

http://www.pgbioinfo.icb.ufmg.br/tese_defesas_detalhes.php?aluno=71.

TAN, Y. L.; HO, H. K. "Navigating Albumin-Based Nanoparticles through Various Drug Delivery Routes." *Drug Discovery Today*. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.051>.

TAUROZZI, J. S.; HACKLEY, V. A.; WIESNER, M. R. "Ultrasonic Dispersion of Nanoparticles for Environmental, Health and Safety Assessment Issues and Recommendations." *Nanotoxicology* 5 (4): 711–29. 2011.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2010.528846>.

TAYLOR, P.; SHAO, Y.; GAN, Z.; EPIFANOVSKY, E.; et al. "Molecular Physics : An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics Advances in Molecular Quantum Chemistry Contained in the Q-Chem 4 Program Package Click for Updates." *Molecular Physics*, no. October 2014: 37–41. 2014.
<https://doi.org/10.1080/00268976.2014.952696>.

TEAGUE, S. J.; DAVIS, A. M.; LEESON, P. D.; OPREA, T. "The Design of Leadlike Combinatorial Libraries." *Angewandte Chemie - International Edition* 38 (24): 3743–48. 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991216\)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19991216)38:24<3743::AID-ANIE3743>3.0.CO;2-U).

TROTT, O.; OLSON, A. J. "Software News and Update AutoDock Vina : Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function , Efficient Optimization , and Multithreading." *Journal of Computational Chemistry* 31 (2): 455–61. 2009.
<https://doi.org/10.1002/jcc>.

VALENTI, L. E.; GIACOMELLI, C. E. "Unaffected Features of BSA Stabilized Ag Nanoparticles after Storage and Reconstitution in Biological Relevant Media." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 132: 71–77. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.002>.

VENTOLA, C. L. "Progress in Nanomedicine : Approved and Investigational Nanodrugs Progress in Nanomedicine :". *P&T* 42 (12): 742–55. 2017.

VERMA, D.; GULATI, N.; KAUL, S.; MUKHERJEE, S.; NAGAICH, U. "Protein Based Nanostructures for Drug Delivery" 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9285854>.

VIMAL, A.; PAL, D.; TRIPATHI, T.; KUMAR, A. "Eucalyptol , Sabinene and Cinnamaldehyde : Potent Inhibitors of Salmonella Target Protein L -Asparaginase." *3 Biotech* 7 (4): 1–4. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0891-6>.

VISTOLI, G.; PEDRETTI, A.; TESTA, B. "Assessing Drug-Likeness - What Are We Missing?" *Drug Discovery Today* 13 (7–8): 285–94. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.11.007>.

WANG, J.; WANG, W.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A. "Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 25 (2): 247–60. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2005.12.005>.

WILSON, B.; LAVANYA, Y.; PRIYADARSHINI, S. R. B.; RAMASAMY, M.; JENITA, J. L. "Albumin Nanoparticles for the Delivery of Gabapentin: Preparation, Characterization and Pharmacodynamic Studies." *International Journal of Pharmaceutics* 473 (1–2): 73–79. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.056>.

WILSON, B.; PALADUGU, L.; PRIYADARSHINI, S. R. B.; JENITA, J. J. L. "Development of Albumin-Based Nanoparticles for the Delivery of Abacavir." *International Journal of Biological Macromolecules* 81: 763–67. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.015>.

YADAV, R.; KUMAR, D.; KUMARI, A.; YADAV, S. K. "Encapsulation of Catechin and Epicatechin on BSA NPs Improved Their Stability and Antioxidant Potential." *EXCLI Journal* 13: 331–46. 2014.

YARIV, I.; LIPOVSKY, A.; GEDANKEN, A.; LUBART, R.; FIXLER, D. "Enhanced Pharmacological Activity of Vitamin B12 and Penicillin as Nanoparticles." *International Journal of Nanomedicine* 10 (March 2016): 3593–3601. 2015. <https://doi.org/10.2147/IJN.S82482>.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. "Selective COX-2 Inhibitors : A Review of Their Structure-Activity Relationships." *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10 (4): 655–83. 2011.

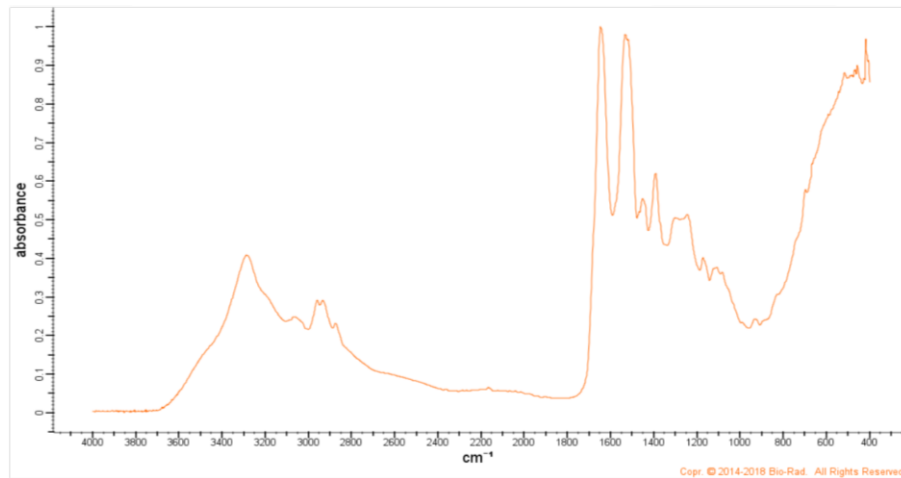
ZHANG, P.; ZHANG, E.; XIAO, M.; CHEN, C. "Enhanced Chemical and Biological Activities of a Newly Biosynthesized Eugenol Glycoconjugate , Eugenol α - D - Glucopyranoside." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (3): 1043–50. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4351-2>.

ZHAO, Y. H.; LE, J.; ABRAHAM, M. H.; HERSEY, A.; et al. "Evaluation of Human Intestinal Absorption Data and Subsequent Derivation of a Quantitative Structure \pm Activity Relationship (QSAR) with the Abraham Descriptors." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (6): 749–84. 2001. <https://doi.org/10.1002/jps.1031>.

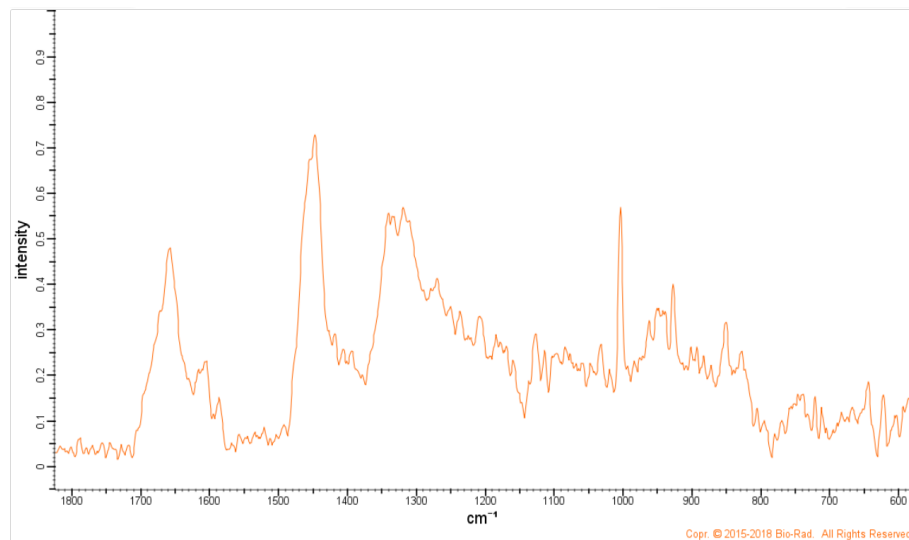
ZOETE, V.; MICHIELIN, O.; "SwissDock, a Protein-Small Molecule Docking Web Service Based on EADock DSS." *Nucleic Acids Research* 39 (Web Server): 270–77. 2011. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr366>.

APÊNDICES

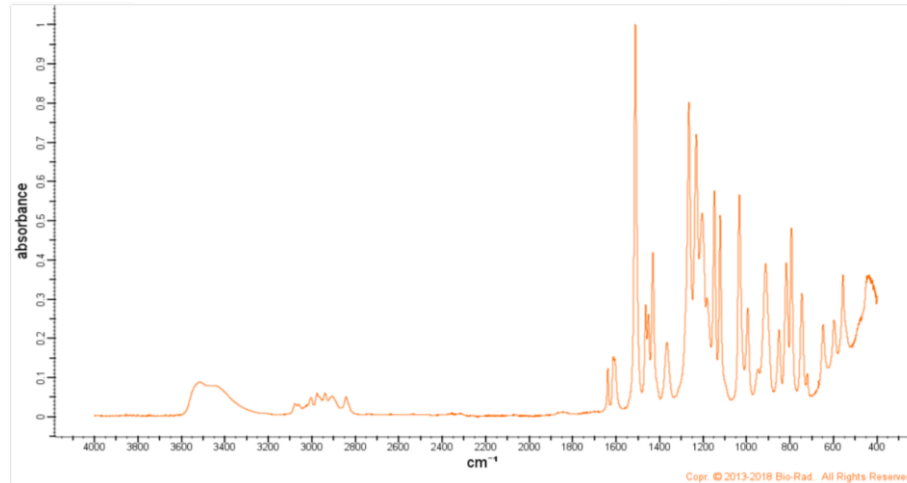
APRÊNDICE A – ESPECTROS TEÓRICOS DE FTIR E RAMAN DA ALBUMINA E DO EUGENOL



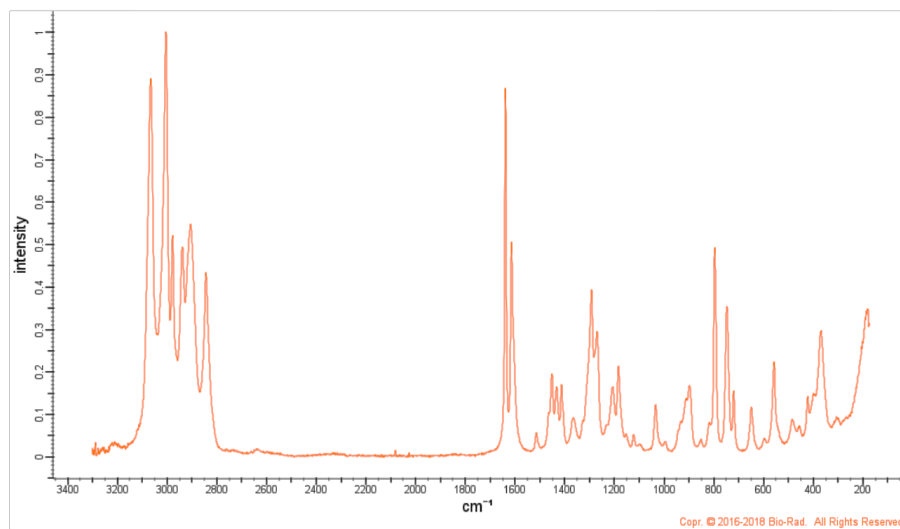
Espectro de absorção FTIR - ATR teórico da BSA.
Fonte: <https://spectrabase.com>.



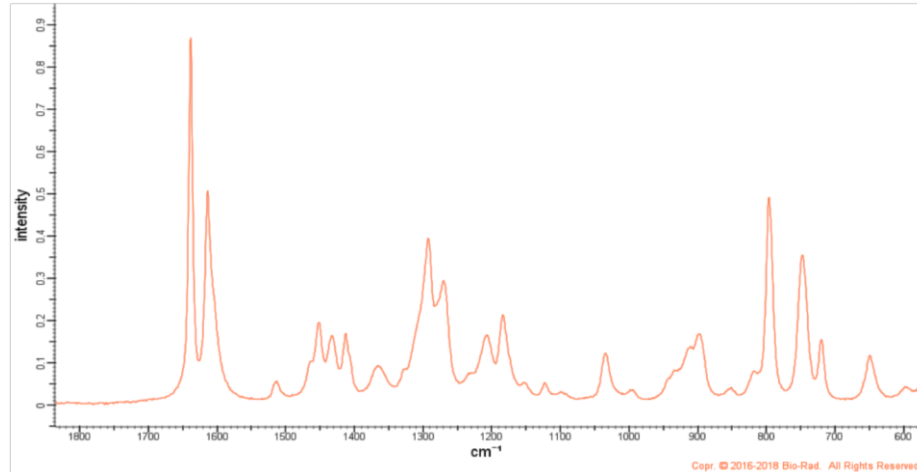
Espectro Raman teórico da BSA.
Fonte: <https://spectrabase.com>.



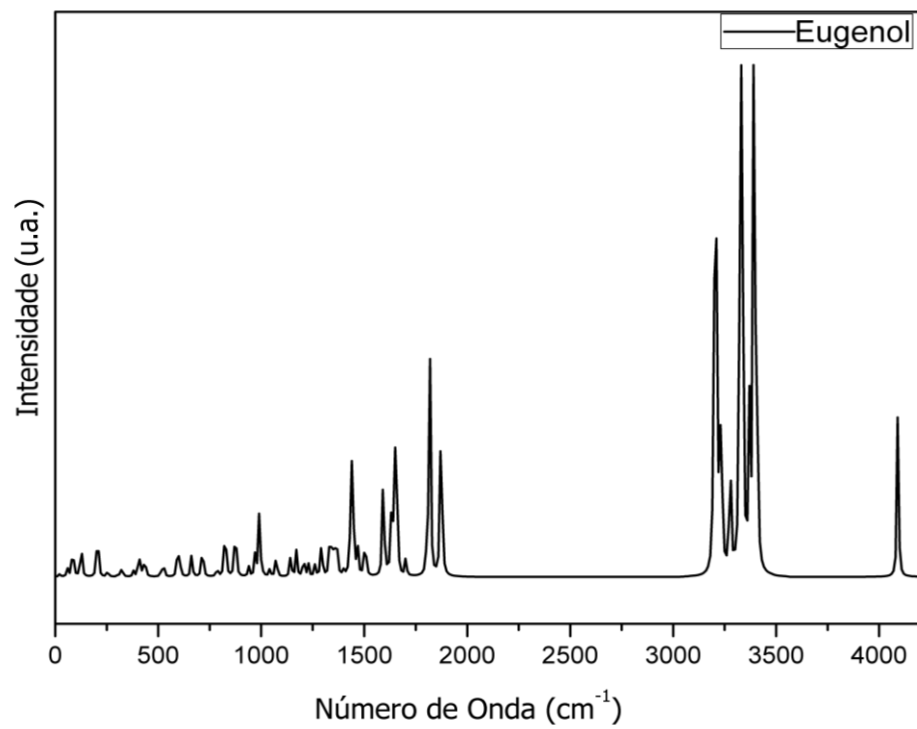
Espectro teórico de absorbância FTIR - ATR do eugenol.
Fonte: <https://spectrabase.com>.



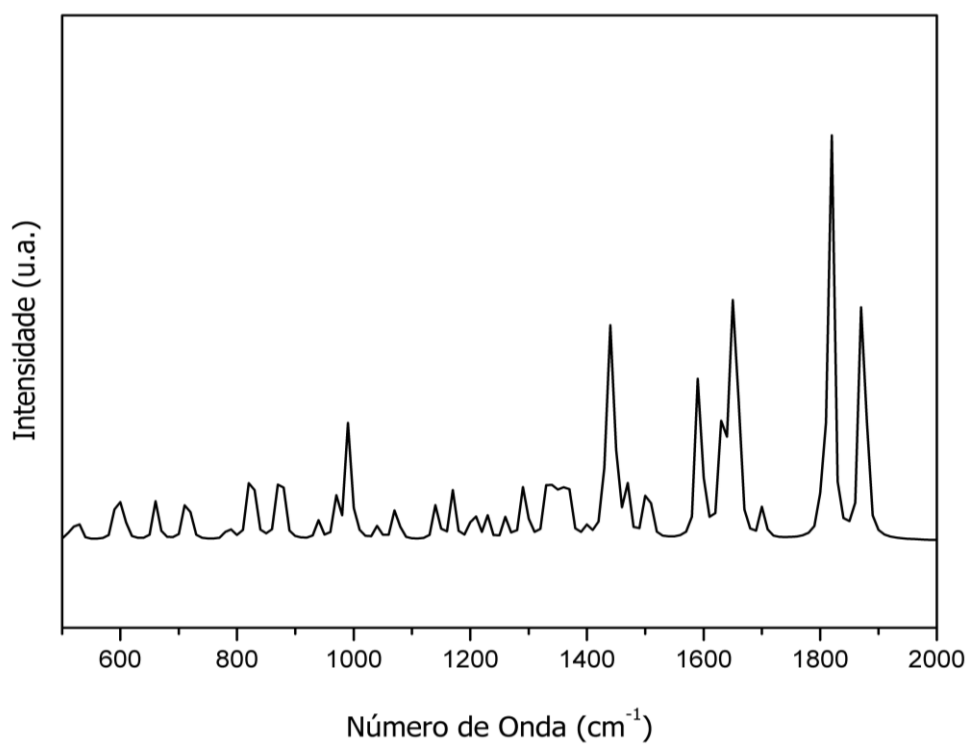
Espectro Raman teórico do eugenol.
Fonte: <https://spectrabase.com>.



Espectro Raman teórico do eugenol, corte de 600 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹.
Fonte: <https://spectrabase.com>.



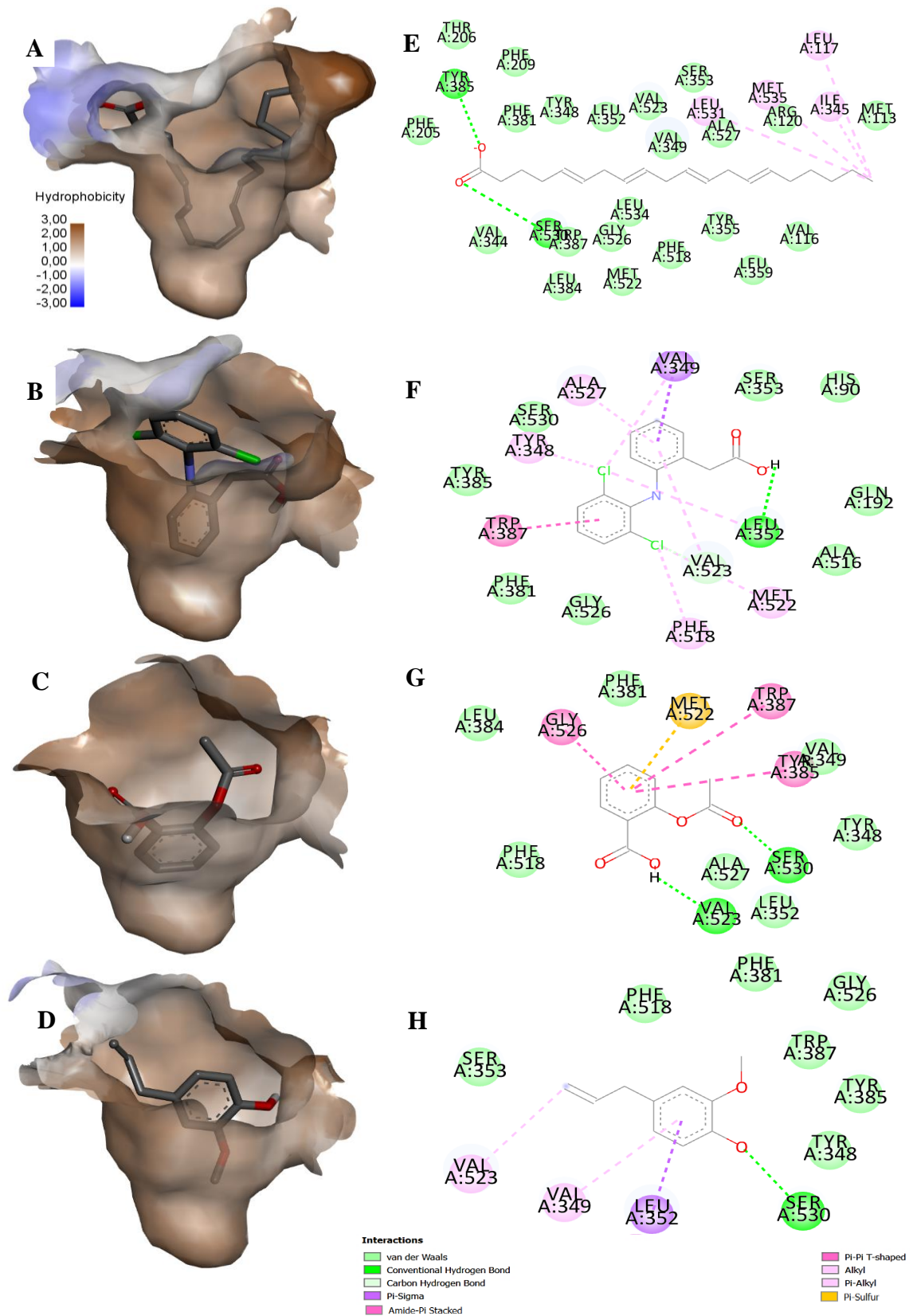
Espectro teórico de IR do eugenol obtido no Gaussian por cálculo de DFT.
Fonte: Autor



Espectro teórico de IR do eugenol obtido no Gaussian por cálculo de DFT, corte de 600 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹.

Fonte: Autor

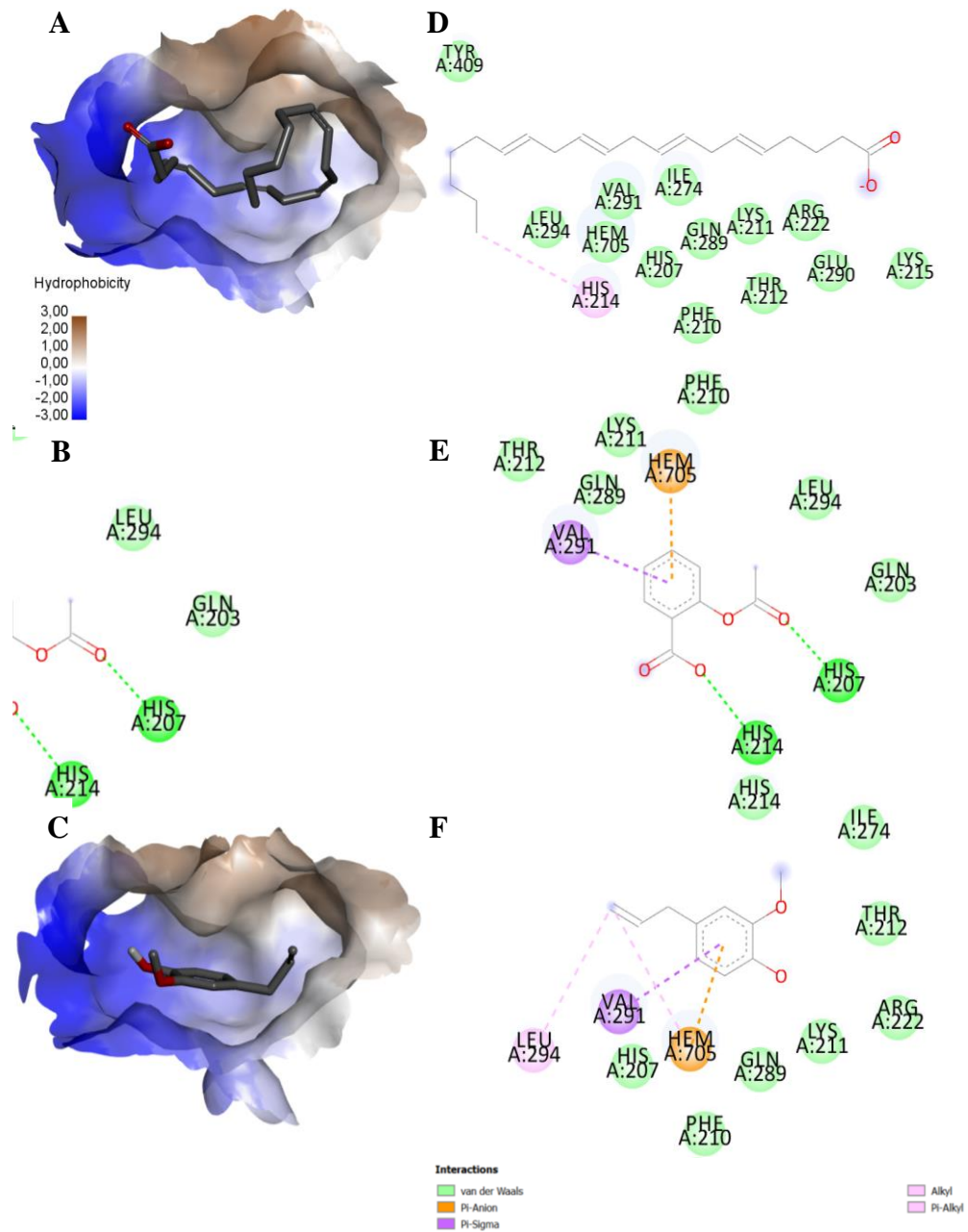
APRÊNDICE B – INTERAÇÕES NO SÍTIO ATIVO DA COX-2



Ancoragem molecular na bolsa hidrofóbica COX-2 (A)

Ácido Araquidônico; (B) diclofenaco; (C) aspirina; (D) Eugenol. Interações entre (E) ácido araquidônico; (F) diclofenaco; (G) Aspirina; (H) fragmentos de aminoácidos Eugenol e Cox-2.

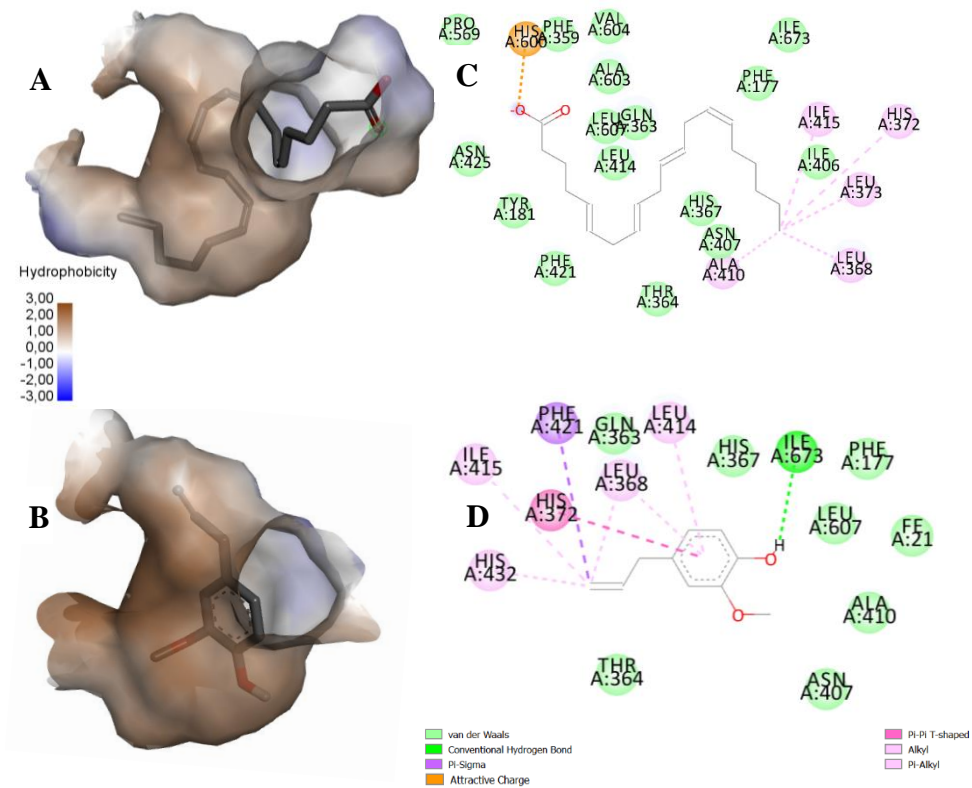
Fonte: Autor



Acoplamento Molecular na bolsa ativa de peroxidase COX-2 (A) Ácido Araquidônico; (B) aspirina; (C) eugenol. Interações entre (D) Ácido Araquidônico; (E) aspirina; (F) fragmentos de aminoácidos Eugenol e Cox-2.

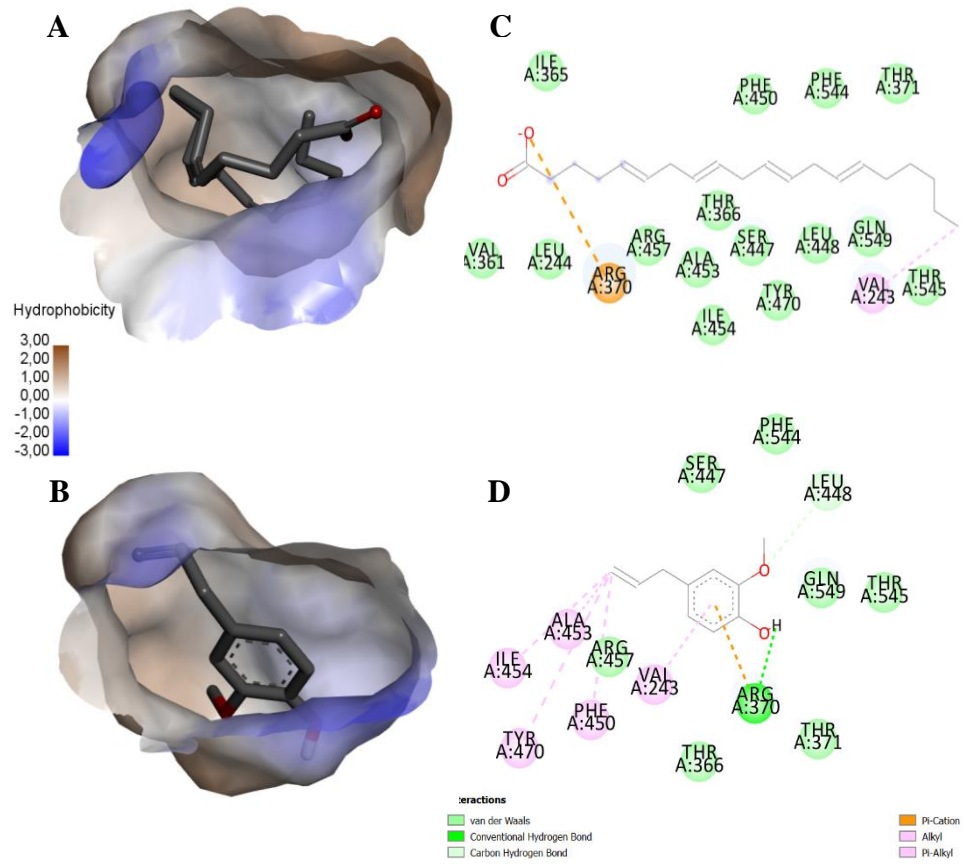
Fonte: Autor

APRÊNDICE C – INTERAÇÕES NO SÍTIO ATIVO DA 5-LOX



Ancoragem Molecular de eugenol em coordenação com a bolsa ativa catalítica não-heme Fe^{3+} His 372 da 5-LOX. A figura mostra (A) Ácido Araquidônico; (B) eugenol; e interações entre (C) ácido araquidônico; (D) Eugenol e os fragmento da bolsa ativa.

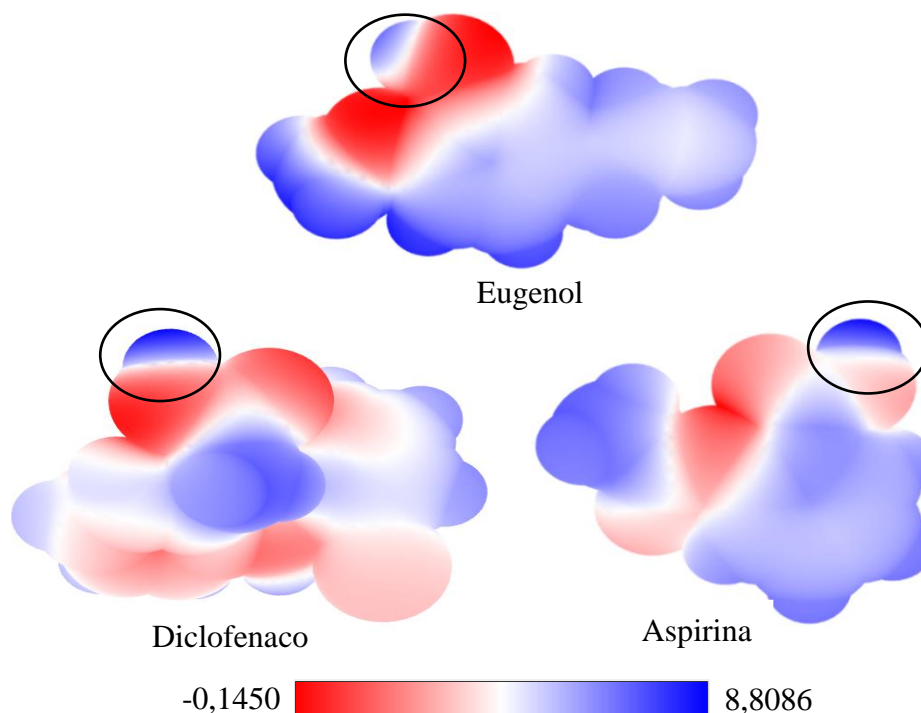
Fonte: Autor



Ancoragem Molecular de eugenol em bolsa ativa adicional de 5-LOX.
A figura mostra (A) Ácido Araquidônico; (B) eugenol; e interações entre (C) ácido araquidônico; (D) Eugenol e os fragmentos de aminoácidos da 5-LOX.

Fonte: Autor

APRÊNDICE D – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MOLÉCULAS ANALISADAS



Densidade da carga superficial das moléculas de eugenol, diclofenaco e aspirina, a figura evidencia a área superficial e respectivas cargas relativas calculadas pelo método Gasteiger, onde observa em vermelho as regiões de potencial negativo e em azul as regiões com potencial positivo.

Fonte: Autor

Propriedades Físico-químicas	Eugenol	Diclofenaco	Aspirina
Fórmula	$C_{10}H_{12}O_2$	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	$C_9H_8O_4$
Massa Molecular	164.20 g/mol	296.15 g/mol	180.16 g/mol
Nº. <i>heavy atoms</i>	12	19	13
Nº. de C aromáticos	6	12	6
Fração Csp^3	0.20	0.07	0.11
Nº. ligações rotativas	3	4	3
Nº. de aceitadores de ligação de H	2	2	4
Nº. de doadores de ligação de H	1	2	1
Refratividade Molar	49.06	77.55	44.90
TPSA	29.46 Å ²	49.33 Å ²	63.60 Å ²

Propriedades físico-químicas de comparação de compostos fornecidos pelo SwissADME. A semelhança estrutural entre as moléculas das substâncias é evidenciada especialmente entre o eugenol e a aspirina, especialmente pela comparação entre o número de ligações rotativas, o número de aceitadores da ligação H, o número de átomos pesados e a massa molecular.

Fonte: Autor

ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
 Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA DE ANDRADE– Mestrando, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 14/03/2019, cujo título denomina-se **“PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MATRIZ PROTÉICA POR PROCESSO DE DESSOLVATAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM”**, do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 27 de junho de 2019.

Prof.^ª Dr.^ª Maria Rita de Moraes Chaves Santos
 Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de FRANCISCO DAS CHAGAS PEREIRA DE ANDRADE– Mestrando, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 14/03/2019, cujo título denomina-se **“NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA CARREADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS PARA TRATAMENTO DE CÂNCER E DOENÇAS INFLAMATÓRIAS”**, do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 30 de maio de 2019.

Prof^a. Dr^a. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

