



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL**

**MICHELLI DE MEDEIROS BUENO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO DO CARVACROL E SEUS ANÁLOGOS  
SOBRE RECEPTORES DA COLECISTOCININA VISANDO A MODULAÇÃO DA  
DOR TRIGEMINAL: UM ESTUDO *IN SILICO***

**FORTALEZA**

**2024**

MICHELLI DE MEDEIROS BUENO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO DO CARVACROL E SEUS ANÁLOGOS  
SOBRE RECEPTORES DA COLECISTOCININA VISANDO A MODULAÇÃO DA  
DOR TRIGEMINAL: UM ESTUDO *IN SILICO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Translacional. Área de concentração: Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B943a Bueno, Michelli de Medeiros.  
Avaliação do potencial de ação do carvacrol e seus análogos sobre receptores da colecistocinina visando a modulação da dor trigeminal: um estudo in silico / Michelli de Medeiros Bueno. – 2024.  
80 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Wesley Lyevertton Correia Ribeiro.  
Coorientação: Prof. Dr. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo.
1. Dor crônica. 2. Manejo da dor. 3. Receptores da colecistocinina. 4. Simulação de acoplamento molecular. I. Título.

CDD 610

---

MICHELLI DE MEDEIROS BUENO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AÇÃO DO CARVACROL E SEUS ANÁLOGOS  
SOBRE RECEPTORES DA COLECISTOCININA VISANDO A MODULAÇÃO DA  
DOR TRIGEMINAL: UM ESTUDO *IN SILICO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Translacional. Área de concentração: Medicina Translacional.

Aprovada em: 21/05/2024.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Profa. Dra. Delane Viana Gondim  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Francisco Stefânio Barreto  
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

A Deus.

Ao meu esposo Davi e aos meus filhos,  
Yasmin e Théo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar o curso de mestrado, me dando saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu marido Davi e aos meus filhos Yasmin e Théo pela força, paciência e compreensão.

Ao Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro pela orientação e incentivo durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho por toda a colaboração na execução das análises *in silico*.

Ao Químico Msc. Matheus Nunes da Rocha pela fundamental importância no desenvolvimento deste estudo.

Ao meu amigo Anderson Chagas pela força, incentivo e sugestões.

Aos professores que compuseram a banca examinadora de defesa da dissertação pelas valiosas sugestões.

Aos servidores docentes e técnico-administrativos do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará por todo o apoio.

A Universidade Federal do Ceará.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”. (GEORGE BERNARD SHAW, 1930).

## RESUMO

A dor trigeminal (DT), caracterizada como dor do tipo neuropática, afeta significativamente a qualidade de vida do paciente, devido não só à sua própria condição, mas aos efeitos colaterais dos vários fármacos utilizados no seu controle. A DT apresenta diferentes etiologias e características, o que dificulta o seu tratamento, em muitos casos, resultando em apenas um alívio parcial da dor. Os produtos naturais, a exemplo do carvacrol (CV), têm se mostrado uma fonte promissora no tratamento da dor. O presente estudo objetivou executar triagem virtual da bioatividade e simulações de *docking* molecular de análogos do CV sobre receptores da colecistocinina (CCK) visando a modulação da dor trigeminal. Para tanto, inicialmente, foi realizada uma triagem virtual da bioatividade do CV e seus derivados sintéticos CV aldeído, CV Base de Schiff (BSCV) e Complexo Base de Schiff – Cobre (BSCu<sup>2+</sup>) para correspondente à combinação de até 20 conformações mais estáveis do composto de entrada e das 20 conformações mais estáveis depositados na base de dados do *European Molecular Biology Laboratory* (ChEMBL) que apresentam atividade biológica conhecida frente a *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*. Em seguida, procedeu-se estudo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME); análises de potencial de lipofilicidade molecular; análises de MPO e eficiência lipofilicidade-metabolismo (LipMetE); e predição do sítio de metabolismo e toxicidade aguda para *M. musculus* e *R. norvegicus*. Por fim, realizaram-se simulações de *docking* molecular tendo como alvos receptores de CCK<sub>1</sub> e CCK<sub>2</sub>. A avaliação virtual das estruturas revelou que os análogos sintéticos do CV têm potencial promissor para o tratamento de distúrbios periféricos e neurais, devido à sua semelhança estrutural com outros compostos que afetam os receptores CCK<sub>1</sub> e CCK<sub>2</sub> no sistema nervoso central (SNC) e periférico. Além disso, a análise ADME, com foco na MPO, indicou uma distribuição abrangente dessas substâncias pelo SNC e periférico, especialmente o BSCu<sup>2+</sup>, que demonstrou uma correlação mais favorável entre as propriedades farmacocinéticas e a segurança da atividade no SNC. No entanto, BSCV apresentou alta permeabilidade passiva e um amplo volume de distribuição no cérebro. Apesar disso, esse ligante também mostrou uma interação farmacodinâmica mais positiva com o receptor CCK<sub>2</sub>, o que o torna promissor para o tratamento da dor crônica. Com base nos dados coletados, é proposta a hipótese de que os análogos sintéticos do carvacrol, BSCu<sup>2+</sup> e BSCV, potenciais antagonistas de receptores CCK<sub>2</sub>, presente nos neurônios dos gânglios trigeminal e espinhal, podem competir com a CCK, aumentando o efeito dos opioides no manejo da dor trigeminal. Embora esta hipótese permaneça sem uma resposta definitiva, os resultados obtidos por modelagem computacional abrem novos caminhos para entender os potenciais mecanismos de ação dos análogos do carvacrol na modulação da dor trigeminal,



fornecendo *insights* para pesquisas em modelos animais, destinadas a validar a presente proposição.

**Palavras-chave:** Dor Crônica; Dor Orofacial; Manejo da Dor; Receptores da Colecistocinina; Simulação de Acoplamento Molecular.

## ABSTRACT

Trigeminal pain (TP), characterized as neuropathic pain, significantly affects the patient's quality of life due not only to its inherent condition but also to the side effects of various drugs used in its management. TP presents different etiologies and characteristics, complicating its treatment and often resulting in only partial pain relief. Natural products, such as carvacrol (CV), have shown promise in pain management. This study aimed to perform virtual screening of bioactivity and molecular docking simulations of CV analogs on cholecystokinin (CCK) receptors, targeting the modulation of trigeminal pain. Initially, a virtual screening of the bioactivity of CV and its synthetic derivatives, CV aldehyde, CV Schiff base (BSCV), and Schiff base-Copper Complex (BSCu<sup>2+</sup>), was conducted. This screening corresponded to the combination of up to 20 of the most stable conformations of the input compound and the 20 most stable conformations deposited in the European Molecular Biology Laboratory (ChEMBL) database, which exhibit known biological activity against *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. Subsequently, an absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) study was carried out, including analyses of molecular lipophilicity potential, MPO and lipophilicity-metabolism efficiency (LipMetE) analyses, and prediction of the site of metabolism and acute toxicity for *M. musculus* and *R. norvegicus*. Finally, molecular docking simulations were performed targeting CCK<sub>1</sub> and CCK<sub>2</sub> receptors. The virtual evaluation of the structures revealed that synthetic CV analogs have promising potential for treating peripheral and neural disorders due to their structural similarity to other compounds affecting CCK<sub>1</sub> and CCK<sub>2</sub> receptors in the central (CNS) and peripheral nervous systems. Additionally, the ADME analysis, focusing on MPO, indicated a comprehensive distribution of these substances throughout the CNS and peripheral nervous systems, particularly BSCu<sup>2+</sup>, which showed a more favorable correlation between pharmacokinetic properties and CNS activity safety. However, BSCV exhibited high passive permeability and a broad volume of distribution in the brain. Despite this, this ligand also demonstrated more positive pharmacodynamic interaction with the CCK<sub>2</sub> receptor, making it promising for chronic pain treatment. Based on the collected data, it is hypothesized that synthetic carvacrol analogs, BSCu<sup>2+</sup> and BSCV, as potential CCK<sub>2</sub> receptor antagonists present in the neurons of trigeminal and spinal ganglia, can compete with CCK, enhancing the effect of opioids in trigeminal pain management. Although this hypothesis remains unresolved, the results obtained through computational modeling open new avenues

for understanding the potential mechanisms of action of carvacrol analogs in modulating trigeminal pain, providing insights for research in animal models aimed at validating this proposition.

**Keywords:** Chronic Pain; Facial Pain; Pain Management; Cholecystinin Receptors; Molecular docking simulations.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Subdivisão anatômica do nervo trigêmeo.....	23
Figura 2	– Via da dor trigeminal.....	26
Figura 3	– Fórmula química estrutural do carvacrol.....	32
Figura 4	– Reação de síntese de Carvacrol Aldeído (2-Hidroxi-3-metil-6-(propan-2-il)benzaldeído), Base de Schiff Derivada do Carvacrol e do complexo Base de Cu(II)–Schiff.....	34
Figura 5	– Distribuição relativa das classes de alvos de interação biológica dos ligantes <b>a</b> CV aldeído, <b>b</b> BSCV and <b>c</b> BSCu <sup>2+</sup> , para o organismo <i>Mus musculus</i> .....	44
Figura 6	– Distribuição relativa das classes de alvos de interação biológica dos ligantes <b>a</b> CV aldeído, <b>b</b> BSCV and <b>c</b> BSCu <sup>2+</sup> , para o organismo <i>Rattus norvegicus</i> .....	44
Figura 7	– Teste de similaridade 3D com compostos da base de dados da ChEMBL que se ligam aos receptores CCK <sub>1</sub> and CCK <sub>2</sub> .....	45
Figura 8	– Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) com valores calculados de pKa, logP and logD at pH 7.4 para os ligantes <b>a</b> CV, <b>b</b> CV aldeído, <b>c</b> BSCV and <b>d</b> BSCu <sup>2+</sup> .....	46
Figura 9	– Gráfico de distribuição de carga em função da variação do pH dos derivados do carvacrol.....	47
Figura 10	– Lipofilicidade dependente de pH (logD) chart calculado para os derivados do carvacrol.....	48
Figura 11	– <b>a</b> Radar de <i>desirability</i> previsto por MPO e <b>b</b> alinhamento entre lipofilicidade (logP) e polaridade (TPSA) para estimativa da <i>desirability</i> no SNC.....	49
Figura 12	– Alinhamento entre MM e logD em pH 7.4 para previsão do alinhamento entre permeabilidade e estabilidade metabólica dos derivados de CV.....	51
Figura 13	– Local de predição do metabolismo para o <b>a</b> carvacrol, e seus análogos, <b>b</b> CV aldeído, <b>c</b> BSCV e <b>d</b> BSCu <sup>2+</sup> .....	53
Figura 14	– Comparação entre valores de LD <sub>50</sub> em <i>Rattus norvegicus</i> previstos para carvacrol (CV), e seus análogos CV aldeído, BSCV e BSCu <sup>2+</sup> , em diferentes vias de administração: oral, intraperitoneal (IP) e intravenoso (IV).....	54

Figura 15 – Visualização tridimensional do encaixe do <b>a</b> antagonista devazepida e do <b>b</b> peptídeo agonista NN9056 moduladores do sítio alostérico do receptor CCK <sub>1</sub> .....	56
Figura 16 – Visualização tridimensional das interações dos ligantes <b>a</b> CV, <b>b</b> CV aldeído (verde), BSCV (laranja) e BSCu <sup>2+</sup> (roxo).....	57
Figura 17 – Gráfico de energia de afinidade dos ligantes ao fim das simulações de <i>docking</i> molecular frente ao receptor CCK <sub>1</sub> . As barras em vermelho indicam os ligantes controle e as barras em preto são os análogos do carvacrol (CV)...	58
Figura 18 – Visualização tridimensional –€ <sup>3i</sup> das interações do <b>a</b> agonista Gastrina e dos ligantes <b>b</b> CV (cinza), CV aldeído (verde), BSCV (laranja) e (c) BSCu <sup>2+</sup> (roxo).....	59
Figura 19 – Gráfico de energia de afinidade dos ligantes ao fim das simulações de <i>docking</i> molecular frente ao receptor CCK <sub>2</sub> . As barras em vermelho indicam os ligantes controles e as barras em preto são os análogos do carvacrol (CV).....	60
Figura 20 – Detalhes das interações em comum do ligante BSCV com o agonista Gastrina e perfil hidropático dos resíduos de aminoácido Tyr189 e Asn353.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Propriedades físico-químicas dos derivados do CV aplicados ao sistema de classificação de MPO da Pfizer, Inc.....	50
Tabela 2	– Descritores farmacocinéticos e metabolismo por isoformas de CYP450, previstos por teste consensual de ADME e toxicidade entre as bases de dados <sup>a</sup> ADMETlab, <sup>b</sup> ADMETboost, <sup>c</sup> pkCSM, <sup>d</sup> ProTox-II e <sup>e</sup> GUSAR Online.....	52
Tabela 3	– Detalhes das interações entre os análogos de CV e os receptores CCK <sub>1</sub> e CCK <sub>2</sub> a partir de simulações de <i>docking</i> molecular.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Três dimensões
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATM	Articulação temporomandibular
BBB	Barreira hematoencefálica
BSCu <sup>2+</sup>	Carvacrol Base de Shiffer com adição de Cobre
BSCV	Carvacrol Base de Shiffer
CCE	Câncer de células escamosas
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CCK	Colecistocinina
CCK-8	Octapeptídeo de colecistocinina
CCK <sub>1</sub>	Receptor de colecistoquinina subtipos 1
CCK <sub>2</sub>	Receptor de colecistoquinina subtipos 2
ChEMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
CLintu	Taxa de depuração
CV	Carvacrol
CV aldeído	Carvacrol aldeído
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população de uma amostra
DL50 Oral	Dose letal oral para 50% da população de uma amostra
DL50 IPe	Dose letal intraperitoneal para 50% da população de uma amostra
DL50 IVe	Dose letal endovenosa para 50% da população de uma amostra
DRG	Gânglio da raiz dorsal
DT	Dor trigeminal
DTM	Disfunção Temporomandibular
Glu	Ácido glutâmico
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G.
His	Histidina
HBD	Grupo doadores de ligação de hidrogênio
IASP	Associação internacional para os estudos da dor

IP	Intraperitoneal
IUPAC	<i>Applied Chemistry and International Union of Pure</i>
IV	Intravenoso
LipMetE	Eficiência lipofilicidade metabolismo
Leu	Leucina
Log BB	Logaritmo da permeabilidade na barreira hematoencefálica
Log P	Coefficiente de participação
Log D	Coefficiente de distribuição
MDCK	Células renais caninas Madin-Darby
Met	Metionina
MLP	Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular
MM	Massa molecular
MPO	Algoritmo de otimização multiparamétrica
NAV	Canais de sódio voltagem dependentes
NFG	Fator de crescimento nervoso
NO	Óxido Nítrico
Papp,A→Ba	Permeabilidade passiva
P-gp effluxb	Substrato de glicoproteína G
P-gp	Substrato de glicoproteína -P
Phe	Fenilalanino
Pka	Constante de acidez
RMSD	Raiz quadrada do desvio quadrático médio
Sp5c	Região do subnúcleo caudal do trigêmeo
SMILES	<i>Simplified molecular-input line-entry system</i>
SNC	Sistema nervoso central
Thr	Treonina
TNF- $\alpha$	Fatores de necrose tumoral alfa
Trp	Triptofano
TSPA	Área de superfície topológica
Tyr	Tirosina
VD	Volume de distribuição
V1	Ramo oftálmico do nervo trigêmeo
V2	Ramo maxilar do nervo trigêmeo



V3           Ramo mandibular do nervo trigêmeo  
VO           Via oral

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
©	Copyright
kcal/mol	Quilocaloria por molar
F%	Fração de biodisponibilidade
g	Gramas
g/mol	Gramas por molar
®	Marca registrada
mg/kg	Miligramas por quilograma
mmol/kg	Milimolar por quilograma
g/mol	Gramas por molar

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Organização básica do sistema trigêmeo.....	23
2.2	Dor trigeminal.....	24
2.2.1	<i>Sinalização da dor trigeminal.....</i>	26
2.2.2	<i>Tratamento da dor trigeminal.....</i>	27
2.2.3	<i>Receptores CCK<sub>1</sub> e CCK<sub>2</sub> no nervo trigêmeo .....</i>	29
2.3	Produtos naturais.....	31
2.4	Estudos in silico.....	35
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	Objetivo Geral.....	38
3.2	Objetivos Específicos.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	Triagem virtual da bioatividade.....	39
4.2	Estudo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) .....	39
4.2.1	<i>Análises de potencial de lipofilicidade molecular.....</i>	39
4.2.2	<i>Análises de MPO e eficiência lipofilicidade-metabolismo (LipMetE) .....</i>	40
4.2.3	<i>Predição do sítio de metabolismo e toxicidade aguda.....</i>	41
4.3	Simulações de <i>docking</i> molecular.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	Triagem virtual de bioatividade.....	43
5.2	Estudo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) .....	45
5.2.1	<i>Análises de potencial de lipofilicidade molecular (MLP) .....</i>	45
5.2.2	<i>Análises de MPO e LipMetE.....</i>	48
5.2.3	<i>Predição do sítio de metabolismo e toxicidade aguda.....</i>	52
5.3	Simulações de <i>docking</i> molecular.....	55
5.3.1	<i>Modulação do receptor CCK<sub>1</sub>.....</i>	55
5.3.2	<i>Modulação do receptor CCK<sub>2</sub>.....</i>	58
6	CONCLUSÃO.....	64
	REFERÊNCIAS .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

A dor trigeminal na região da cabeça e pescoço é decorrente de doenças ou anormalidades em tecidos moles ou mineralizados da cavidade bucal e da face. As dores que acometem a face podem estar relacionadas a diversas patologias como: disfunção temporomandibular (DTM), neuralgia do trigêmeo, síndrome da ardência bucal, odontalgias, doença periodontal, infecções buco-dentais e câncer (Siqueira, 2006).

Segundo Williams *et al.* (1995), o nervo trigêmeo, é o mais afetado em relação a dor orofacial. A via trigeminal conduz as informações dolorosas provenientes da região orofacial através de impulsos aferentes desencadeados pela despolarização de fibras nervosas periféricas trigeminais, onde os neurônios denominados pseudounipolares, cujo corpo celular se localiza no gânglio trigeminal, realizam sua primeira sinapse no tronco encefálico, na região do subnúcleo caudal do trigêmeo (Goellner; Rocha, 2020).

A dor neuropática orofacial pode alterar as funções estomatognáticas e, uma vez comprometida uma ou mais funções, ocorre a falta de equilíbrio no sistema, o que pode ser traduzido na limitação da motricidade orofacial de funções como mastigação, deglutição e fala (Rao *et al.*, 2016). Com isso, o paciente pode desenvolver quadros de caquexia, baixa interação social, ansiedade e depressão, reduzindo a sua qualidade de vida, mesmo em quadro de dor leve ou moderada (Ye *et al.*, 2011; Epstein; Miaskowski, 2019). Em caso de pacientes oncológicos, a dor é um fator que merece atenção por estar presente em 75 a 90% dos casos no estágio terminal (Guerrero *et al.*, 2008).

As estruturas anátomo-funcionais da face sofrem alterações diante de patologias como tumores localizados na cavidade bucal, sejam na maxila, mandíbula, bochecha, orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, as quais provavelmente aumentarão o risco de o paciente desenvolver dor neuropática, seja por conta do estágio do tumor ou do tratamento realizado para controle ou cura da doença (Leoncini *et al.*, 2014).

Estudos demonstram que no câncer de células escamosas (CCE) oral, por exemplo, o índice de resistência a opioides e a prevalência de dor são maiores quando comparados aos outros cânceres como o de mama e pâncreas, o que torna a eficácia dos cuidados paliativos ainda mais prejudicada, podendo levar, inclusive, à caquexia (Connelly; Schmidt, 2004; Scheff *et al.*, 2017; Ye *et al.*, 2011).

Os opioides podem reduzir a dor durante o uso de curto prazo para o tratamento da dor neuropática crônica; no entanto, as evidências clínicas são insuficientes para determinar se

o alívio da dor é significativo e se a terapia com opioides a longo prazo melhora a função ou a qualidade de vida dos pacientes (Dowell; Haegerich; Chou, 2016).

Uma conexão entre dor neuropática e receptores da colecistocinina (CCK) tem sido estudada por pesquisadores, com o objetivo de descobrir novos alvos terapêuticos que possam desempenhar um importante papel na modulação da dor. A colecistocinina é um neuropeptídeo que, além de suas funções digestivas, atua no sistema nervoso central e periférico influenciando processos de dor (Yang *et al.*, 2018).

Os receptores da colecistocinina (CCK), CCK<sub>1</sub>-R e CCK<sub>2</sub>-R, são importantes receptores hormonais peptídicos neuro intestinais e desempenham um papel vital na ingestão alimentar e na regulação do apetite (Zhang *et al.*, 2021). Foi demonstrado que os receptores CCK<sub>2</sub> são expressos em uma percentagem substancial em neurônios ganglionares da raiz dorsal em todos os níveis da coluna vertebral, e que a CCK pode antagonizar a analgesia promovida por opioides ao nível do próprio neurônio aferente primário (Ghilardi *et al.*, 1992). Isso porque a CCK pode neutralizar o efeito da ativação do receptor opioide no influxo e captação de Ca<sup>2+</sup> (Wang *et al.*, 1989, Wang; Ren; Han, 1992, Wang; Han, 1990). Se tal interação ocorrer em células que possuem receptores opioides e CCK, o resultado é uma diminuição do efeito induzido pelos opioides. Isto é apoiado pela distribuição semelhante de receptores opioides e CCK em várias áreas do Sistema Nervoso Central (SNC) importantes para a analgesia com opioides (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1999).

Em um estudo conduzido por Yang *et al.* (2018), foi observado que a ativação do receptor de CCK<sub>2</sub> pelo octapeptídeo de colecistocinina (CCK-8) tem o efeito de inibir a analgesia causada por opioides. O uso prolongado de opioides resulta em um aumento nos níveis de CCK-8, o que intensifica sua oposição à analgesia provocada por opioides. Além disso, foi constatado que os peptídeos CCK e opioides compartilham vias neurais semelhantes em todo o SNC, desde a medula espinhal, onde desempenham um papel na percepção da dor, até regiões do sistema límbico, como o hipocampo e o córtex pré-frontal, onde influenciam processos como ansiedade, depressão, aprendizagem e memória. As evidências sugerem que tanto a CCK quanto os peptídeos opioides atuam antagonicamente para modular tanto a sensação de dor e emoção quanto funções cognitivas e motoras. Assim, a hipótese de que um antagonista de CCK pode ter influência para uma melhor ação farmacológica de opioides no tratamento da dor trigeminal se torna factível.

A utilização de plantas com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, por apresentarem uma rica variedade estrutural e extensa propriedade farmacológica. Aproximadamente 80% da população utiliza medicamentos à base

de produtos naturais para o alívio de alguma sintomatologia desagradável. Atualmente cerca de 40% de todos os fármacos da medicina moderna apresentam em sua composição produtos naturais, seja de uma forma direta ou indireta (Guerra; Norradi, 2003). O carvacrol, um monoterpene oriundo do metabolismo secundário de alguns vegetais, possui importantes propriedades anti-hipernociceptivas e anti-inflamatória (Guimarães *et al.*, 2012). A inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e da inibição da liberação de óxido nítrico (NO) parece ser um evento chave para a qualificação da atividade anti-inflamatória do carvacrol, assim, o composto é um candidato em pesquisas que visam o tratamento de condições dolorosas associadas à inflamação (Guimarães *et al.*, 2010, 2012). Em relação a sua atividade analgésica, o carvacrol bloqueia reversivelmente a excitabilidade e a condução nervosa em neurônios periféricos de maneira dependente da concentração. O bloqueio da excitabilidade neuronal induzido pelo monoterpene ocorre sem alterar o potencial de repouso e/ou a resistência de entrada. Assim, esse efeito é o resultado da inibição direta da corrente de sódio dependente de voltagem, o que sugere sua atuação como anestésico local (Joca *et al.*, 2012).

Mesmo com essas evidências, não foi verificado na literatura nenhum estudo sobre o mecanismo de ação do carvacrol sobre receptores CCK. Ademais, sabe-se que a produção de compostos derivados de substâncias naturais, à exemplo do carvacrol, pode oferecer perspectivas promissoras para o desenvolvimento de novos tratamentos contra doenças humanas, ao modificar suas propriedades físico-químicas e toxicológicas (Suntres; Coccimiglio; Alipour, 2015; Sykuła *et al.*, 2023). Assim, o objetivo principal do presente estudo foi executar uma triagem virtual da bioatividade e simulações de *docking* molecular de análogos do carvacrol sobre receptores da colecistocinina visando modulação da dor trigeminal.

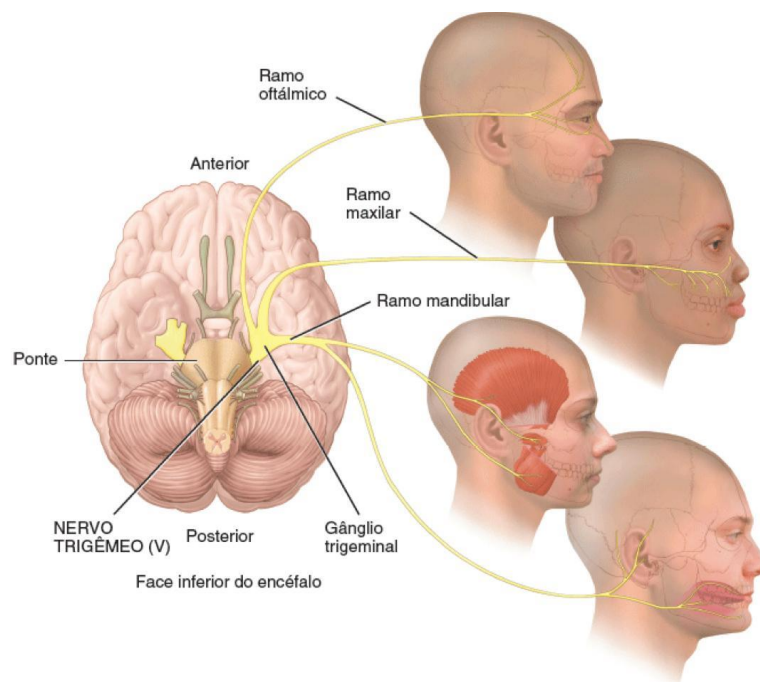
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Organização básica do sistema trigêmeo

O nervo trigêmeo, classificado como um nervo misto, é o quinto par dos doze nervos cranianos e desempenha um papel crucial na transmissão de sinais sensoriais e motores de estruturas faciais, contribuindo significativamente em funções diárias, incluindo a transmissão de estímulos dolorosos, percepção tátil facial e mastigação (Libreros-Jiménez *et al.*, 2013).

As fibras do trigêmeo fornecem inervação sensorial geral às estruturas da cabeça, exceto as regiões occipital e retroauricular, que recebem inervação de ramos do plexo cervical e do nervo facial (VII nervo craniano) (Rivera, 2011). Os neurônios sensitivos formam os três ramos ou divisões do nervo trigêmeo: oftálmico (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3) (Figura 1). Os corpos celulares desse nervo estão localizados nos gânglios do trigêmeo e fazem conexões com neurônios de segunda ordem no complexo nuclear sensorial do tronco encéfalo do trigêmeo. As projeções ascendentes, através do trato trigeminotalâmico, transmitem informações ao tálamo e outras regiões do cérebro responsáveis pela interpretação das informações sensoriais (Gambeta; Chichorro; Zamponi, 2020).

Figura 1 – Subdivisão anatômica do nervo trigêmeo



Fonte: Adaptado de Tortora; Derrickson (2016).

O gânglio trigeminal contém corpos celulares dos neurônios sensitivos cujos ramos internos passam para a ponte. Esses ramos internos formam a raiz sensorial do trigêmeo, que é análoga à raiz posterior de um nervo espinhal. A raiz entra na porção lateral do terço médio da ponte. Os ramos se bifurcam em braços ascendentes e descendentes ou sobem ou descem sem se bifurcar. Os processos centrais estão distribuídos em três núcleos sensoriais. Começando com o mais inferior ou mais caudal, são eles: o bulbo, o núcleo sensorial principal e o núcleo mesencefálico (Walker, 1990; Luna *et al.*, 2010).

Os núcleos sensoriais do trigêmeo no tronco cerebral servem como pontos finais para as fibras sensoriais responsáveis pela dor, temperatura, toque, pressão, vibração e propriocepção na pele de um lado da face e da cabeça, estendendo-se do vértice para frente. Essas fibras também inervam a conjuntiva, o globo ocular, parte da membrana timpânica externa, a mucosa dos dois terços anteriores da língua, o palato, as cavidades nasais, os seios paranasais, as meninges acima do tentório (supratentorial) e as arcadas dentárias superior e inferior (Rivera, 2011).

## 2.2 Dor trigeminal

A *International Association for the Study of Pain* (IASP) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial ao tecido”. Segundo a IASP, a dor pode ser categorizada a depender do seu mecanismo em dor nociceptiva, dor neuropática (subcategorizada em central ou periférica) e dor nociplástica (International Association for the Study of Pain, 2020).

A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de receptores ou da via dolorosa, e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares. A dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso central ou periférico, sendo mais bem compreendida como resultado da ativação anormal da via nociceptiva (Schestatsky; Nascimento, 2009). A dor neuropática é iniciada ou causada por uma lesão ou disfunção primária no sistema nervoso resultante de trauma, infecção, isquemia, câncer ou outras causas, como quimioterapia (Fornasari, 2012). A dor nociplástica surge da nocicepção alterada, apesar de não haver evidências claras de dano tecidual real ou ameaçador que cause a ativação de nociceptores periféricos ou evidências de doença ou lesão do sistema somatossensorial que causa a dor (International Association for the Study of Pain, 2017).

Na região de cabeça e pescoço, a dor neuropática pode advir de diversas formas de distúrbios, tais como distúrbio da articulação temporomandibular (ATM), câncer, neuropatias,



ou pode ser devido à doença otorrinolaringológica (Romero-Reyes; Salvemini, 2009, Šklebar *et al.*, 2015). Essa condição pode comprometer substancialmente a funcionalidade e a qualidade de vida de pacientes, a exemplo daquelas relacionadas aos cânceres na região (Vilarim *et al.*, 2022).

A dor neuropática se manifesta com sintomas e sinais sensoriais (Badel *et al.*, 2019). Por exemplo, a neuralgia do trigêmeo, tipo de dor neuropática mais comum na face, é caracterizada por episódios breves e paroxísticos de dor facial intensa, localizada em qualquer um dos ramos do nervo craniano V (Bendtsen *et al.*, 2020).

Na dor complexa ou mista, quando há associação da dor nociceptiva e neuropática, é comum em pacientes oncológicos, por exemplo, cujos tumores em evolução na região oral provoca inflamação e compressão das estruturas adjacentes. Nesses casos, o tratamento e diagnóstico são complexos (Thomaz, 2010). Em todo caso, no diagnóstico definitivo da dor orofacial, muitas vezes é necessário estabelecer uma lista de possíveis diagnósticos diferenciais e, em seguida, excluir sistematicamente cada um por meio de um processo de eliminação através da história do paciente, exame clínico, testes diagnósticos e investigações (Grossmann; Siqueira; Siqueira, 2016).

Em relação aos cânceres orofaciais, as causas da dor podem ser múltiplas e se potencializarem, podendo ou não estar diretamente relacionadas à doença de fundo. Fatores como o tipo e a origem neoplásica, localização, estadiamento e tratamento realizado podem influenciar no curso da dor (Thomaz, 2010; Instituto Nacional de Câncer, 2022).

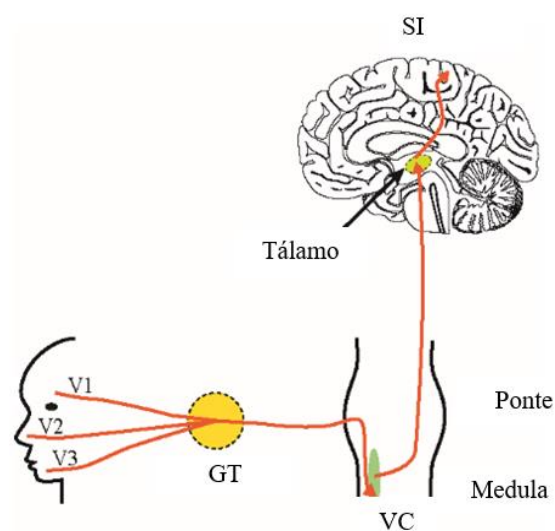
A dor do câncer orofacial se manifesta, inicialmente, como um componente somático gerado pela invasão nos tecidos subjacentes e liberação de proteases, as quais irão destruir a matriz adjacente, além de fatores neurotróficos, como o Fator de Crescimento Nervoso (NGF), que são responsáveis pelos mecanismos da proliferação e invasão tumoral, e da sintomatologia dolorosa (Schmidt, 2014). A progressão da doença poderá ser acompanhada por invasão de regiões perineurais e compressão nervosa, o que poderá contribuir para a formação de edema, fragmentação, granulação, degeneração Walleriana, redução do calibre do nervo e para o estabelecimento de dor neuropática (Taniguchi *et al.*, 1995).

É válido pontuar que a dor, em casos de carcinoma de células escamosas (CCE), tipo responsável por 90% dos casos de cânceres de cabeça e pescoço, por exemplo, constitui-se como a pior sintomatologia associada à doença (Scheff *et al.*, 2017).

### 2.2.1 Sinalização da dor trigeminal

A sinalização de dor na região orofacial, transportada pela via trigeminal até o córtex sensorial, foi descrita por Sir Charles Sherrington, no final do século XIX e início do século XX (Bista; Imlach, 2019). Os autores afirmaram que estímulos como toque, calor ou frio, podem ativar nociceptores mecânicos e/ou térmicos, que são as terminações nervosas livres dos aferentes sensoriais do trigêmeo. Essas fibras nervosas sensoriais são fibras A $\delta$  mielinizadas e fibras C não mielinizadas, cujos corpos celulares ficam no gânglio trigeminal. Os sinais são transmitidos através dessas fibras aferentes para o núcleo espinal caudal do trigêmeo (Sp5C) no tronco encefálico, onde fazem sinapse com neurônios de segunda ordem que se projetam para os córtices somatossensorial e límbico através do tálamo (Figura 2).

Figura 2 - Via da dor trigeminal. A sensação de dor na face e na boca é transmitida por três ramos nervosos periféricos (V1 – ramo oftálmico, V2 - ramo maxilar e V3 – ramo mandibular do nervo trigêmeo) do nervo trigêmeo, cujos corpos celulares ficam no gânglio trigêmeo (GT) e se projetam centralmente para fazer sinapse com os neurônios de segunda ordem no núcleo espinal caudal do trigêmeo (p5c). Os neurônios de segunda ordem então ascendem para terminar no tálamo. Do tálamo, a informação nociceptiva é projetada para o córtex somatossensorial primário (SI), onde ocorre o processamento da dor.



Fonte: Adaptado de Bista; Imlach (2019).

Ao longo desta via ascendente, a informação é modulada pelas vias moduladoras de dor locais e descendentes que inibem ou facilitam a informação sensorial transmitida (Okada *et al.*, 2019). As entradas descendentes para o VC surgem do córtex somatossensorial primário (SI), do córtex somatossensorial secundário (SII), da ínsula e da medula ventromedial rostral (Chai *et al.*, 2012).

A transmissão de informações sensoriais da periferia para o SNC requer atividade coordenada de muitos canais iônicos e receptores que permitem a transdução de sinais, geração de potencial de ação e liberação de neurotransmissores na sinapse. A disfunção dos canais iônicos em todos os níveis de transmissão pode resultar em alterações de sinalização, que podem contribuir para a ocorrência da dor neuropática (Bista; Imlach, 2019). A expressão e a atividade de canais iônicos nas vias da dor se alteram durante o desenvolvimento da dor neuropática do trigêmeo. Em condições patológicas de dor, as sinapses dos neurônios glutamatérgicos excitatórios são fortalecidas, aumentando a excitabilidade dos neurônios nociceptivos, facilitando a transmissão nociceptiva para regiões superiores do cérebro (Gangadharan; Kuner, 2013). Possuem atuação neste sistema os canais de potássio, canais de cátions não seletivos, canais de sódio, canais de cálcio e canais receptores de potencial transitório (Bista; Imlach, 2019).

Em relação aos canais de sódio, a sua superexpressão no neurônio sensitivo está associado a um aumento na excitabilidade neuronal (Tanaka *et al.*, 2016). Eriksson *et al.* (2005) demonstraram que canais de sódio voltagem-dependente, envolvidos na geração de potencial de ação, como Nav1.6, estão associados a mutações de ganho de função que causam dor neuropática trigeminal em pacientes. Exemplos de medicamentos que tem como alvo os canais de sódio são usados para tratar a dor trigeminal são a carbamazepina e seu derivado oxcarbazepina (Al-Quliti, 2015). Esses agentes atuam inibindo os canais de sódio dependentes de voltagem, reduzindo assim a excitabilidade dos neurônios. Também foi demonstrado que eles ativam os receptores GABA compostos pelas subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  e  $\gamma 2$ , a fim de inibir a excitação neuronal e, em última análise, reduzir a hiperalgesia e a dor (Granger *et al.*, 1995).

### **2.2.2 Tratamento da dor trigeminal**

As opções de tratamento de pacientes com dor trigeminal dependem de vários fatores, incluindo idade, estado geral de saúde, gravidade da doença de fundo e causa subjacente. A

decisão deve ser tomada após uma discussão aprofundada do paciente com a equipe médica envolvida no seu cuidado (Kikkeri, Nagalli, 2022).

Existem relatos na literatura sobre o uso de opióides consorciados com medicamentos de primeira escolha para o tratamento da dor trigeminal em pacientes humanos (Zakrzewska *et al.*, 2018, Yang *et al.*, 2019). Pacientes no Reino Unido e nos Estados Unidos relatam o uso prevalente de analgésicos opioides quando a intensidade da dor é alta nesses casos (Zakrzewska *et al.*, 2017; 2018). Pinto *et al.* (2022) apresentaram dados de um estudo retrospectivo em que os opioides foram a abordagem terapêutica mais utilizada nas exacerbações agudas da dor trigeminal, apesar de sua baixa eficácia e subsequente necessidade de tratamento medicamentoso adicional na maioria dos casos. Um estudo clínico demonstrou que a coadministração de morfina, cetamina e bupivacaína pode atenuar a NT através de mecanismo periférico (Chang *et al.*, 2003).

Quando o quadro doloroso está associado a processos cancerígenos na região orofacial, é necessário que seja elaborado o melhor e individualizado plano de tratamento, baseado no tipo de tumor, extensão, poder metastático, dentre outros critérios (Guedes; Santana; Leles, 2021).

No prognóstico da lesão de câncer oral, fatores como graduação histopatológica e localização anatômica do tumor, idade avançada, estado de saúde geral e do sistema imunológico do paciente devem ser considerados antes de decidir qual tratamento será submetido (Daniel *et al.*, 2016).

No caso de carcinoma de células escamosas (CCE) bucal, a cirurgia ainda é a primeira escolha de tratamento, pois tem boa acessibilidade e reduz a morbidade. Apesar da radioterapia ser tão eficaz quanto a cirurgia, porém apresenta algumas desvantagens, como ocasionar efeitos adversos ao tratamento (Guedes; Santana; Leles, 2021). Entretanto, pacientes submetidos a tratamento radioterápico, pode apresentar diversas complicações como mucosite, infecção local, dor, hipossalivação, cáries por radiação e osteorradionecrose, condições que podem levar à dificuldade de alimentação, resultando assim em desidratação e desnutrição (Daniel *et al.*, 2016).

A dor é uma condição bastante comum em pacientes com CCE oral antes, durante e após o tratamento oncológico (Cramer; Burtness; Ferris, 2019). A intensidade da dor também pode ser maior em função da profundidade de invasão perineural, extensão do tumor e compressão dos tecidos adjacentes (Hechler *et al.*, 2020).

O tratamento da dor trigeminal no câncer oral deve ser direcionada para a origem da condição dolorosa, e de acordo com a escada analgésica e os cinco princípios da Organização Mundial de Saúde. A escada analgésica orienta a terapia medicamentosa baseada na intensidade da dor. Nesta perspectiva, podem ser utilizados no alívio da dor analgésicos não opiáceos e/ou anti-inflamatório não esteroideal (AINES) associados à medicação adjuvante em caso de dor leve a moderada. Em caso de dor intensa, recomenda-se o uso de opióides fortes mais adjuvantes (Morete; Minson, 2010).

O diagnóstico preciso da dor trigeminal de pacientes com câncer de cabeça e pescoço é essencial, uma vez que estabelecido, os cuidados paliativos irão ajudar na redução da intensidade da dor, no número de queixas e quantidade de medicação. Em pacientes sob cuidados paliativos, é importante o conhecimento do manejo de opioides, pois a dor é prejudicial para a qualidade de vida, interferindo nas atividades do cotidiano e comprometendo o plano terapêutico. É válido destacar que cada paciente deve ser avaliado de forma individual, pois cada um possuirá uma indicação de opioide de acordo com o seu diagnóstico, o que torna o conhecimento médico sobre as formas de metabolização e excreção de cada droga fundamental, bem como os níveis de segurança na administração das drogas (De Paula Santos *et al.*, 2021).

Em todo caso, McNicol, Midbari, Eisenberg (2013) destacaram a incerteza em relação ao uso de opioides para dor neuropática em geral, devido a evidências limitadas, bem como preocupações sobre dependência e efeitos colaterais dessa classe de fármacos. Por se tratar de uma dor crônica e debilitante, a dor neuropática muitas vezes é resistente aos tratamentos convencionais, apresentando um desafio significativo para pacientes e profissionais de saúde. Uma abordagem promissora no tratamento dessa condição envolve o bloqueio de receptores específicos que participam na transmissão e modulação da dor (Stein, 2016).

### **2.2.3 Receptores CCK<sub>1</sub> e CCK<sub>2</sub> no nervo trigêmeo**

O sistema colecistocinina é uma rede de sinalização gastrointestinal e neuropeptídica encontrada nas vísceras e nos sistemas nervosos periférico e central (Lavigne; Alles; 2022). Receptores da colecistocinina (CCK) foram identificados na mucosa antral humana (Gregory *et al.*, 1968) e no sistema nervoso de vertebrados (Vanderhaeghen *et al.*, 1975). Os papéis da CCK estão intimamente relacionados à digestão, dor, estresse e depressão, sendo mediados pelos subtipos de receptores CCK<sub>1</sub> e CCK<sub>2</sub>.

O gânglio da raiz dorsal (DRG) transmite informações sensoriais somáticas dos tecidos periféricos para o SNC. Vários neuropeptídeos, incluindo a colecistocinina (CCK), foram identificados dentro de uma subpopulação desses neurônios sensoriais, sugerindo que a CCK pode servir como um neurotransmissor aferente primário (Dalsgaard *et al.*, 1982; Chery-Croze *et al.*, 1985).

Alguns estudos mostraram que os receptores CCK<sub>2</sub> podem ativar a via de transdução de sinal da quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2) no sistema digestivo (Grossini *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2014). ERK1/2 é ativado em neurônios do corno dorsal da medula espinhal em resposta à estimulação de nociceptores e está envolvido na plasticidade nociceptiva (Ji; Murphy; Traub, 2003; Liao *et al.*, 2020). Duan *et al.* (2021) demonstraram que a injeção intratecal do antagonista do receptor CCK<sub>2</sub> em ratos preveniu a hiperalgesia somática ao afetar a ativação de ERK1/2, assim, esse é um alvo terapêutico para tratar a comorbidade de condições de dor primária crônica, como disfunção temporomandibular (DTM) e síndrome de fibromialgia (SFM) na clínica.

Experimentos farmacológicos utilizando antagonistas seletivos dos receptores CCK<sub>1</sub> e CCK<sub>2</sub> demonstram que CCK<sub>2</sub> é o subtipo proeminente de receptor CCK nos neurônios do gânglio trigeminal e espinhal de ratos, coelhos e macacos. Na medula espinhal de ratos e coelhos, receptores CCK<sub>2</sub> são o subtipo proeminente, enquanto na medula espinhal de macaco, CCK<sub>1</sub> é o subtipo de receptor prevalente. Foi demonstrado ainda que os receptores CCK<sub>2</sub> são expressos em uma percentagem substancial em neurônios ganglionares da raiz dorsal em todos os níveis da coluna vertebral, e que a CCK pode antagonizar a analgesia por opioides ao nível do próprio neurônio aferente primário (Ghilardi *et al.*, 1992).

Duas abordagens sobre os possíveis efeitos antiopioide da CCK foram propostas. Em uma abordagem farmacológica, não há evidências de afinidade da CCK por receptores opioides (Wang, 1989), indicando que a CCK não se comporta como um antagonista clássico do receptor. Entretanto, a interação receptor-receptor entre CCK e opioides pode ocorrer de forma indireta (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1999). Há evidências de que a CCK pode neutralizar o efeito da ativação do receptor opioide no influxo e captação de Ca<sup>2+</sup> (Wang *et al.*, 1989, 1990, 1992). Se tal interação ocorrer em células que possuem receptores opioides e CCK, o resultado será uma diminuição do efeito induzido pelos opioides. Isto é apoiado pela distribuição semelhante de receptores opioides e CCK em várias áreas do SNC importantes para a analgesia opioide (Wiesenfeld-Hallin *et al.*, 1999). Os antagonistas da CCK podem não apenas ser útil na tolerância antinociceptiva induzida por opioides, mas talvez também possa ter um papel benéfico na atenuação do desejo por opioides (Mitchell *et al.*, 2006).

Mais recentemente, Yang *et al.* (2018) descreveram que ativação do receptor de CCK<sub>2</sub> pelo octapeptídeo de colecistocinina (CCK-8) inibe a analgesia opioide. O tratamento crônico com opiáceos leva a um aumento na concentração de CCK-8 e, portanto, aumenta o antagonismo da CCK-8 contra a analgesia opioides. Ademais, afirmaram que os peptídeos CCK e opioides estão localizados em vias neurais semelhantes em todo o sistema nervoso central (SNC), desde a medula espinhal, onde estão implicados na resposta à dor, até o sistema límbico, incluindo o hipocampo e o córtex pré-frontal, onde participam dos mecanismos da ansiedade, depressão, aprendizagem e da memória. As evidências sugerem que a CCK e os peptídeos opioides atuam de forma antagônica para afetar a dor e a emoção, bem como a cognição e as funções motoras.

O bloqueio de receptores específicos envolvidos na transmissão da dor é uma estratégia terapêutica importante no manejo da dor crônica. Diversos produtos naturais têm demonstrado a capacidade de influenciar receptores responsáveis pela sinalização da dor neuropática, oferecendo assim um potencial terapêutico significativo (Terry *et al.*, 2011, Vlachojannis; Magora; Chrubasik, 2011).

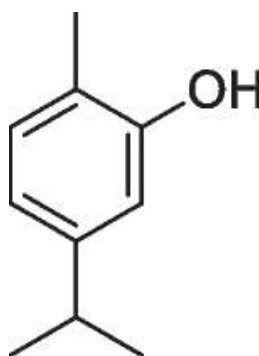
### **2.3 Produtos naturais**

Os produtos naturais são amplamente utilizados desde dos tempos pré-históricos e em diversas culturas no tratamento de várias condições de saúde, muitas vezes como parte de uma abordagem integrativa e complementar à medicina convencional (Guerra; Norradi 2003). Devido às suas propriedades medicinais esses produtos podem assim interagir com medicamentos prescritos, potencializando ou diminuindo seu efeitos (Carneiro; Comarella, 2016).

As plantas produzem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são moléculas necessárias à formação, manutenção e reprodução das plantas, como carboidratos, lipídios e proteínas. Por outro lado, os metabólitos secundários apresentam funções necessárias à sobrevivência da planta em seu ecossistema, como atração dos polinizadores e animais dispersores de sementes, adaptações químicas à pressão ambiental, além de apresentarem atividades biológicas, como ação contra microrganismos, insetos e predadores superiores. Assim, o metabolismo secundário é responsável pela produção de compostos ativos, como alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas, polifenóis e taninos (Gurib-Fakim, 2006; Twaij; Hasan, 2022).

Carvacrol é um monoterpênóide fenólico líquido natural, denominado 5-isopropil-2-metilfenol pela *Applied Chemistry and International Union of Pure* (IUPAC). Possui propriedades lipofílicas, sendo insolúvel em água e solúvel em tetracloreto de carbono, éter dietílico, acetona e etanol. Sua fórmula química é  $C_{10}H_{14}O$  (Figura 4), possui peso molecular de 150,22 g/mol e densidade de 0,976 g/cm<sup>3</sup> a 20°C - lit. O ponto de fusão/ponto de congelamento é 3–4 °C - lit. e o ponto de ebulição inicial é de 236–237 °C - lit. (Friedman, 2014, Güvenç *et al.*, 2019; Mohebbati *et al.*, 2021; Gandova *et al.*, 2023).

Figura 3 – Fórmula química estrutural do carvacrol



Fonte: Ali *et al.* (2024).

O carvacrol está presente no óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Origanum vulgare* (orégano grego, manjerona selvagem), *Origanum majorana* (manjerona), *Lepidium flavum* (pimenteira), *Lepidium flavum* (erva-pimenta), *Citrus aurantium* var. bergamia Loisel (bergamota selvagem), *Monarda didyma* e em outras plantas (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2022). Além disso, o carvacrol pode ser sintetizado por técnicas biotecnológicas e químicas (Can Baser, 2008, Bayir; Kiziltan; Kocyigit, 2019).

Resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o carvacrol possui uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo efeitos antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, anti-inflamatório, antinoceptiva, analgésica, hepatoprotetor, espasmo lítico e vaso relaxante (Guimarães *et al.*, 2012; Joca *et al.*, 2012; Suntres; Coccimiglio; Alipour, 2015; Oliveira *et al.*, 2020; Sampaio *et al.*, 2021; Gunes-Bayir *et al.*, 2022).

O carvacrol possui importantes propriedades anti-hipernociceptiva e anti-inflamatória, a exemplo do que foi testado sobre modelo de pleurisia induzida por carragenina e edema de pata em camundongo (Guimarães *et al.*, 2012). A inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e da inibição da liberação de óxido nítrico (NO) parece ser um evento



chave para a qualificação da atividade anti-inflamatória do carvacrol, assim, esse monoterpreno é considerado um candidato interessante para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento de condições dolorosas associadas à inflamação (Guimarães *et al.*, 2010, 2012).

Em relação a sua atividade analgésica, o carvacrol bloqueia reversivelmente a excitabilidade e a condução nervosa em neurônios periféricos de maneira dependente da concentração. O bloqueio da excitabilidade neuronal induzido pelo monoterpreno ocorre sem alterar o potencial de repouso e/ou a resistência de entrada. Além disso, esse efeito é o resultado da inibição direta da corrente de sódio dependente de voltagem, o que sugere sua atuação como anestésico local (Joca *et al.*, 2012).

Horishita *et al.* (2020) demonstraram a ação inibitória do carvacrol sobre os canais de sódio voltagem-dependentes Nav1.2, Nav1.6, Nav1.3, Nav1.7 e Nav1.8 expressos em modelo de oócitos de *Xenopus laevis*. Essas estruturas desempenham papéis importantes no desenvolvimento de dor inflamatória e neuropática (Cummins; Sheets; Waxman, 2007; Bennett *et al.*, 2019).

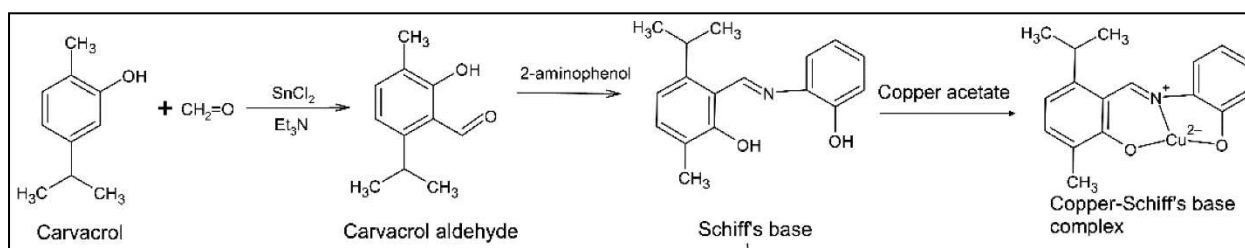
O carvacrol é geralmente considerado um composto seguro. Em um ensaio clínico de Fase I, o composto foi administrado a indivíduos saudáveis a 1 e 2 mg/kg/dia durante 30 dias, e não foram observadas reações adversas críticas ou alterações clinicamente significativas nos testes de função bioquímica, hematológica, endócrina, renal ou hepática. Em camundongos (*Mus musculus*) que receberam carvacrol por via oral, a dose letal capaz de matar 50% dos animais (DL<sub>50</sub>) foi de 1.544 mg/kg de peso corporal (Andre *et al.*, 2016). A DL<sub>50</sub> em ratos foi de 80 mg/kg de peso corporal após administração intravenosa (IV), 73,30 mg/kg de peso corporal quando administrado por via intraperitoneal (IP) e 680 mg/kg de peso corporal após administração subcutânea (Andersen, 2006).

O carvacrol parece ser lentamente absorvido no intestino de coelho, pois 22 h após a administração de 1,5 g, apenas cerca de 25% da dose foi excretada na urina (DE Vincenzi *et al.*, 2004). Estudos mais sobre o metabolismo do carvacrol foram realizados por Austgulen; Solheim; Scheline (1987) em ratos da linhagem Wistar. O composto na dose de 1 mmol/kg, dissolvido em propilenoglicol e administrado aos animais por gavagem, foi excretado inalterado ou como glicuronídeos e sulfatos na urina. Em quantidades muito menores, ocorreu a hidroxilação dos grupos metil e isopropil e posterior oxidação em ácido. Foram observados apenas vestígios de hidroxilação no anel aromático, levando à formação de 2,3-dihidroxi-p-cimeno (Austgulen; Solheim; Scheline, 1987; De Alvarenga *et al.*, 2021).

Assim, compreendendo que o desenvolvimento de novos fármacos a partir de metabólitos secundários de plantas é um dos tópicos mais recentes de pesquisas em andamento que envolve triagens farmacológicas em larga escala de extratos e compostos ativos. O carvacrol apresenta versatilidade farmacológica que abre um vasto campo de estudo. Sua estrutura química, por exemplo, possui múltiplos grupos funcionais ajustáveis que possibilitam a modulação química das propriedades requeridas, o que pode garantir uma ampla diversidade de compostos (Sisto *et al.*, 2020). De fato, a síntese de derivados de produtos naturais pode lançar luz sobre novos agentes terapêuticos contra doenças humanas devido à modulação de suas características físico-químicas e toxicológicas (Suntres; Coccimiglio; Alipour, 2015; Sykuła *et al.*, 2023).

A síntese de Carvacrol Aldeído, Base de Schiff Derivada do Carvacrol e do complexo Base de Schiff com cobre foi detalhadamente descrita por Bansal *et al.* (2022) (Figura 4).

Figura 4 – Reação de síntese de Carvacrol Aldeído (2-Hidroxi-3-metil-6-(propan-2-il)benzaldeído), Base de Schiff Derivada do Carvacrol e do complexo Base de Cu(II)–Schiff



Fonte: Adaptado de Bansal *et al.* (2022).

Um estudo da farmacocinética *in silico* e de dinâmica molecular contemplam o carvacrol aldeído como um composto antimetastático emergente. Esse composto exibiu uma interação molecular eficiente com a proteína 1 associada à metástase (MTA1) com energia de ligação de -5,3 kcal/mol (Bansal; Kaushik; Sharma, 2022). Em outro estudo, o complexo Base de Cu(II)–Schiff do carvacrol inibiu mais fortemente a proliferação e migração de células A549 (células alveolares) em relação ao carvacrol. Os autores atribuíram essa atividade à inibição da proliferação e migração celular na fase do ciclo celular G2/M, bem como à apoptose, possivelmente através da ativação da via apoptótica mitocondrial (Bansal *et al.*, 2022).

Assim, desprende-se desses estudos que o desenvolvimento de análogos do carvacrol tem resultado em compostos com efeitos biológicos promissores que podem ser investigados no tratamento de doenças, como infecções bacterianas, câncer, infecções fúngicas, etc. Embora a maioria das evidências sobre o carvacrol e a dor neuropática venha de estudos em animais, há um crescente interesse em sua aplicação clínica. Hoje com a bioinformática é possível desenvolver medicamentos, facilitando a identificação e o design de novos fármacos por meio de técnicas computacionais avançadas (Lee *et al.*, 2018). Assim é possível analisar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas antes de serem testados em animais. Este campo interdisciplinar integra biologia, química, medicina, ciência da computação, estatística e matemática para analisar e interpretar dados biológicos, o que irá contribuir de forma significativa para os estudos futuros em humanos, validando assim sua eficácia e segurança (Saran *et al.*, 2023).

Entretanto, infere-se que mais estudos sobre o mecanismo de ação desses compostos são necessárias para a compreensão dos seus efeitos farmacológicos.

#### **2.4 Estudos *in silico***

A bioinformática é uma abordagem biológica computacional usada para analisar, coletar, armazenar e manter um volume considerável de dados. A pesquisa nesse campo pode ser dividida em três abordagens principais: (1) a análise baseada em dados classificados disponíveis, (2) o uso de tecnologia da informação e modelagem matemática para adquirir novas conclusões, (3) e a abordagem integrada para pesquisa computacional e modelagem experimental matemática (Saran *et al.*, 2023).

O rápido desenvolvimento de recursos computacionais e bancos de dados de pequenas moléculas levaram a grandes avanços no desenvolvimento de compostos. À medida que o número de novos alvos de medicamentos aumenta exponencialmente, métodos computacionais são cada vez mais utilizados para acelerar o processo de descoberta de medicamentos. Isso tem levado ao aumento do uso de *design* de medicamentos assistidos por computador e técnicas de bioinformática química, como acoplamento de alto rendimento, pesquisa de homologia e pesquisa de fármacos em bancos de dados para tecnologia de triagem virtual (Vucicevic; Nikolic; Mitchell, 2019).

A triagem virtual é uma parte importante dos métodos de *design* de medicamentos auxiliados por computador, ao passo que pode ser a maneira mais barata de identificar potenciais compostos de interesse (Lin; Li; Lin *et al.*, 2020). Desta forma, é possível investigar

os efeitos de substâncias de interesse clínico, na medida em que métodos computacionais integrados aceleram o desenvolvimento de medicamentos e ajudam a identificar terapias eficazes com novos mecanismos de ação que, em última análise, podem ser aplicados a uma variedade de sistemas biológicos complexos (Lee *et al.*, 2018; Lin; Li; Lin *et al.*, 2020).

Nos últimos dez anos, a avaliação das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) surgiu como um aspecto crucial no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Dado o custo e a complexidade das avaliações *in vivo* e *in vitro*, as técnicas *in silico* tornaram-se ferramentas valiosas para estimar características químicas, atividades biológicas e propriedades ADME de compostos químicos (Siqueira *et al.*, 2024)

Estudos *in silico* referem-se ao uso de técnicas computacionais para simular e analisar processos biológicos e químicos, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento de novas medicações. Essas abordagens permitem a modelagem de interações entre drogas e alvos biológicos, previsão de efeitos colaterais, e otimização de compostos antes mesmo de serem sintetizados em laboratório. Utilizando algoritmos avançados e bancos de dados extensivos, possibilitando acelerar o processo de descoberta de fármacos, reduzir custos e aumentar a eficiência. Além disso, estudos *in silico* facilitam a triagem virtual de milhares de moléculas, identificando candidatos promissores para testes adicionais. Essa metodologia não apenas complementa os estudos *in vitro* e *in vivo*, mas também abre novas possibilidades na medicina personalizada, adaptando tratamentos às características genéticas específicas dos pacientes (Leelananda; Lindert, 2016; Kumar; Kumar, 2019).

No presente estudo, no qual foram avaliados análogos sintéticos do carvacrol, avaliações *in silico* puderam ser consideradas como a primeira etapa para o rastreio de alvos biológicos, na medida em que, segundo Herrera-Calderon *et al.* (2020), quando uma molécula isolada é caracterizada quimicamente, estudos *in silico* são o primeiro passo da pesquisa básica que leva à etapa seguinte de avaliação, como os estudos *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in silico* podem ser ferramentas úteis na elucidação do mecanismo de ação sobre alvos biológicos, bem como a predição do perfil farmacocinético de moléculas de interesse.

Ademais, partindo de premissas éticas que envolvem o uso de animais em pesquisa, há um claro esforço global, imposto por legislações específicas, que visam reduzir, refinar e/ou substituir os testes em animais por alternativas não animais. Mudanças legislativas, pressões comerciais e éticas motivaram a busca de alternativas aos tradicionais ensaios *in vivo* utilizados no desenvolvimento de produtos e na avaliação de segurança toxicológica (Madden *et al.*, 2020).

No que tange à redução do número de animais utilizados em pesquisa, ferramentas *in silico* permitem identificar alvos-moleculares com precisão próxima a testes em modelos *in*

*vivo*. Na fase de validação pré-clínica de um composto, momento em que um grande número de parâmetros (bioquímicos, farmacológicos, toxicológicos, etc.) precisam ser explorados, análises *in silico* contribuem decisivamente para redução no número de experimentos fundamentais e do número de animais necessários para alcançar resultados estatisticamente significativos (Viceconti *et al.*, 2021).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Executar triagem virtual da bioatividade e simulações de *docking* molecular de análogos do carvacrol sobre receptores da colecistocinina visando a modulação da dor trigeminal.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar triagem virtual da bioatividade do carvacrol (CV) e seus derivados, CV aldeído, CV Base de Schiff e Complexo Base de Schiff – Cobre (BSCu<sup>2+</sup>);
- Analisar os parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do CV e seus derivados por meio de métodos *in silico*;
- Estimar a eficiência de lipofilicidade-metabolismo para os compostos;
- Realizar a predição do sítio de metabolismo e toxicidade aguda *in silico* do CV e seus derivados para *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*;
- Simular *docking* molecular associado à inibição da dor crônica tomando como alvos biológicos os receptores da colecistocinina (CCK) do tipo 1 (CCK<sub>1</sub>) e 2 (CCK<sub>2</sub>);
- Avaliar as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas do CV e seus derivados na modulação da dor trigeminal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Triagem virtual da bioatividade

A representação estrutural bidimensional do carvacrol (CV) e seus derivados sintéticos CV aldeído, CV Base de Schiff (BSCV) e Complexo Base de Schiff – Cobre (BSCu<sup>2+</sup>) foram plotadas no software de licença acadêmica MarvinSketch<sup>®</sup>, versão Iodine 7 (Chemaxon<sup>©</sup>) (<https://chemaxon.com/marvin>) e convertidos em notação linear de *Simplified molecular-input line-entry system* (SMILES) para serem submetidas à triagem virtual para seleção da proteína alvo no servidor online SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). O servidor foi ajustado para realizar um teste de similaridade 3D de cada ligante com compostos depositados na base de dados da ChEMBL com atividade biológica conhecida frente aos modelos de roedores *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, como mostra a Equação 1:

$$d = \sum_{s=1}^{18} |x_s - y_s| \quad (1)$$

onde a menor distância ( $d$ ) de Manhattan é correspondente à combinação de até 20 conformações mais estáveis (de menor energia) do composto de entrada ( $x$ ) e das 20 conformações mais estáveis dos mais de 300.000 compostos depositado na base de dados ( $y$ ).

### 4.2 Estudo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)

#### 4.2.1 Análises de potencial de lipofilicidade molecular

As estruturas químicas dos ligantes foram otimizadas em seu espaço conformacional pelo método da mecânica clássica *Merk Molecular Force Field* (MMFF94) para plotagem do mapa de superfície de potencial de lipofilicidade molecular (MLP) na versão de código aberto do programa *Python Molecular* (PyMOL) *graphs* (Oberhauser, Nurisso, Carrupt, 2014), utilizando-se a seguinte equação (2):

$$MLP_k = \sum_{i=1}^N F_i \cdot f(d_{ik}) \quad (2)$$

onde  $N$  é o número de fragmentos moleculares,  $F$  é o índice de lipofilicidade de cada fragmento  $i$ , negativos para fragmentos hidrofílicos e positivos para fragmentos hidrofóbicos, e  $f(d_{ik})$  é uma função de distância espacial ( $k$ ) entre os fragmentos  $i$  (Oberhauser, Nurisso, Carrupt, 2014). Os grupos doadores de ligação de hidrogênio (HBD) foram analisados quanto grupos ionizáveis pelo cálculo de pKa, e lipofilicidade mediada por coeficiente de partição (logP) e coeficiente de distribuição (logD).

#### 4.2.2 Análises de MPO e eficiência lipofilicidade-metabolismo (LipMetE)

Os compostos foram submetidos a uma estimativa quantitativa de *druglikeness* a partir do algoritmo de otimização multiparamétrica (MPO) da Pfizer, Inc., presente no programa MarvinSketch®, como mostra a equação 3:

$$D = \sum_{i=1}^n w_k T_k(x_k^0) \quad (3)$$

onde a função de *desirability* ( $d$ ) é definida pelo somatório dos atributos físico-químicos ( $k$ ) transformados em um fator de ponderação ( $w$ ) para valores calculados dentro ( $x_k \leq x_a$ ) ou fora ( $x_b < x_k$ ) do limite de idealidade ( $T(x)$ ), que incluem os intervalos:  $\log P \leq 3$ ,  $\log D \leq 2$ , massa molecular (MM)  $\leq 360$  g/mol, Área de Superfície Polar Topológica (TPSA)  $40-90 \text{ \AA}^2$ , HBD  $\leq 1$  and pKa da base mais forte  $\leq 8$  ( $n = 6$ ), resultando em uma pontuação que varia de 0 (baixa *desirability*) a 6 (alta *desirability*), com valores preferíveis de MPO  $> 4.0$  que expressam um melhor alinhamento sistemático entre descritores farmacocinéticos (Wager *et al.*, 2010). A eficiência lipofilicidade-metabolismo (LipMetE) foi estimada pela equação 4 (STEPAN *et al.*, 2013):

$$LipMetE = \log D - \log CL \quad (4)$$

onde o logD é a lipofilicidade estimada em pH fisiológico (pH de aproximadamente 7.4) e logCL é o logaritmo estimado da taxa de depuração, onde valores entre 0-2.5 expressam maior estabilidade metabólica.

Os descritores farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) foram estimados por teste consensual entre as bases de dados ADMETlab 2.0



(<https://admetmesh.scbdd.com/>), ADMETboost (<https://ai-druglab.smu.edu/>) e pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>), que incluem permeabilidade passiva ( $P_{app}$ ,  $A \rightarrow B$ ) em modelo celular *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK), substrato de glicoproteína-P (P-gp), fração de biodisponibilidade oral (F%), volume de distribuição (VD), logaritmo da permeabilidade na barreira hematoencefálica (logBB) e taxa de depuração intrínseca ( $CL_{int,u}$ ).

#### 4.2.3 Predição do sítio de metabolismo e toxicidade aguda

A estabilidade metabólica dos análogos sintéticos do CV foi mediada via predição do sítio de metabolismo nos servidores SOMP – Way2Drug (<http://www.way2drug.com/somp/>) e SToxTox (<https://stoptox.mml.unc.edu/>), a partir de descritores de relação estrutura-atividade (QSAR) que relacionam sensibilidade e especificidade dos grupos funcionais moleculares (Borba *et al.*, 2022). Os resultados foram relacionados aos descritores de substrato de isoformas do citocromo P450 (CYP450) do teste consensual de ADME, e da estimativa de dose letal ( $DL_{50}$ ) para as vias de administração oral, intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV) em ratos (*Rattus norvegicus*) dos servidores ProTox-II ([https://tox-new.charite.de/prottox\\_II/](https://tox-new.charite.de/prottox_II/)) e GUSAR Online (<http://www.way2drug.com/gusar/>).

#### 4.3 Simulações de *docking* molecular

O protocolo adotado para as simulações de *docking* molecular associado à inibição da dor crônica foi baseado no estudo de farmacodinâmica de (Zhang *et al.*, 2021), tomando como alvos biológicos os receptores da colecistocinina (CCK) do tipo A e B. O receptor CCK1 acoplado a proteína-G foi reportado do banco de dados de proteínas RCSB (<https://www.rcsb.org/>) sob o código PDB ID: 7F8X co-cristalizado ao agonista peptídico NN9056 e identificado como "Crystal structure of the cholecystokinin receptor CCK1R in complex with NN9056", classificada como proteína estrutural de membrana expressa em *Homo sapiens* e vírus T4 e caracterizada por difração de raio-X em uma resolução de 3.0 Å, utilizando como antagonista o benzodiazepínico Devazepida (PubChem CID: 443375) reportado do repositório de drogas PubChem® (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), enquanto o receptor CCK<sub>2</sub> acoplado a proteína-G está depositado no repositório sob código PDB ID: 7F8V co-cristalizado ao agonista peptídico hormonal Gastrina e identificada como "Cryo-EM structure of the cholecystokinin receptor CCK<sub>2</sub>R in complex with gastrin-17 and Gi" expressa em *Homo sapiens* e caracterizada por microscopia eletrônica em uma resolução de 3.3 Å.

Foram removidos os resíduos distintos de aminoácidos e adicionados hidrogênios polares e cargas Gasteiger às estruturas proteicas no programa UCSF Chimera<sup>®</sup> (Pettersen *et al.*, 2004). A caixa de grid foi ajustada para abranger todo o espaço conformacional dos alvos, configurados nas dimensões  $x = 56$ ,  $y = 54$  e  $z = 112$  em torno das coordenadas  $x = 10.749$ ,  $y = 16.177$  e  $z = 27.859$  para o receptor CCK<sub>1</sub>, e nas dimensões  $x = 104$ ,  $y = 106$  e  $z = 72$  em torno das coordenadas  $x = 146.817$ ,  $y = 143.447$  e  $z = 141.44$  para o receptor CCK<sub>2</sub> no programa AutoDockTools<sup>®</sup> (Morris *et al.*, 2009). Por fim, o código AutoDockVina<sup>®</sup> (Trott; Olson, 2009) foi configurado para realizar uma série de 50 simulações independentes de 20 poses cada para cada um dos ligantes preparados e otimizados, incluindo os agonistas e antagonistas (*re-docking*) (Marinho *et al.*, 2020), cujo critério de seleção do encaixe mais favorável inclui um alinhamento entre baixa energia livre de Gibbs ( $\Delta G < -6.0$  kcal/mol) (Shityakov; Foerster, 2014) dentro de uma faixa de ajuste estatístico mediado por *Root Mean Square Deviation* (RMSD) inferior a 2.0 Å (Yusuf *et al.*, 2008).

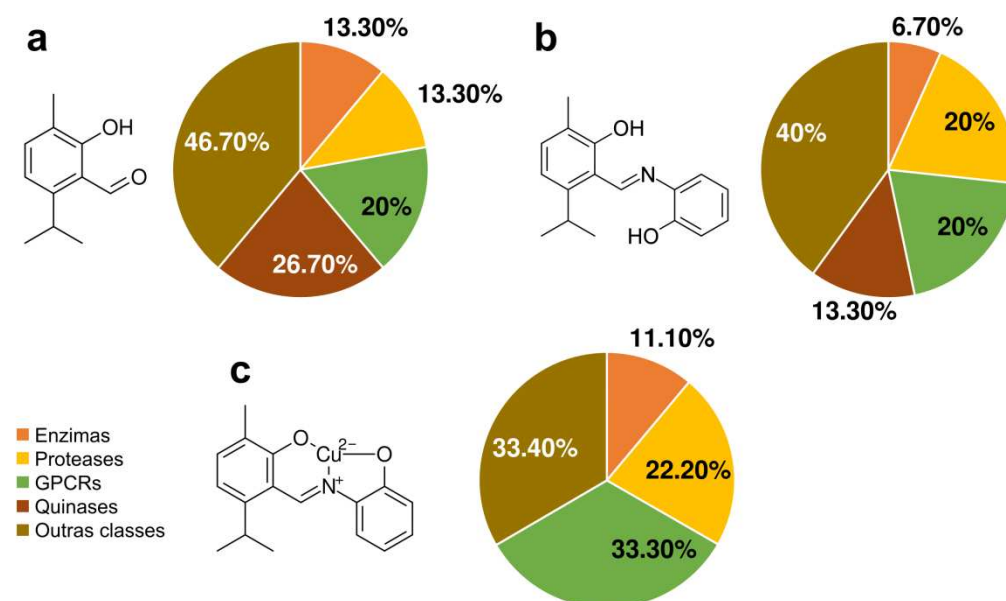
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem virtual de bioatividade

A triagem virtual baseada em estrutura tem sido amplamente aplicada para a descoberta de novas substâncias bioativas frente a alvos biológicos específicos. Esta técnica é capaz de estimar uma atividade biológica pela identificação de *scaffolds* presentes no composto de entrada semelhantes a compostos já caracterizados (Li *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020). Estudos recentes tiveram sucesso em relacionar a atividade biológica identificada por *virtual screening* e resultados de testes *in vitro* (Matos *et al.*, 2022; Mendes *et al.*, 2023), evidenciando a confiança das previsões de apoio aos ensaios experimentais. Aqui, a triagem virtual foi configurada para realizar um teste de similaridade dos compostos de entrada com mais de 300.000 substâncias bioativas da base de dados da ChEMBL (Daiana; Michielin; Zoete, 2019) para estimar o efeito biológico dos análogos do CV.

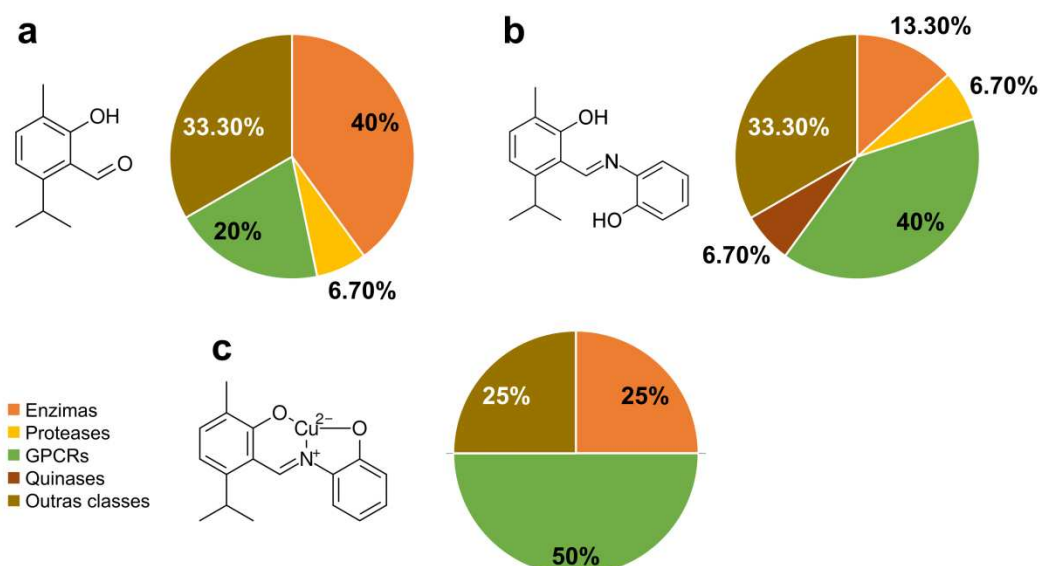
Os resultados incluem a distribuição das classes de alvos biológicos de interação dos análogos a partir do teste de similaridade com compostos testados em espécie de roedores *Mus musculus* (Figura 5) e *Rattus norvegicus* (Figura 5). Foi possível observar que os ligantes CV aldeído (Figura 5a) e BSCV (Figura 5b) mostraram um percentual relativo de 20% de suas interações biológicas ocorrerem por afinidade a Receptores Acoplados à Proteína G (GPCRs), enquanto foi estimado um percentual de aproximadamente 33% para o BSCu<sup>2+</sup> (Figura 6c), para a espécie *Mus musculus*. Para a espécie *Rattus norvegicus*, dentro da base de dados da ChEMBL, o composto CV aldeído manteve o percentual relativo, mas apresenta maior parte de suas interações frente a enzimas (Figura 6a), enquanto a BSCV obteve um percentual relativo de 40% de suas interações biológicas com GPCRs, como classe dominante (Figura 6b) e o BSCu<sup>2+</sup> tem cerca de metade de suas interações estimadas para GPCRs (Figura 6c).

Figura 5– Distribuição relativa das classes de alvos de interação biológica dos ligantes **a** CV aldeído, **b** BSCV and **c** BSCu<sup>2+</sup>, para o organismo *Mus musculus*



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 6 – Distribuição relativa das classes de alvos de interação biológica dos ligantes **a** CV aldeído, **b** BSCV and **c** BSCu<sup>2+</sup>, para o organismo *Rattus norvegicus*

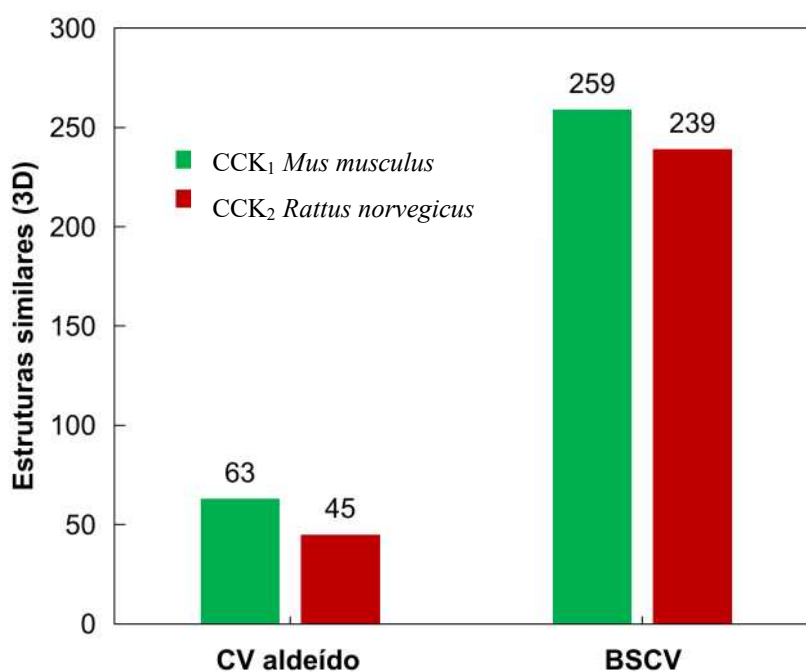


Fonte: elaborada pelo autor.

Este teste foi capaz de estimar que dois dos três derivados sintéticos de CV, isto é, CV aldeído and BSCV, mostraram similaridade com uma série de compostos heterocíclicos nitrogenados e oxigenados (principalmente de função amida) com ação antidepressiva em ratos

atuantes sobre GPCRs presentes no sistema nervoso pela via CCK<sub>1</sub> (sistema nervoso periférico) e CCK<sub>2</sub> (sistema nervoso central) (Liu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Estes alvos foram cristalizados recentemente e possuem papel fundamental na nocicepção, uma vez que a inibição seletiva desta classe de alvos está diretamente associada à redução da percepção de dor (Lavigne; Alles, 2022). Na triagem de compostos similares, foi possível observar que o BSCV teve maior similaridade com compostos 3D moduladores de receptores de CCK<sub>1</sub>, em *Mus musculus*, e CCK<sub>2</sub>, em *Rattus norvegicus*, – pelo menos 239 compostos – quando comparado ao análogo CV aldeído (Figura 7). Embora o BSCu<sup>2+</sup> apresente estimado grau de afinidade com GPCRs, não foram encontrados *scaffolds* semelhantes dentro da base de dados para este receptor específico.

Figura 7 – Teste de similaridade 3D com compostos da base de dados da ChEMBL que se ligam aos receptores CCK<sub>1</sub> and CCK<sub>2</sub>



Fonte: elaborada pelo autor.

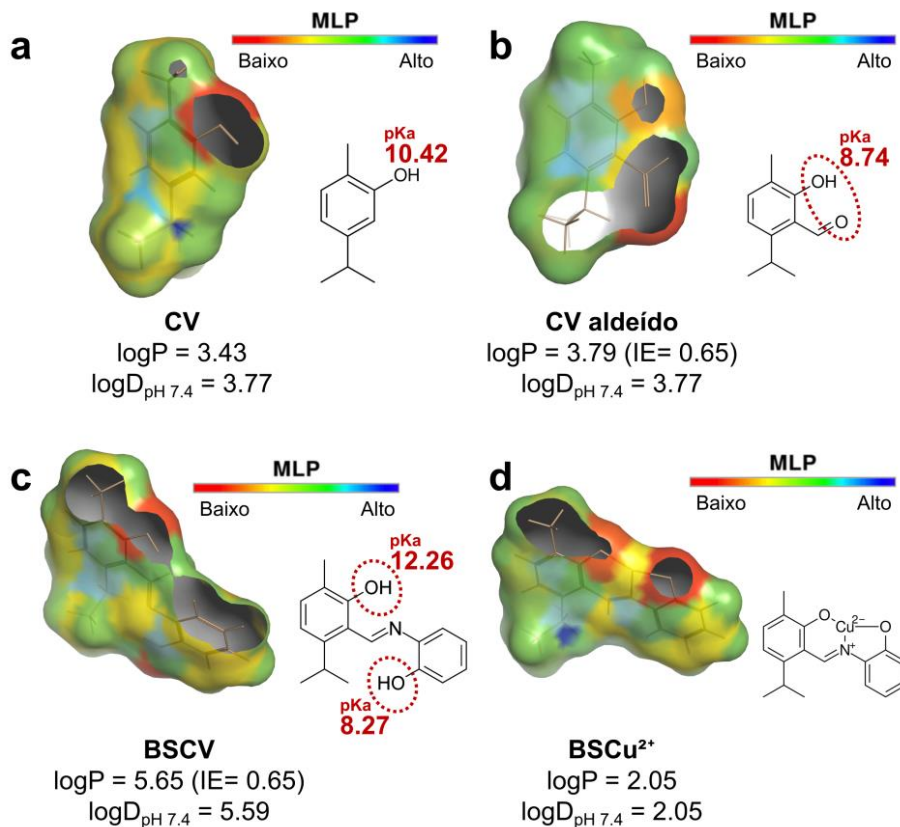
## 5.2 Estudo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)

### 5.2.1 Análises de potencial de lipofilicidade molecular (MLP)

No mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP), na Figura 8, é

possível verificar as contribuições estruturais resultantes dos índices de lipofilicidade relativa dos análogos de CV. A análise mostra que a adição de um grupo aldeído (-CHO) é um incremento estrutural (IS) que aumenta a lipofilicidade do CV aldeído em relação ao CV, em função da interação de H-bond intramolecular entre os grupos -OH and -CHO (Figura 8b), embora apresentem fragmentos de superfície ligeiramente hidrofílica (espectro amarelo-vermelho). Na BSCV, a presença de dois -OH HBD e uma amina HBA apresentam um IS que aumenta sua lipofilicidade em relação ao CV aldeído, com valor de logP na ordem de 5.65 (Figura 8c), embora a superfície molecular hidrofóbica tenha forte contribuição dos anéis aromáticos (espectro verde-azul). A superfície molecular do BSCu<sup>2+</sup> é essencialmente hidrofílica em função dos íons Cu<sup>2+</sup> e R<sub>3</sub>N<sup>+</sup> nas vizinhanças dos átomos de oxigênio (espectro amarelo-vermelho na Figura 8d), com o menor índice de lipofilicidade relativa calculada (logP = 2.05).

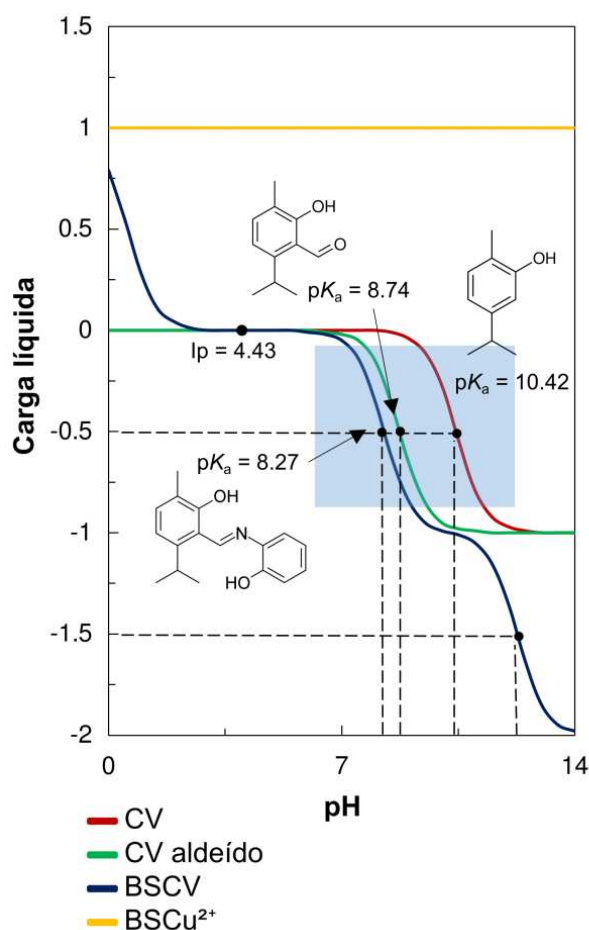
Figura 8 – Mapa de superfície do potencial de lipofilicidade molecular (MLP) com valores calculados de pKa, logP and logD at pH 7.4 para os ligantes **a** CV, **b** CV aldeído, **c** BSCV and **d** BSCu<sup>2+</sup>



Fonte: elaborada pelo autor.

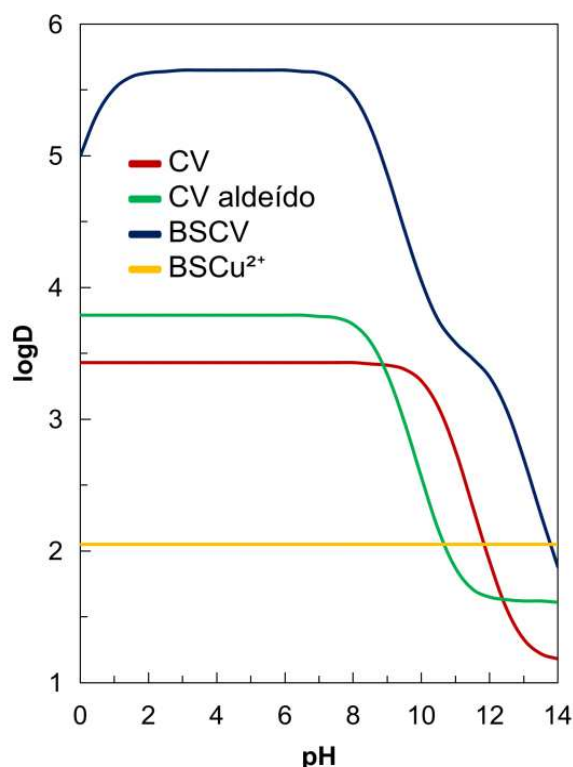
No gráfico de equivalência  $\text{OH}^-$  (Figura 9), é possível observar o efeito indutivo retirador de elétrons do grupo  $-\text{CHO}$  que desloca o equilíbrio químico do CV aldeído no sentido da formação da espécie ionizada em pH 8.74, ponto de equivalência entre a espécie ácida e a base conjugada, enquanto a presença de dois centros ionizáveis de OH desloca o ponto de equivalência ácido-base conjugada da BSCV para o pH 8.27, com  $I_p = 4.43$  que favorece a predominância da espécie ácida em pH fisiológico (em torno de pH 7.4). O efeito ionizável ocasionou um decréscimo na lipofilicidade relativa dos compostos entre os níveis de pH em torno de 8-10 (Figura 10). Aqui é válido destacar que a carga líquida  $1+$  do grupo  $\text{R}_3\text{N}^+$  resultou na menor lipofilicidade tampão, com  $\log D$  para pH 7.4 na ordem de 2.05 (Figura 10), garantindo um melhor equilíbrio entre lipofilicidade e permeabilidade (Lipinski, 2004).

Figura 9 – Gráfico de distribuição de carga em função da variação do pH dos derivados do Carvacrol



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 10 – Lipofilicidade dependente de pH (logD) chart calculado para os derivados do carvacrol



Fonte: elaborada pelo autor.

### 5.2.2 Análises de MPO e LipMetE

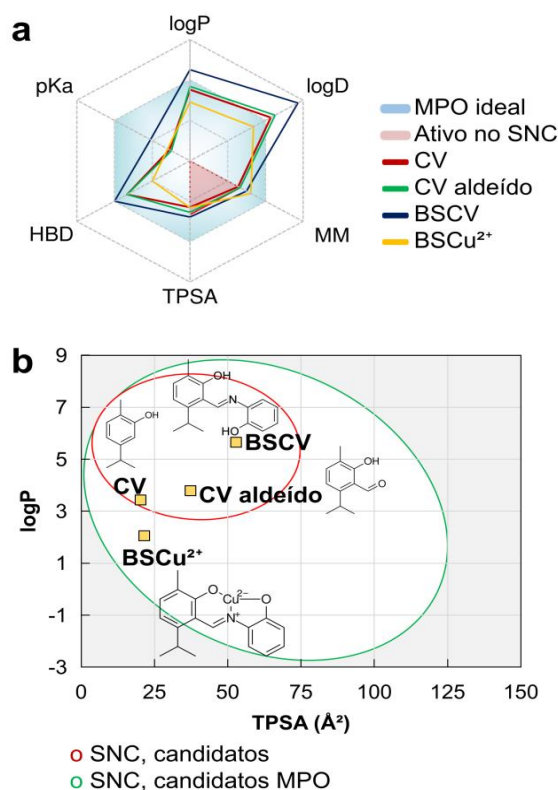
Para garantir uma otimização na seleção de novos candidatos a drogas ativas no SNC, Wager *et al.*, (2016), da Pfizer, Inc., elaboraram um modelo de MPO que relaciona o grau de *desirability* de multiparâmetros físico-químicos, onde observaram que ácidos fracos pouco lipofílicos ( $\log P \leq 3$  or  $\log D$  at pH 7.4  $\leq 2$ ), maiores e mais polares do que drogas ativas no SNC comumente comercializadas ( $MM > 150$  g/mol and  $TPSA > 20-40$  Å<sup>2</sup>) apresentam um melhor alinhamento entre descritores de ADME: alta permeabilidade passiva ( $P_{app, A \rightarrow B} > 10 \times 10^{-6}$  cm/s), baixa taxa de efluxo passivo (low P-gp affinity) e baixa taxa de depuração hepática ( $CL_{int,u} < 8$  mL/min/kg) (Pettersson *et al.*, 2016; Wager *et al.*, 2016), pois ocupam um espectro de equilíbrio entre absorção e estabilidade metabólica e segurança por atividade no SNC (Hughes *et al.*, 2008; Johnson; Dress; Edwards, 2009; Kiani; Jabeen, 2020).

O gráfico de radar da Figura 10a a mostra o ajuste dos ligantes CV e dos derivados sintéticos às funções *desirability* no espectro de MPO da Pfizer. A partir da análise topológica dos ligantes (Figura 11), foi possível observar que o BSCu<sup>2+</sup> reside em um espaço físico-



químico mais favorável de MPO (espectro azul, Figura 11a), com pontuação de MPO na ordem de 5.05 (Tabela 1) que indica uma melhor viabilidade ADME, incluindo provável acesso ao SNC (espectro vermelho, Figura 11a). É válido destacar que a alta lipofilicidade e o efeito dos HBD intramoleculares são limitantes do espectro de MPO do BSCV, com pontuação de *desirability* na ordem de 3.50 (Tabela 1) abaixo do ideal (MPO > 4.0), inviabilizando o acesso do ligante ao SNC (Wager *et al.*, 2010). É curioso ressaltar que este teste corrobora com a predição de permeabilidade na barreira hematoencefálica (BBB), uma vez que o descritor de logB na ordem de -0.2 indica uma baixa distribuição do BSCV no SNC (Ma; Chen; Yang, 2005) (Tabela 2). No gráfico da Figura 11b, é possível observar que a baixa lipofilicidade do BSCu<sup>2+</sup> faz com que o composto resida em um espaço físico-químico de maior segurança ao SNC (logP < 3), uma vez que compostos muito lipofílicos podem ser ativos tóxicos no SNC.

Figura 11 – **a** Radar de *desirability* previsto por MPO e **b** alinhamento entre lipofilicidade (logP) e polaridade (TPSA) para estimativa da *desirability* no SNC.



Fonte: elaborada pelo autor.

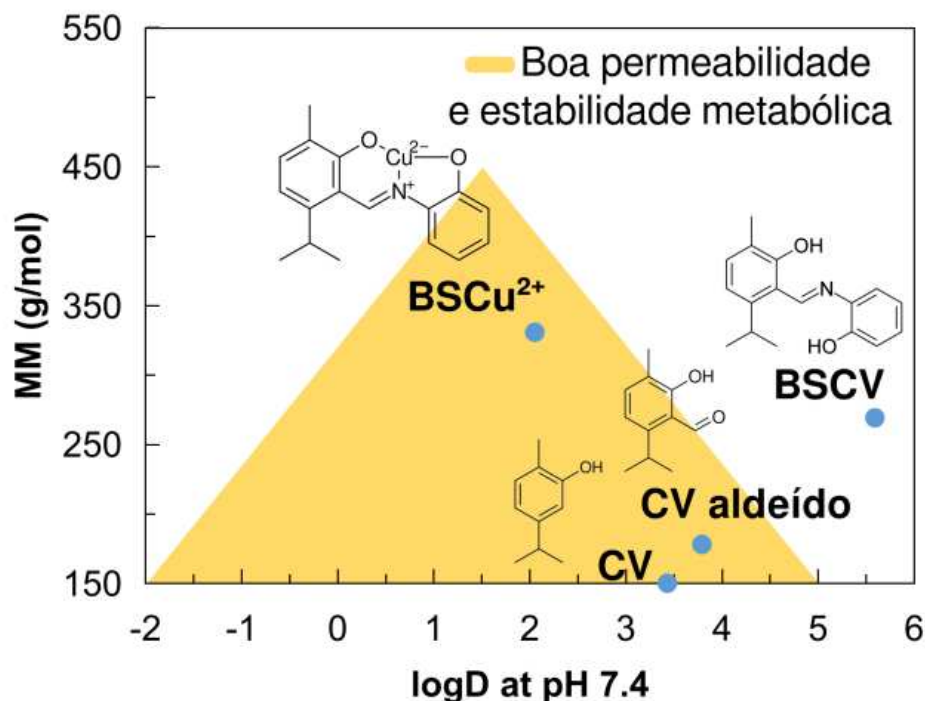
Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos derivados do CV aplicados ao sistema de classificação de MPO da Pfizer, Inc.

Propriedade/moléculas	CV*	CV aldeído	BSCV	BSCu <sup>2+</sup>
logP	3.43	3.79	5.65	2.05
logD	3.43	3.77	5.59	2.05
MM	150.22 g/mol	178.23 g/mol	269.34 g/mol	330.88 g/mol
TPSA	20.23 Å <sup>2</sup>	37.30 Å <sup>2</sup>	52.82 Å <sup>2</sup>	21.47 Å <sup>2</sup>
HBD	1	1	2	0
pKa basic	-5.47	-6.07	0.57	-4.89
MPO score	3.83	4.33	3.50	5.05
LipMetE	3.187	3.554	5.389	0.555

\*CV (carvacrol) utilizado na predição como comparativo.

Ademais, foi possível observar que a baixa lipofilicidade do BSCu<sup>2+</sup>, dentro de uma faixa de MM < 350 g/mol, garante o melhor alinhamento entre permeabilidade e estabilidade metabólica (Figura 13), com eficiência lipofilicidade-metabolismo (LipMetE) calculado de 0.555 dentro do padrão de desirability (optimal LipMetE 0.0–2.5). Esta análise de QSAR corrobora com o teste preditivo de ADME, onde o ligante mostrou, ao mesmo tempo, alta permeabilidade ( $P_{app, A \rightarrow B} = 2.23 \times 10^{-5}$  cm/s) e baixa suscetibilidade a ser um substrato da P-gp, como um indicativo de maior permeabilidade do que efluxo passivo celular. Este resultado sugere que a complexação pode formar um análogo sintético de permeabilidade celular passiva semelhante ao CV (Tabela 2). Por outro lado, o composto BSCV teve a maior  $P_{app}$  passiva estimada ( $2.36 \times 10^{-5}$  cm/s), mas tende a ser um substrato da P-gp e apresentar maior efluxo passivo do que permeabilidade celular (Tabela 2), o que limita sua farmacocinética em relação do BSCu<sup>2+</sup> e ao próprio CV. As modificações estruturais no CV melhoraram o espectro de depuração, onde foi possível notar que os derivados sintéticos mostraram valores estimados de  $CL_{int,u} < 10$  mL/min/kg (Tabela 2), destacando a menor ordem de depuração prevista para o BSCu<sup>2+</sup> (0.81 mL/min/kg).

Figura 12 – Alinhamento entre MM e logD em pH 7.4 para previsão do alinhamento entre permeabilidade e estabilidade metabólica dos derivados do CV



Fonte: elaborada pelo autor.

Esta faixa de  $P_{app}$  garante uma biodisponibilidade de pelo menos 70% para os compostos (Tabela 2). No entanto, a natureza lipofílica dos ligantes resultaram em um  $VD > 3.0$  L/kg, para os compostos de maior MM (BSCV e BSCu<sup>2+</sup>), e  $< 3.0$  L/kg, para os compostos de menor MM (CV e CV aldeído) (Pires; Kaminskas; Ascher, 2018), indicando que os compostos BS modificados tendem a se distribuir largamente entre tecidos biológicos, incluindo a BBB, com concentrações estimadas de distribuição em torno de 35% da fração molecular biodisponível (Tabela 2).

Assim, o teste preditivo de ADME MPO-based mostrou que o BSCu<sup>2+</sup> possui um perfil farmacocinético mais favorável em função da baixa lipofilicidade relativa, o que lhe rendeu um alinhamento sistemático entre seus descritores de ADME dentro do sistema de classificação biofarmacêutica da Pfizer.

Tabela 2 – Descritores farmacocinéticos e metabolismo por isoformas de CYP450, previstos por teste consensual de ADME e toxicidade entre as bases de dados <sup>a</sup>ADMETlab, <sup>b</sup>ADMETboost, <sup>c</sup>pkCSM, <sup>d</sup>ProTox-II e <sup>e</sup>GUSAR Online.

Propriedade/moléculas	CV*	CV aldeído	BSCV	BSCu <sup>2+</sup>
P <sub>app</sub> , A→B <sup>a</sup>	2.34x10 <sup>-5</sup> cm/s	2.20x10 <sup>-5</sup> cm/s	2.36x10 <sup>-5</sup> cm/s	2.23x10 <sup>-5</sup> cm/s
P-gp efflux <sup>b</sup>	Não	Não	Sim	Não
F% <sup>c</sup>	76.19%	76.06%	73.97%	75.85%
VD <sup>c</sup>	2.3 L/kg	2.64 L/kg	3.33 L/kg	3.24 L/kg
BBB <sup>c</sup>	31.69%	36.89%	35.15%	35.42%
CYP1A2 substrate <sup>a</sup>	0.95	0.94	0.95	0.90
CYP2C9 substrate <sup>a</sup>	0.88	0.85	0.85	0.91
CYP2D6 substrate <sup>a</sup>	0.88	0.69	0.90	0.80
CYP3A4 substrate <sup>a</sup>	0.44	0.34	0.35	0.33
CL <sub>int,u</sub> <sup>a</sup>	11.33 mL/min/kg	2.63 mL/min/kg	1.53 mL/min/kg	0.81 mL/min/kg
logCL <sub>int,u</sub> <sup>b</sup>	0.24	0.22	0.20	1.49
DL <sub>50</sub> Oral <sup>d</sup>	810 mg/kg	810 mg/kg	3.500 mg/kg	2.450 mg/kg
DL <sub>50</sub> IP <sup>e</sup>	415.4 mg/kg	353.9 mg/kg	496.4 mg/kg	183.1 mg/kg
DL <sub>50</sub> IV <sup>e</sup>	68.31 mg/kg	44.24 mg/kg	33.96 mg/kg	44.8 mg/kg

\*CV (carvacrol) utilizado na predição como comparativo.

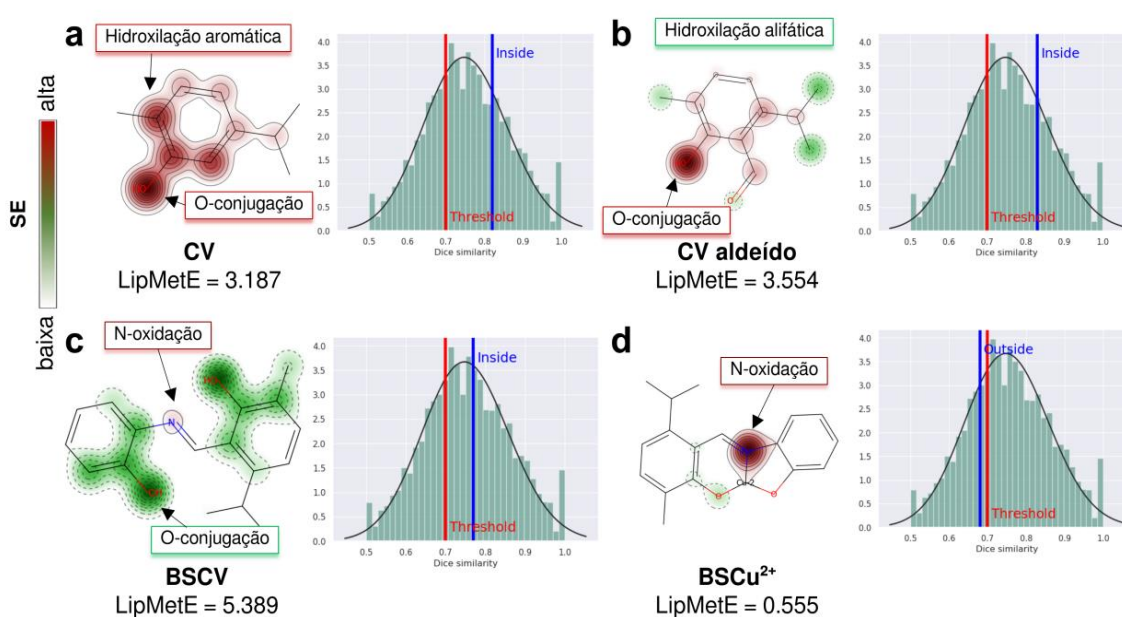
### 5.2.3 Predição do sítio de metabolismo e toxicidade aguda

A estabilidade metabólica pode ser mediada via predição do sítio de metabolismo, um teste que relaciona o grau de sensibilidade de pequenas moléculas a serem biotransformadas por isoformas de CYP450 a partir do nível de especificidade de grupos funcionais presentes na molécula (Zheng *et al.*, 2009). De forma geral, compostos que são altamente lipofílicos são menos resistentes ao metabolismo de fase I (mediado por CYP450), uma vez que estes processos de oxirredução visam tornar um fármaco mais polar e hidrossolúvel para excreção, fatores que afetam a estabilidade metabólica de pequenas moléculas (Kiani; Jabeen, 2020; Li *et al.*, 2011).

O mapa de suscetibilidade da Figura 13 é uma resposta gráfica da predição do sítio de metabolismo para os análogos sintéticos do CV. Neste teste, foi possível notar que a adição do aldeído torna o composto CV aldeído (Figura 13b) menos suscetível a epoxidação do anel aromático quando comparado ao CV (Figura 13a), sendo mais suscetível a hidroxilação alifática dependente de CYP450 (fase I), principalmente pelas isoformas CYP1A2 e CYP2C9 (Tabela 2), e O-conjugação dependente de metabolismo de fase II, embora seja metabolicamente menos

estável ( $LipMetE = 3.554$ ) em relação ao CV ( $LipMetE = 3.187$ ) pelo aumento dos sítios de metabolismo prováveis. A formação da Base de Shiffer tende a ser biotransformado por isoformas CYP1A2, CYP2C9 and CYP2D6 a partir de N-oxidação no metabolismo de fase I, mas apresentam sítios de conjugação em seus grupos -OH, concordando com a predição da menor estabilidade metabólica (*high* LipMetE). Por outro lado, o complexo  $BSCu^{2+}$  é metabolicamente mais estável (*low* LipMetE). A formação do  $R_3N^+$  resulta em um grupo altamente sensível ao metabolismo de fase I, constituindo o sítio de metabolismo mais provável do  $BSCu^{2+}$  (Figura 14d).

Figura 13 – Local de predição do metabolismo para o **a** carvacrol, e seus análogos, **b** CV aldeído, **c** BSCV e **d**  $BSCu^{2+}$



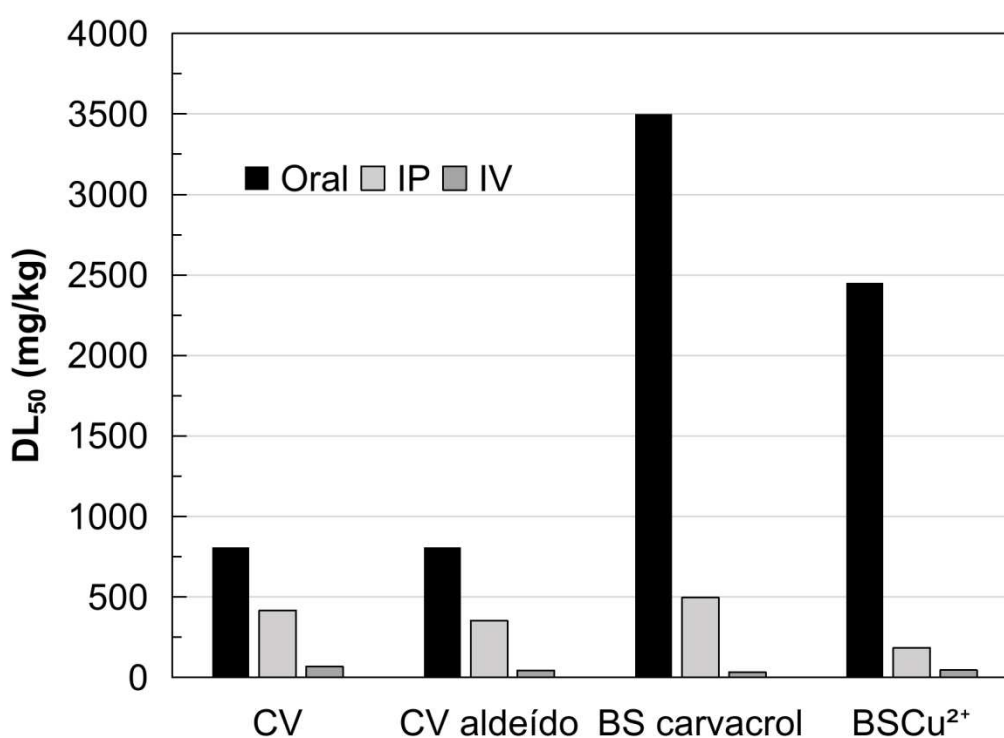
Fonte: elaborada pelo autor.

É curioso notar que a predição do sítio de metabolismo mostrou uma relação direta com a estimativa quantitativa da eficiência lipofilicidade-metabolismo ( $LipMetE$ ), onde foi possível notar que os ligantes CV aldeído e BSCV mostraram uma maior lipofilicidade em função do efeito HBD intramolecular, resultando em uma menor estabilidade metabólica para estes ligantes.

A estabilidade metabólica correlaciona-se diretamente com a predição de  $LD_{50}$ , expressa no gráfico da Figura 14. Aqui, o valor de  $LD_{50}$  previsto para o CV na ordem de 810 mg/kg

apresentou uma similaridade de 100% com o valor experimental de LD<sub>50</sub> do CV depositado na base de dados (Hagan *et al.*, 1967), evidenciando que a estimativa dos valores de LD<sub>50</sub> revelam a toxicidade oral dos análogos de CV com base nas modificações estruturais. O composto metabolicamente mais estável, isto é, BSCu<sup>2+</sup>, apresentou um valor de LD<sub>50</sub> previsto na ordem de 2.450 mg/kg, dentro de um intervalo de idealidade para um indicativo de baixa resposta tóxica por via oral (Gonella Diaza *et al.*, 2015). No entanto, é curioso observar que a descomplexação, ou seja, a formação da BSCV reduz a toxicidade aguda para um LD<sub>50</sub> na ordem de 3.500 mg/kg, constituindo um princípio ativo mais seguro em relação ao complexo metálico (BSCu<sup>2+</sup>). Em todo caso, substâncias com DL<sub>50</sub> superior a 2.000 mg/kg (via oral) nesse modelo podem ser consideradas seguras, na medida em que testes *in vivo* com doses > 2.000 mg/kg são desencorajados e só devem ser considerados quando houver uma forte probabilidade de que os resultados de tais testes tenham uma relevância direta para a proteção da saúde humana, animal ou ambiental (Chemicals, 2005).

Figura 14 – Comparação entre valores de LD<sub>50</sub> em *Rattus norvegicus* previstos para carvacrol (CV), e seus análogos CV aldeído, BSCV e BSCu<sup>2+</sup>, em diferentes vias de administração: oral, intraperitoneal (IP) e intravenoso (IV).



Fonte: elaborada pelo autor

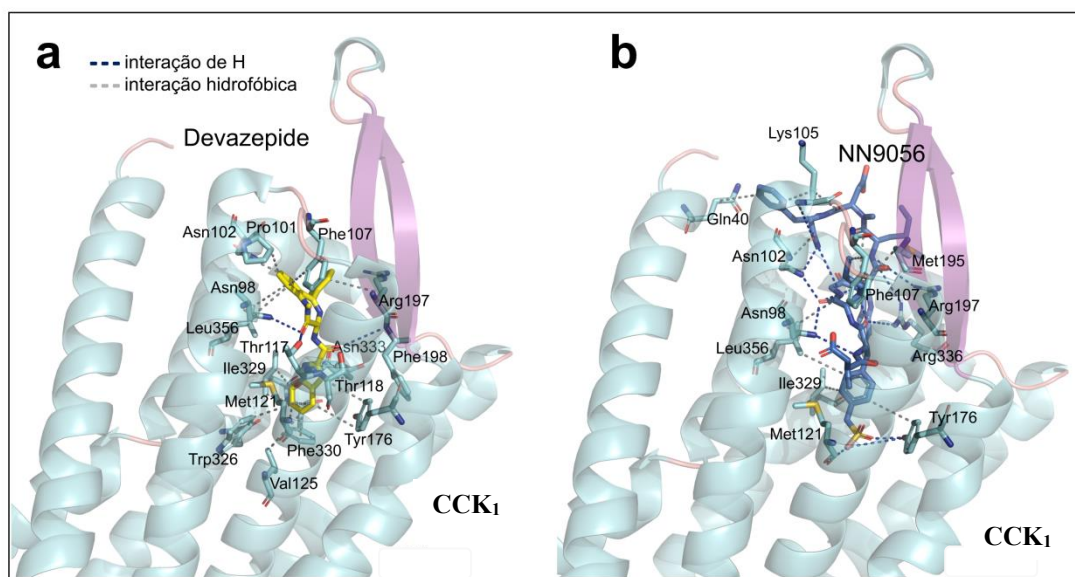
## 5.3 Simulações de *docking* molecular

### 5.3.1 Modulação do receptor *CCK<sub>1</sub>*

Após a série de simulações independentes do processo de *re-docking* com o antagonista Devazepida e o agonista NN9056, moduladores de *CCK<sub>1</sub>*, foi possível observar que os ligantes interagem com sítio alostérico acoplado à membrana celular que corresponde a estrutura cristalizada (Figura 15). O receptor *CCK<sub>1</sub>* está presente principalmente nos tecidos do sistema nervoso periférico ao SNC e em regiões discretas do córtex cerebral. A terapia baseada na descoberta de novos agonistas moduladores desses receptores está diretamente associada a uma regulação mais discreta de funções cerebrais (Jarończyk; Walory, 2022).

O antagonista Devazepida, com ajuste estatístico de encaixe dentro do ideal (RMSD < 2.0 Å) (Yusuf *et al.*, 2008), realiza interações de hidrogênio com o resíduo de Asn333 e Asn98, Thr117, principalmente através da sua estrutura heteroalifática de amida, e uma série de interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácido de cadeia lateral aromática, que incluem Phe107, Tyr176, Phe198, Trp326 e Phe330, com forte contribuição das suas subestruturas aromáticas de isoquinolina e anéis de benzeno ligadas ao anel heteroalifático (Figura 15a), indicando que novos agonistas do receptor *CCK<sub>1</sub>* competem pelo sítio de atividade do antagonista, que atua impedindo a ligação destes compostos. Quando avaliadas as interações do agonista NN9056, foi possível observar interações em comum com o benzodiazepínico, associado aos resíduos de Asn98, Phe107, Tyr176 e Arg197 (Figura 15b). Vale destacar que a extensão do peptídeo se liga ao sítio alostérico do receptor *CCK<sub>1</sub>* com um total de 6 interações de hidrogênio com distâncias < 3.0 Å, indicando uma maior força de interação ligante-receptor (Imberty *et al.*, 1991), com os resíduos de Asn98, Asn102, Asn102, Met121, Tyr176 e Arg336.

Figura 15 – Visualização tridimensional do encaixe do **a** antagonista devazepida e do **b** peptídeo agonista NN9056 moduladores do sítio alostérico do receptor CCK<sub>1</sub>.

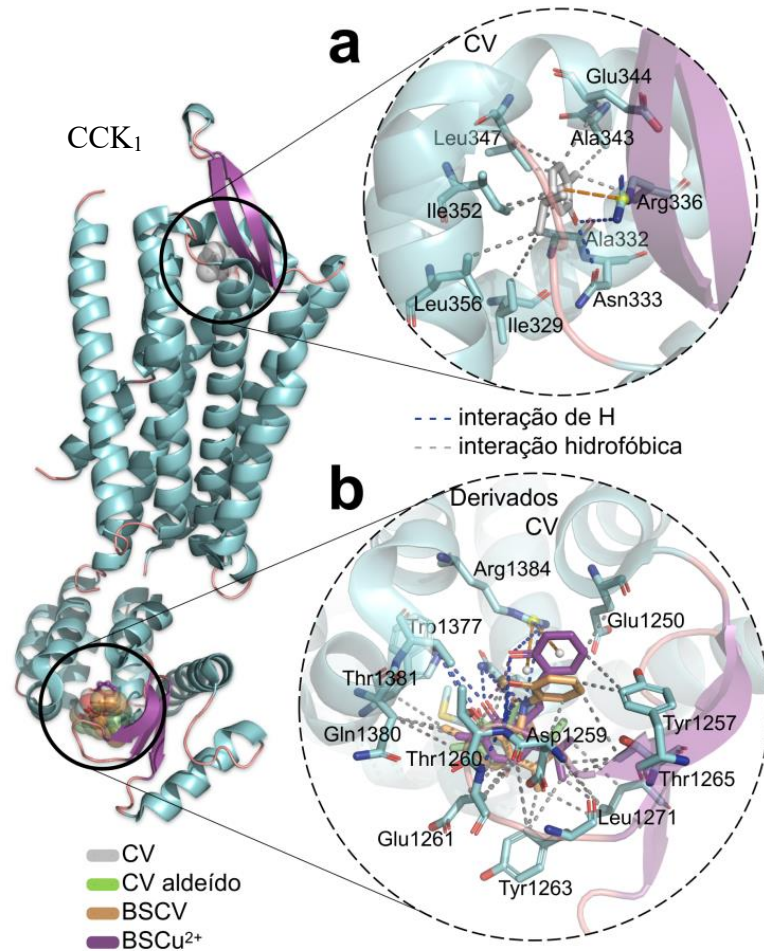


Fonte: elaborada pelo autor.

Ao fim do ciclo de 50 simulações independentes de 20 poses cada para cada um dos análogos do CV, foi possível observar que o ligante CV foi o único a interagir com resíduos do sítio de modulação alostérica em comum com o agonista (Figura 16a), que incluem Ile329 e Leu356, além de uma forte interação de hidrogênio com o resíduo de Asn333, com distância calculada de 2.18 Å, e uma interação  $\pi$ -cátion com o resíduo de Arg336, com distância calculada de 3.68 Å (Tabela 3), com uma ordem de energia livre calculada de -6.003 kcal/mol (Figura 17). Embora os análogos sigam uma melhor ordem de energia livre, dentro do intervalo ideal de  $\Delta G < -6.0$  kcal/mol (Shityakov; Foerster, 2014), com destaque para o complexo BSCu<sup>2+</sup> com energia livre calculada de -9.21 kcal/mol, são compostos que tendem a interagir com a proteína-G acoplada ao receptor CCK<sub>1</sub>, onde predominam interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos de cadeia lateral aromática de Tyr1257, Tyr1263 e Trp1377 e interações de hidrogênio com frações nitrogenadas dos resíduos de Thr1260, Glu1261 e Arg1384 (Figura 16b).

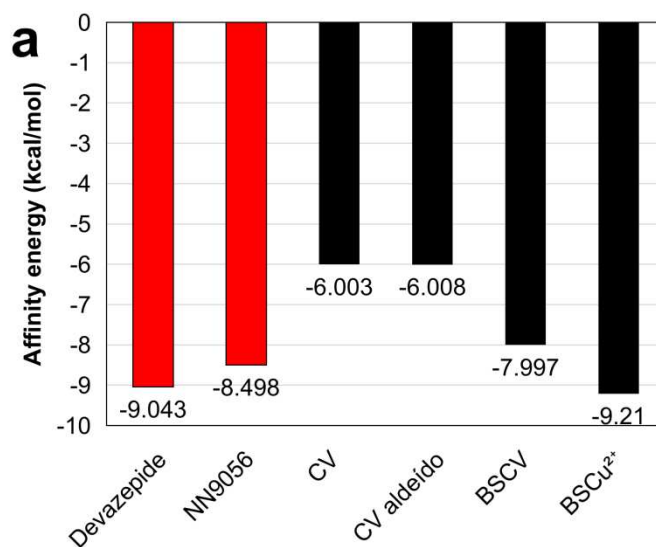


Figura 16 – Visualização tridimensional das interações dos ligantes **a** CV, **b** CV aldeído (verde), BSCV (laranja) e BSCu<sup>2+</sup> (roxo) para CCK<sub>1</sub>



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 17 – Gráfico de energia de afinidade dos ligantes ao fim das simulações de *docking* molecular frente ao receptor CCK<sub>1</sub>. As barras em vermelho indicam os ligantes, controle e as barras em preto são os análogos do CV



Fonte: elaborada pelo autor.

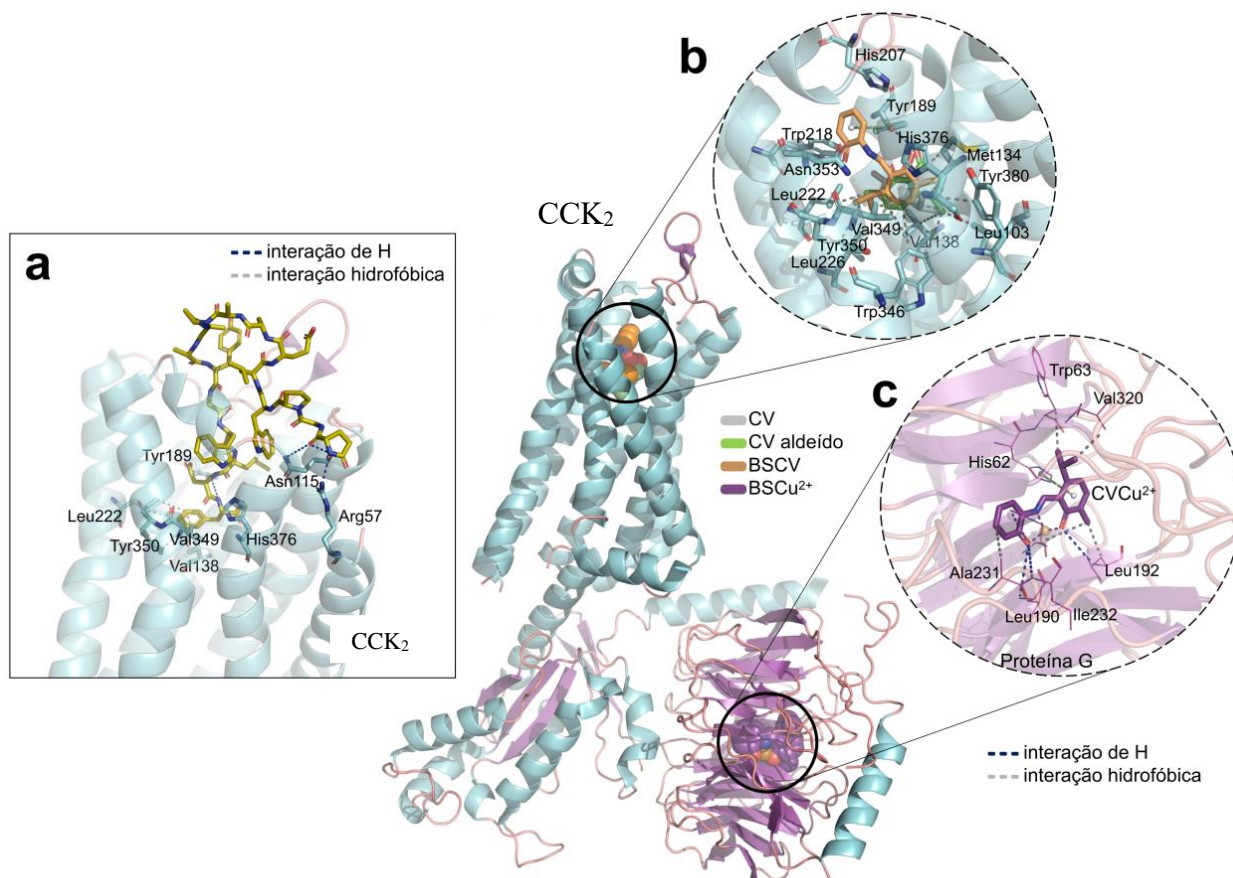
### 5.3.2 Modulação do receptor CCK<sub>2</sub>

Pertencente à classe dos receptores membranares acoplados à proteína G intracelular, os receptores CCK<sub>2</sub> são amplamente distribuídos no SNC e possuem uma forte correlação com o efeito nociceptivo. A terapia baseada na inibição deste alvo, apresentando um sítio receptor do peptídeo hormonal Gastrina, está fortemente relacionada a diminuição dos efeitos da dor crônica por doenças subjacentes e ao transtorno de ansiedade (Jarończyk; Walory, 2022; Kunamneni *et al.*, 2019). A estrutura proteica do CCK<sub>2</sub> foi cristalizada para a investigação de novos ligantes moduladores de seu mecanismo de ligação, empregando técnicas de modelagem molecular, como o *docking* molecular e o reconhecimento molecular, com o objetivo de elaborar novos fármacos antinociceptivos (Kunamneni *et al.*, 2023).

No processo de *re-docking* com o agonista peptídico hormonal Gastrin, foi possível notar que o ligante interage com os resíduos de aminoácido do sítio de ligação correspondente à estrutura cristalizada por microscopia eletrônica do receptor CCK<sub>2</sub>, que incluem interações essencialmente hidrofóbicas com aminoácidos de cadeia ramificada de Val138, Leu222 e Val349, caracterizadas como fracas pelas distâncias calculadas >3.6 Å, e com o resíduo aromático de Tyr350 (Figura 18a), além de interações de hidrogênio mais fortes com Arg57,

Asn115 e His376, com distâncias calculadas em torno de 2.4-3.1 Å (Tabela 3). Na análise do *docking* molecular envolvendo os análogos modificados de CV, foi possível observar que o CV aldeído e a BSCV mostraram interações em comum com o peptídeo associado aos resíduos de aminoácido Tyr189, Val138 e Leu222 (Figura 18b).

Figura 18 – Visualização tridimensional das interações do **a** agonista Gastrina e dos ligantes **b** CV (cinza), CV aldeído (verde), BSCV (laranja) e (c) BSCu<sup>2+</sup> (roxo) para CCK<sub>2</sub>.



Neste teste, o ligante BSCV obteve a menor ordem de  $\Delta G$  ao se ligar no sítio de ligação do receptor CCK<sub>2</sub>, inferindo a melhor energia de afinidade para formação do complexo BSCV-CCK<sub>2</sub>, com valor calculado de -7.275 kcal/mol (Figura 19), destacando interações de hidrogênio de força moderada com o grupo fenol da Tyr189 (3.52 Å) e com o grupo amida do Asn353 (2.70 Å) (Imberty *et al.*, 1991), e uma interação de empilhamento- $\pi$  perpendicular (em forma de T) entre o anel aromático do resíduo de Tyr189 com contribuição do fenol substituído do ligante, região de maior perfil hidropático (Figura 20). Aqui, apenas o complexo metálico BSCu<sup>2+</sup> interagiu com a proteína-G acoplada ao receptor (Figura 18c), embora que com a

melhor ordem de energia livre ( $\Delta G = -7.983$  kcal/mol) (Figura 19), constituindo o ligante menos promissor à modulação da atividade do receptor CCK<sub>2</sub> no SNC.

Figura 19 – Gráfico de energia de afinidade dos ligantes ao fim das simulações de *docking* molecular frente ao receptor CCK<sub>1</sub>. As barras em vermelho indicam os ligantes controles e as barras em preto são os análogos do carvacrol (CV)

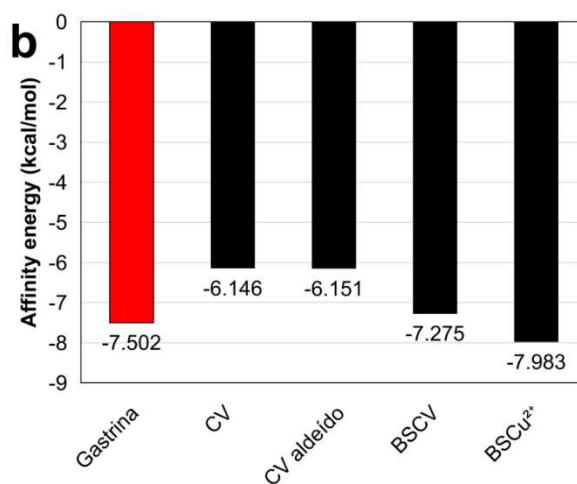
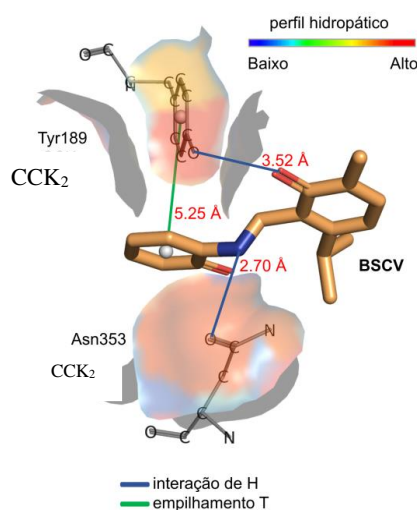


Figura 20 – Detalhes das interações em comum do ligante BSCV com o agonista Gastrina e perfil hidropático dos resíduos de aminoácido Tyr189 e Asn353.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 3 – Detalhes das interações entre os análogos de CV e os receptores CCK<sub>1</sub> e CCK<sub>2</sub> a partir de simulações de *docking* molecular

Alvo	Composto	RMSD (Å)	Interações				
			Tipo	Resíduo	Distância (Å)		
CCK <sub>1</sub>	Devazepide*	1.841	Hidrogênio	Asn98	2.58		
			Hidrogênio	Asn333	2.94		
			Hidrofóbica	Pro101	3.57		
			Hidrofóbica	Phe107	3.84		
			Hidrofóbica	Trp326	3.74		
			Hidrofóbica	Ile329	3.65		
			Hidrofóbica	Phe330	3.53		
			Hidrofóbica	Phe330	3.42		
	NN9056*	1.768	Hidrogênio	Asn98	2.65		
			Hidrogênio	Asn98	3.31		
			Hidrogênio	Asn102	2.11		
			Hidrogênio	Asn102	2.78		
			Hidrogênio	Met121	2.57		
			Hidrogênio	Tyr176	2.07		
			Hidrogênio	Arg336	2.99		
			Hidrogênio	Ser348	3.53		
			Hidrofóbica	Lys105	3.52		
			Hidrofóbica	Lys105	3.86		
			Hidrofóbica	Phe107	3.86		
			Hidrofóbica	Phe107	3.74		
			Hidrofóbica	Ile329	3.47		
			CV	0.904	Hidrogênio	Asn333	2.18
					$\pi$ -cátion	Arg336	3.68
					Hidrofóbica	Arg336	3.82
	Hidrofóbica	Ala343			3.51		
	Hidrofóbica	Leu347			3.40		
	Hidrofóbica	Ile352			3.44		
CV aldeído	1.507	Hidrofóbica	Asp1259	3.63			
		Hidrofóbica	Glu1261	3.82			
		Hidrofóbica	Thr1265	3.70			
		Hidrofóbica	Leu1271	3.58			
		Hidrofóbica	Gln1344	3.93			

			Hidrogênio	Thr1260	2.29
			Hidrogênio	Thr1260	2.40
			Hidrogênio	Gln1344	2.35
	BSCV	1.379	Hidrofóbica	Tyr1257	3.64
			Hidrofóbica	Tyr1263	3.53
			Hidrofóbica	Leu1271	3.72
			Hidrogênio	Thr1260	2.32
			Hidrogênio	Gln1344	2.95
	BSCu <sup>2+</sup>	1.503	Hidrogênio	Glu1250	3.69
			$\pi$ -cátion	Arg1384	5.58
			$\pi$ -cátion	Arg1384	5.26
			Hidrofóbica	Asp1259	3.85
			Hidrofóbica	Glu1261	3.72
			Hidrofóbica	Tyr1263	3.77
			Hidrofóbica	Thr1265	3.82
			Hidrofóbica	Leu1271	2.97
			Hidrofóbica	Gln1344	1.89
CCK <sub>2</sub>	Gastrina*	1.589	Hidrogênio	Arg57	2.43
			Hidrogênio	Asn115	3.14
			Hidrogênio	Tyr189	3.53
			Hidrogênio	His376	3.12
			Hidrofóbica	Val138	3.61
			Hidrofóbica	Val138	3.67
			Hidrofóbica	Leu222	3.63
			Hidrofóbica	Leu222	3.86
			Hidrofóbica	Val349	3.67
			Hidrofóbica	Tyr350	3.94
	CV	1.478	Hidrogênio	Tyr189	2.20
			Hidrofóbica	Leu103	3.54
			Hidrofóbica	Val138	3.83
			Hidrofóbica	Val138	3.48
			Hidrofóbica	Val138	3.99
			Hidrofóbica	Tyr189	3.89
			Hidrofóbica	Leu222	3.51
			Hidrofóbica	Trp346	3.44
			Hidrofóbica	Trp346	3.71

CV aldeído	1.267	Hidrogênio	Tyr189	2.63
		Hidrofóbica	Leu103	3.42
		Hidrofóbica	Val138	3.99
		Hidrofóbica	Val138	3.45
		Hidrofóbica	Leu222	3.36
		Hidrofóbica	Trp346	3.46
		Hidrofóbica	Trp346	3.75
		Hidrofóbica	Val349	3.51
BSCV	1.407	Hidrogênio	Tyr189	3.52
		Hidrogênio	Tyr189	3.45
		Hidrogênio	Asn353	2.70
		Empilhamento $\pi$	Tyr189	5.25
		Hidrofóbica	Trp218	3.67
		Hidrofóbica	Leu222	3.49
		Hidrofóbica	Trp346	3.84
		Hidrofóbica	Val349	3.64
BSCu <sup>2+</sup>	1.956	Hidrofóbica	Tyr380	3.98
		Empilhamento $\pi$	His62	4.52
		Hidrofóbica	Trp63	3.71
		Hidrofóbica	Leu192	3.72
		Hidrofóbica	Val320	3.56

---

\*Ligantes e controle utilizados como comparativo nas simulações de *docking* molecular.

## 6 CONCLUSÃO

A triagem virtual baseada na estrutura revelou que os análogos sintéticos do CV têm potencial promissor para tratar dor trigeminal, devido à sua semelhança estrutural com outros compostos que modulam os receptores CCK<sub>1</sub>, no sistema nervoso periférico, e CCK<sub>2</sub>, no SNC. Além disso, a análise ADME, com foco na MPO, indicou que essas substâncias têm uma ampla distribuição pelo SNC, especialmente a BSCu<sup>2+</sup>, a qual apresentou uma correlação mais favorável entre as propriedades farmacocinéticas e a segurança da atividade no SNC. No entanto, é importante considerar que a BSCV possui alta permeabilidade passiva e um alto volume de distribuição no cérebro. Apesar disso, esse ligante também demonstrou uma interação farmacodinâmica mais positiva com o receptor CCK<sub>2</sub>, tornando-o promissor para o tratamento da dor crônica.

A partir dos dados obtidos, podemos concluir que os análogos sintéticos do carvacrol, BSCu<sup>2+</sup> e BSCV, potenciais antagonistas em receptores CCK<sub>2</sub> presentes nos neurônios dos gânglios trigeminal e espinhal, podem competir com a CCK, potencializando, indiretamente, o efeito de opioides no controle da dor trigeminal.

Os resultados obtidos *in silico* abrem novas perspectivas para a compreensão dos possíveis mecanismos de ação dos análogos do carvacrol sobre a modulação da dor trigeminal. Sob a ótica da investigação médico-translacional, este trabalho reforça a importância de estudos dessa natureza como etapa inicial e fundamental da fase pré-clínica, lançando luz para investigações subsequentes *in vitro* e *in vivo* que substanciem a hipótese enunciada.



## REFERÊNCIAS

ALI, Tabasum *et al.* Recent advances in the pharmacological properties and molecular mechanisms of carvacrol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 34, n. 1, p. 35-47, 2024.

AL-QULITI, Khalid W. Update on neuropathic pain treatment for trigeminal neuralgia: The pharmacological and surgical options. **Neurosciences Journal**, v. 20, n. 2, p. 107-114, 2015.

ANDERSEN, Alan. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. **International Journal of Toxicology**, v. 25, p. 29-127, 2006.

ANDRE, Weibson Paz Pinheiro *et al.* Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 52-58, 2016.

AUSTGULEN, Liv-Torill; SOLHEIM, Einar; SCHELIN, Ronald R. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. **Pharmacology & Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 98-102, 1987.

BADEL, Tomislav *et al.* Orofacijalna bol: dijagnostički i terapijski izazovi. **Acta Clinica Croatica**, v. 58, n. Supplement 1, p. 82-89, 2019.

BANSAL, Anu *et al.* Synthesis of carvacrol derivatives as potential new anticancer agent against lung cancer. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4597, 2022.

BANSAL, Anu; KAUSHIK, Vikas; SHARMA, Neeta Raj. Synthesis and in silico anti-metastatic evaluation of carvacrol derivative, 2-hydroxy-6-isopropyl-3-methylbenzaldehyde. **Materials Today: Proceedings**, v. 57, p. 739-747, 2022.

BAYIR, Ayse Gunes; KIZILTAN, Huriye Senay; KOCYIGIT, Abdurrahim. Plant family, carvacrol, and putative protection in gastric cancer. In: **Dietary interventions in gastrointestinal diseases**. Academic Press, 2019. p. 3-18.

BENDTSEN, Lars *et al.* Advances in diagnosis, classification, pathophysiology, and management of trigeminal neuralgia. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 9, p. 784-796, 2020.

BENNETT, David L. *et al.* The role of voltage-gated sodium channels in pain signaling. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1079-1151, 2019.

BISTA, Pawan; IMLACH, Wendy L. Pathological mechanisms and therapeutic targets for trigeminal neuropathic pain. **Medicines**, v. 6, n. 3, p. 91, 2019.

BORBA, Joyce VB *et al.* STopTox: An *in silico* alternative to animal testing for acute systemic and topical toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 130, n. 2, p. 027012, 2022.

CAN BASER, K. H. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 29, p. 3106-3119, 2008.

CARNEIRO, Ana Luiza Chrominski; COMARELLA, Larissa. Principais interações entre plantas medicinais e medicamentos. *Revista Saúde e desenvolvimento*, v. 9, n. 5, p. 4-19, 2016.

CHAI, Bryan *et al.* Trigeminal-rostral ventromedial medulla circuitry is involved in orofacial hyperalgesia contralateral to tissue injury. **Molecular Pain**, v. 8, p. 1744-8069-8-78, 2012.

CHANG, Fang-Lin *et al.* Repeated peripheral nerve blocks by the co-administration of ketamine, morphine, and bupivacaine attenuate trigeminal neuralgia. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 50, n. 2, p. 201-202, 2003.

CHEMICALS, D. O. F. O. OECD Guideline for testing of chemicals. The Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris, France, p. 1-13, 2005.

CHERY-CROZE, S. *et al.* Substance P-, somatostatin-, vasoactive intestinal peptide-and cholecystokinin-like levels in the spinal cord of polyarthritic rats. **Brain Research**, v. 339, n. 1, p. 183-185, 1985.

CONNELLY, S. Thaddeus; SCHMIDT, Brian L. Evaluation of pain in patients with oral squamous cell carcinoma. **The Journal of Pain**, v. 5, n. 9, p. 505-510, 2004.

CRAMER, John D.; BURTNESSE, Barbara; FERRIS, Robert L. Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions. **Oral Oncology**, v. 99, p. 104460, 2019.

CUMMINS, Theodore R.; SHEETS, Patrick L.; WAXMAN, Stephen G. The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of pain. **Pain**, v. 131, n. 3, p. 243-257, 2007.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W357-W364, 2019.

DALSGAARD, C.-J. *et al.* Coexistence of cholecystokinin-and substance P-like peptides in neurons of the dorsal root ganglia of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 33, n. 2, p. 159-161, 1982.

DANIEL, Filipe Ivan *et al.* Carcinoma de células escamosas em rebordo alveolar inferior: diagnóstico e tratamento odontológico de suporte. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 279-283, 2006.

DE ALVARENGA, José Fernando Rinaldi *et al.* Monoterpenes: current knowledge on food source, metabolism, and health effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 10, p. 1352-1389, 2023.

DE PAULA SANTOS, Leticia *et al.* Manejo seguro de opioides usados no cuidado paliativo: revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 6, p. e7665-e7665, 2021.

DE VINCENZI, M. *et al.* Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 801-804, 2004.

DOWELL, Deborah; HAEGERICH, Tamara M.; CHOU, Roger. CDC guideline for prescribing opioids for chronic pain—United States, 2016. **Jama**, v. 315, n. 15, p. 1624-1645, 2016.

DUAN, Lu-Lu *et al.* Spinal CCK contributes to somatic hyperalgesia induced by orofacial inflammation combined with stress in adult female rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 913, p. 174619, 2021.

EPSTEIN, Joel B.; MIASKOWSKI, Christine. Oral pain in the cancer patient. **JNCI Monographs**, v. 2019, n. 53, p. 1gz003, 2019.

ERIKSSON, Jonas *et al.* Behavioral changes and trigeminal ganglion sodium channel regulation in an orofacial neuropathic pain model. **Pain**, v. 119, n. 1-3, p. 82-94, 2005.

FORNASARI, Diego. Pain mechanisms in patients with chronic pain. **Clinical Drug Investigation**, v. 32, p. 45-52, 2012.

FRIEDMAN, Mendel. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 31, p. 7652-7670, 2014.

GAMBETA, Eder; CHICHORRO, Juliana G.; ZAMPONI, Gerald W. Trigeminal neuralgia: An overview from pathophysiology to pharmacological treatments. **Molecular Pain**, v. 16, p. 1744806920901890, 2020.

GANDOVA, Vanya *et al.* Physicochemical and biological properties of carvacrol. **Open Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 20220319, 2023.

GANGADHARAN, Vijayan; KUNER, Rohini. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 4, p. 889-895, 2013.

GHILARDI, Joseph R. *et al.* Trigeminal and dorsal root ganglion neurons express CCK receptor binding sites in the rat, rabbit, and monkey: possible site of opiate-CCK analgesic interactions. **Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 4854-4866, 1992.

GHOLAMI-AHANGARAN, Majid *et al.* Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 1, p. 267-288, 2022.

GOELLNER, Eduardo; ROCHA, Carlos Eduardo. Anatomy of trigeminal neuromodulation targets: from periphery to the brain. **Neuromodulation for Facial Pain**, v. 35, p. 18-34, 2020.

GONELLA DIAZA, Rodolfo *et al.* Comparison of in silico tools for evaluating rat oral acute toxicity. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 26, n. 1, p. 1-27, 2015.

GRANGER, Patrick *et al.* Modulation of the gamma-aminobutyric acid type A receptor by the antiepileptic drugs carbamazepine and phenytoin. **Molecular Pharmacology**, v. 47, n. 6, p. 1189-1196, 1995.

GREGORY, Richard Arman. Recent advances in the physiology of gastrin. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 170, n. 1018, p. 81-88, 1968.

GROSSINI, Elena *et al.* CCK receptors-related signaling involved in nitric oxide production caused by gastrin 17 in porcine coronary endothelial cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 350, n. 1, p. 20-30, 2012.

GROSSMANN, Eduardo; SIQUEIRA, José Tadeu Tesserolli de; SIQUEIRA, Silvia Regina Dowgan Tesseroli de. Orofacial neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 75-78, 2016.

GUEDES, Cizelene do Carmo Faleiros Veloso; SANTANA, Romênia Costa; LELES, Ana Clara. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura. **Scientia Generalis**, v. 2, n. 2, p. 165-176, 2021.

GUERRA, M. P; NODARI, R.O. Farmacognosia da planta ao medicamento. Ed UFRGS/Ed. UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, Cap. I, p.14, 2003.

GUERRERO, Andre V. *et al.* Peripheral cannabinoids attenuate carcinoma-induced nociception in mice. **Neuroscience Letters**, v. 433, n. 2, p. 77-81, 2008.

GUIMARÃES, Adriana G. *et al.* Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.

GUIMARÃES, Adriana G. *et al.* Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, p. 253-263, 2012.

GUNES-BAYIR, Ayse *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effects of carvacrol on N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) induced gastric carcinogenesis in Wistar rats. **Nutrients**, v. 14, n. 14, p. 2848, 2022.

GURIB-FAKIM, Ameenah. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

GÜVENÇ, Mehmet *et al.* Effects of thymol and carvacrol on sperm quality and oxidant/antioxidant balance in rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 125, n. 5, p. 396-403, 2019.

HAGAN, E. C. *et al.* Food flavourings and compounds of related structure. II. Subacute and chronic toxicity. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 5, p. 141-157, 1967.

HECHLER, Benjamin *et al.* Are oral pain and otalgia predictive of perineural invasion in squamous cell carcinoma of the oral tongue?. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 78, n. 8, p. 1418-1426, 2020.

HERRERA-CALDERON, Oscar *et al.* Carvacrol: an in silico approach of a candidate drug on HER2, PI3K $\alpha$ , mTOR, hER- $\alpha$ , PR, and EGFR receptors in the breast cancer. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.

HORISHITA, Takafumi *et al.* Carvacrol inhibits the neuronal voltage-gated sodium channels Nav1. 2, Nav1. 6, Nav1. 3, Nav1. 7, and Nav1. 8 expressed in *Xenopus* oocytes with different potencies. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 142, n. 4, p. 140-147, 2020.

HUGHES, Jason D. *et al.* Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 17, p. 4872-4875, 2008.

IMBERTY, Anne *et al.* Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631-642, 1991.

Instituto Nacional do Câncer. Estimate/2023– **Cancer Incidence in Brazil**. Inca 2022. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

International Association for the Study of Pain. Task Force on Taxonomy. IASP Terminology. 2020. Disponível em: <http://web.archive.org/web/20200130092932/https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698>. Acesso em: 02 Abril 2024.

JAROŃCZYK, Małgorzata; WALORY, Jarosław. Novel molecular targets of antidepressants. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 533, 2022.

JI, Yaping; MURPHY, Anne Z.; TRAUB, Richard J. Estrogen modulates the visceromotor reflex and responses of spinal dorsal horn neurons to colorectal stimulation in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 9, p. 3908-3915, 2003.

JOCA, Humberto Cavalcante *et al.* Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 9, p. 1511-1517, 2012.

JOHNSON, Ted W.; DRESS, Klaus R.; EDWARDS, Martin. Using the Golden Triangle to optimize clearance and oral absorption. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 19, p. 5560-5564, 2009.

KIANI, Yusra Sajid; JABEEN, Ishrat. Lipophilic metabolic efficiency (LipMetE) and drug efficiency indices to explore the metabolic properties of the substrates of selected cytochrome P450 isoforms. **ACS Omega**, v. 5, n. 1, p. 179-188, 2019.

KIKKERI, Nidhi Shankar; NAGALLI, Shivaraj. Trigeminal neuralgia. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022.

KUMAR, Shivani; KUMAR, Suresh. Molecular docking: a structure-based approach for drug repurposing. In: **In Silico Drug Design**. Academic Press, 2019. p. 161-189.

KUNAMNENI, Adinarayana *et al.* Generating highly potent and efficacious antibodies to the cholecystinin B (CCK-B) receptor by ribosome display for the treatment of neuropathic pain. **The FASEB Journal**, v. 33, n. S1, p. lb31-lb31, 2019.

KUNAMNENI, Adinarayana *et al.* Rapid Generation and Molecular Docking Analysis of Single-Chain Fragment Variable (scFv) Antibody Selected by Ribosome Display Targeting Cholecystinin B Receptor (CCK-BR) for Reduction of Chronic Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11035, 2023.

LAVIGNE, Justin E.; ALLES, Sascha RA. CCK2 receptors in chronic pain. **Neurobiology of Pain**, v. 11, p. 100092, 2022.

LEE, Chai-Jin *et al.* In silico experiment system for testing hypothesis on gene functions using three condition specific biological networks. **Methods**, v. 145, p. 10-15, 2018.

LEELANANDA, Sumudu P.; LINDERT, Steffen. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 2694-2718, 2016.

LEONCINI, Emanuele *et al.* Adult height and head and neck cancer: a pooled analysis within the INHANCE Consortium. **European Journal of Epidemiology**, v. 29, p. 35-48, 2014.

LI, Hongjian *et al.* Machine-learning scoring functions for structure-based virtual screening. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 11, n. 1, p. e1478, 2021.



LI, Yi *et al.* Bioactivities of berberine metabolites after transformation through CYP450 isoenzymes. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 1-10, 2011.

LIAO, Wen-Tzu *et al.* Early high-frequency spinal cord stimulation treatment inhibited the activation of spinal mitogen-activated protein kinases and ameliorated spared nerve injury-induced neuropathic pain in rats. **Neuroscience Letters**, v. 721, p. 134763, 2020.

LIBREROS-JIMÉNEZ, Hugo M. *et al.* On the Cranial Nerves. **NeuroSci**, v. 5, n. 1, p. 8-38, 2023.

LIN, Xiaoqian; LI, Xiu; LIN, Xubo. A review on applications of computational methods in drug screening and design. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1375, 2020.

LIPINSKI, Christopher A. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

LIU, Qiufeng *et al.* Ligand recognition and G-protein coupling selectivity of cholecystokinin A receptor. **Nature Chemical Biology**, v. 17, n. 12, p. 1238-1244, 2021.

LUNA, Eloá Borges *et al.* Aspectos anatômicos e patológicos da neuralgia do trigêmeo: uma revisão da literatura para estudantes e profissionais da saúde. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, p. 661-674, 2010.

MA, Xiao-lei; CHEN, Cheng; YANG, Jie. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 4, p. 500-512, 2005.

MADDEN, Judith C. *et al.* A review of in silico tools as alternatives to animal testing: principles, resources and applications. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 48, n. 4, p. 146-172, 2020.

MAO, Jia-Ding *et al.* Role of ERK-MAPK signaling pathway in pentagastrin-regulated growth of large intestinal carcinoma. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 35, p. 12542, 2014.

MARINHO, Emanuelle Machado *et al.* Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104365, 2020.

MATOS, Maria Geysillene Castro *et al.* Quantum mechanical, molecular docking, molecular dynamics, ADMET and antiproliferative activity on *Trypanosoma cruzi* (Y strain) of chalcone (E)-1-(2-hydroxy-3, 4, 6-trimethoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl) prop-2-en-1-one derived from a natural product. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 24, n. 8, p. 5052-5069, 2022.

MCNICOL, Ewan D.; MIDBARI, Ayelet; EISENBERG, Elon. Opioids for neuropathic pain. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, 2013.

MENDES, Francisco Rogênio Silva *et al.* GABAA and serotonergic receptors participation in anxiolytic effect of chalcones in adult zebrafish. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 21, p. 12426-12444, 2023.

MITCHELL, Jennifer M. *et al.* Cholecystokinin is necessary for the expression of morphine conditioned place preference. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 787-795, 2006.

MOHEBBATI, Reza *et al.* *Zataria multiflora* and its main ingredient, carvacrol, affect on the renal function, histopathological, biochemical and antioxidant parameters in adriamycin-induced nephrotic rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 127, n. 5, p. 453-461, 2021.

MORETE, Márcia Carla; MINSON, Fabíola Peixoto. Instrumentos para a avaliação da dor em pacientes oncológicos. **Revista Dor**, v. 11, n. 1, 2010.

MORRIS, Garrett M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785-2791, 2009.

OBERHAUSER, Nils; NURISSO, Alessandra; CARRUPT, Pierre-Alain. MLP Tools: a PyMOL plugin for using the molecular lipophilicity potential in computer-aided drug design. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 28, p. 587-596, 2014.

OKADA, Shinji *et al.* Differential activation of ascending noxious pathways associated with trigeminal nerve injury. **Pain**, v. 160, n. 6, p. 1342-1360, 2019.

OLIVEIRA, Janaine P. *et al.* Natural products for orofacial nociception in pre-clinical studies: A systematic review. **Archives of Oral Biology**, v. 117, p. 104748, 2020.

PETTERSEN, Eric F. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PETTERSSON, Martin *et al.* Quantitative assessment of the impact of fluorine substitution on P-glycoprotein (P-gp) mediated efflux, permeability, lipophilicity, and metabolic stability. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 11, p. 5284-5296, 2016.

PINTO, Maria João *et al.* Treatment of acute exacerbations of trigeminal neuralgia in the emergency department: A retrospective case series. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 62, n. 8, p. 1002-1006, 2022.

PIRES, Douglas EV; KAMINSKAS, Lisa M.; ASCHER, David B. Prediction and optimization of pharmacokinetic and toxicity properties of the ligand. **Computational Drug Discovery and Design**, p. 271-284, 2018.

RAO, Shyam D. *et al.* Dose-volume factors correlating with trismus following chemoradiation for head and neck cancer. **Acta Oncologica**, v. 55, n. 1, p. 99-104, 2016.

RIVERA, Guillermo. Trigeminal nerve: essential aspects from the biomedical sciences. **Revista Estomatología**, v. 19, n. 2, 2011.

ROMERO-REYES, Marcela; SALVEMINI, Daniela. Cancer and orofacial pain. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 21, n. 6, p. e665, 2016.

SAMPAIO, Laeza Alves *et al.* Antitumor effects of carvacrol and thymol: a systematic review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 702487, 2021.

SARAN, Anukriti *et al.* Exploring Multifaceted Applications of Bioinformatics: An Overview. **Bioinformatics and Computational Biology**, p. 313-326, 2023.

SCHEFF, Nicole N. *et al.* Tumor necrosis factor alpha secreted from oral squamous cell carcinoma contributes to cancer pain and associated inflammation. **Pain**, v. 158, n. 12, p. 2396-2409, 2017.

SCHESTATSKY, Pedro; NASCIMENTO, Osvaldo José M. What do general neurologists need to know about neuropathic pain? **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 67, p. 741-749, 2009.

SCHMIDT, Brian L. The neurobiology of cancer pain. **The Neuroscientist**, v. 20, n. 5, p. 546-562, 2014.

SHITYAKOV, Sergey; FÖRSTER, Carola. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, p. 23-36, 2014.

STEIN, Christoph. Opioid receptors. **Annual Review of Medicine**, v. 67, n. 1, p. 433-451, 2016.

SIQUEIRA, José Tadeu Tesseroli. As dores orofaciais na prática hospitalar: experiência brasileira. **Prática Hospitalar**, v. 48, n. 6, p. 85-9, 2006.

SIQUEIRA, Fernanda Nathaly Dos Santos *et al.* Análise in sílico da interação de uma molécula esteróide isolada da secreção paratoide de bufonídeos com o receptor nicotínico do subtipo alfa 7 visando desenvolvimento de fármacos analgésicos. **Reunião Científica**, n. XV, 2024.

SISTO, Francesca *et al.* Synthesis and biological evaluation of carvacrol-based derivatives as dual inhibitors of *H. pylori* strains and AGS cell proliferation. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 405, 2020.

ŠKLEBAR, Duška *et al.* Neuropathic orofacial pain—diagnostic and therapeutic

challenges. **Periodicum biologorum**, v. 117, n. 2, p. 231-237, 2015.

STEPAN, Antonia F. *et al.* Evaluating the differences in cycloalkyl ether metabolism using the design parameter “lipophilic metabolism efficiency” (LipMetE) and a matched molecular pairs analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 6985-6990, 2013.

SUNTRES, Zacharias E.; COCCIMIGLIO, John; ALIPOUR, Misagh. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304-318, 2015.

SYKUŁA, Anna *et al.* Spectroscopic characterization and biological activity of Hesperetin Schiff bases and their Cu (II) complexes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 761, 2023.

TANAKA, Brian S. *et al.* A gain-of-function mutation in Nav1. 6 in a case of trigeminal neuralgia. **Molecular Medicine**, v. 22, p. 338-348, 2016.

TANIGUCHI, Kuniyoshi *et al.* Changes in nerve fibers adjacent to transplanted VX2 carcinoma in rabbit tongue. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 24, n. 1, p. 37-41, 1995.

TERRY, R. *et al.* The effectiveness of ginger in the treatment of chronic pain—a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Pain Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1808-1818, 2011.

THOMAZ, Adriana. Dor oncológica: conceitualização e tratamento farmacológico. **Revista Onco**, v. 7, p. 24-29, 2010.

TORTORA, Gerard J.; DERRICKSON, Bryan. **Corpo Humano-: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. Artmed Editora, 2016.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TWAIJ, Baan Munim; HASAN, Md Nazmul. Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. **International Journal of Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 4-14, 2022.

VANDERHAEGHEN, Jean-Jacques; SIGNEAU, J. C.; GEPTS, Willy. New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. **Nature**, v. 257, n. 5527, p. 604-605, 1975.

VICECONTI, Marco *et al.* Possible contexts of use for in silico trials methodologies: a consensus-based review. **IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics**, v. 25, n. 10, p. 3977-3982, 2021.

VILARIM, Rita de Cassia Bonato *et al.* Characteristics and prevalence of orofacial pain as an initial symptom of oral and oropharyngeal cancer and its impact on the patient's functionality and quality of life. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 134, n. 4, p. 457-464, 2022.

VLACHOJANNIS, J.; MAGORA, F.; CHRUBASIK, S. Willow species and aspirin: different mechanism of actions. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 7, p. 1102-1104, 2011.

VUCICEVIC, Jelica; NIKOLIC, Katarina; MITCHELL, John BO. Rational drug design of antineoplastic agents using 3D-QSAR, cheminformatic, and virtual screening approaches. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 21, p. 3874-3889, 2019.

WAGER, Travis T. *et al.* Central nervous system multiparameter optimization desirability: application in drug discovery. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 767-775, 2016.

WAGER, Travis T. *et al.* Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n. 6, p. 435-449, 2010.

WALKER, H. Kenneth. Cranial nerve V: the trigeminal nerve. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. 3rd edition, 1990.

WANG, J.; REN, M.; HAN, J.. Mobilization of calcium from intracellular stores as one of the mechanisms underlying the antiopioid effect of cholecystokinin octapeptide. **Peptides**, v. 13, n. 5, p. 947-951, 1992.

WANG, X. J. *et al.* Cholecystokinin-8 suppressed 3H-etorphine binding to rat brain opiate receptors. **Life Sciences**, v. 45, n. 2, p. 117-123, 1989.

WANG, X.J.; HAN, J.S. Modification by Cholecystokinin Octapeptide of the Binding of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and K-Opioid Receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, n. 4, p. 1379-1382, 1990.

WANG, Zhe *et al.* Combined strategies in structure-based virtual screening. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 6, p. 3149-3159, 2020.

WIESENFELD-HALLIN, Zsuzsanna *et al.* Cholecystokinin/opioid interactions. **Brain Research**, v. 848, n. 1-2, p. 78-89, 1999.

WILLIAMS, P. L *et al.* Anatomia. 37 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 809-1174, v. 2, 1995.

YANG, Andrew I. *et al.* Patterns of opioid use in patients with trigeminal neuralgia undergoing neurosurgery. **Journal of Neurosurgery**, v. 131, n. 6, p. 1805-1811, 2019.

YANG, Yin *et al.* Heteromerization of  $\mu$ -opioid receptor and cholecystokinin B receptor through the third transmembrane domain of the  $\mu$ -opioid receptor contributes to the anti-opioid effects of cholecystokinin octapeptide. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 5, p. 1-16, 2018.

YE, Yi *et al.* Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1667-1676, 2011.

YUSUF, Dilmurat *et al.* An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411-1422, 2008.

ZAKRZEWSKA, Joanna M. *et al.* Characterizing treatment utilization patterns for trigeminal neuralgia in the United States. **The Clinical Journal of Pain**, v. 34, n. 8, p. 691-699, 2018.

ZAKRZEWSKA, Joanna M. *et al.* Evaluating the impact of trigeminal neuralgia. **Pain**, v. 158, n. 6, p. 1166-1174, 2017.

ZHANG, Xuefeng *et al.* Structures of the human cholecystokinin receptors bound to agonists and antagonists. **Nature Chemical Biology**, v. 17, n. 12, p. 1230-1237, 2021.

ZHENG, Mingyue *et al.* Site of metabolism prediction for six biotransformations mediated by cytochromes P450. **Bioinformatics**, v. 25, n. 10, p. 1251-1258, 2009.