



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**DUARAN LOPES DE SOUSA**

**EFEITO PROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE CYMBOPOGON CITRATUS NA  
INJÚRIA DE CÉLULAS RENAIIS INDUZIDAS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO:  
ESTUDO *IN VITRO* E *IN SILICO***

**FORTALEZA**

**2021**

DUARAN LOPES DE SOUSA

**EFEITO PROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE CYMBOPOGON CITRATUS NA  
INJÚRIA DE CÉLULAS RENAS INDUZIDAS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO:  
ESTUDO *IN VITRO* E *IN SILICO***

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio

**FORTALEZA**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D32e de Sousa, Duaran Lopes de.  
Efeito protetor do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na injúria de células renais induzidas por isquemia e reperfusão : Estudo in vitro e in silico / Duaran Lopes de de Sousa. – 2021.  
93 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins.  
Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.
1. Lesão renal aguda. 2. Monoterpenos. 3. Proteína Nrf2. 4. Proteínas c-Raf. I. Título.
- CDD 615.1
-

**DUARAN LOPES DE SOUSA**

**EFEITO PROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE CYMBOPOGON CITRATUS NA  
INJÚRIA DE CÉLULAS RENAS INDUZIDAS POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO:  
ESTUDO *IN VITRO* E *IN SILICO***

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Alice Maria Costa Martins

---

Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge

---

Dra. Marcia Machado Marinho

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por me permitir viver esse momento de glória com saúde e disposição apesar de todos os contratemplos que surgiram durante essa pandemia. Agradeço ao corpo de docentes da UFC-CE, principalmente minha orientadora, professora Dra. Alice Maria Costa Martins e meu coorientador, professor Dr. Tiago Lima Sampaio por toda dedicação e tempo disponibilizado para me ajudar concluir esse trabalho. Agradeço a todos que fazem parte do laboratório LBFBC e que contribuíram direto ou indiretamente nesse estudo. Agradeço a Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira, referência em farmácia vivas, por acreditar nesse trabalho. Por fim agradeço ao meu pai, Jose Euicio de Sousa, minha mãe, Edileusa Francisca da Silva, meus irmãos, Donaldt Lopes de Sousa, David Lopes de Sousa e minha noiva, Marianne Aragão Cutrim, por todo amor incondicional e apoio durante esses momentos difíceis. Muito Obrigado a todos!

## RESUMO

### **Efeito Protetor do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na injúria de células renais induzidas por isquemia e reperfusão: Estudo *in vitro* e *in silico***

A injúria renal por isquemia e reperfusão (I/R) é uma das principais causas de lesão renal aguda (LRA) com progressão relacionada ao dano oxidativo, inflamação e morte celular, principalmente de células tubulares. Diferentes vias de sinalização estão envolvidas nesse processo, como as vias de transcrição Ras/Raf1/ERK e Nrf2-Keap1. Neste sentido, diversas estratégias antioxidantes têm sido estudadas para prevenir ou minimizar os danos ocasionados pela I/R. O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* possui como componente majoritário o citral, formado por isômeros geométricos: trans-geranial e cis-neral que são descritos por apresentar atividade anti-inflamatória, antioxidante e potencial de modular as vias de transcrição citadas. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito citoprotetor do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre células tubulares proximais da linhagem LCC-MK2 em um modelo de I/R *in vitro*, além de investigar *in silico* a interação dos isômeros do citral, componentes majoritários do óleo, nas vias de sinalização celular. As células foram expostas a um meio privado de glicose, piruvato e soro bovino fetal e submetidas a 24 horas de hipóxia, utilizando uma câmara de anaerobiose. Em seguida, foi feita a reoxigenação e suplementação do meio de cultura, seguida pelo tratamento com o óleo essencial por mais 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio (MTT). Para avaliação de mecanismo de morte celular, produção de ERO intracelular e mudança do potencial transmembrânico mitocondrial foram utilizadas técnicas de citometria de fluxo. Um marcador de lesão renal de células tubulares proximais, a molécula de injúria renal-1 (KIM-1), foi determinado a partir do sobrenadante celular. Alterações ultraestruturais foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise dos modelos *in silico* dos isômeros do citral foram feitas por *docking molecular* e ferramentas de predição farmacocinética e toxicológica. Os resultados mostraram um efeito citoprotetor do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* pelo aumento da viabilidade celular, redução de ERO intracelulares e reestabelecimento do potencial transmembrânico mitocondrial após isquemia e reoxigenação. O tratamento na concentração de 125 µg/mL diminuiu a liberação de KIM-1 e atenuou o dano ultraestrutural causado pela I/R. Os isômeros do citral apresentam maior afinidade à proteína Raf1 que à Keap1, com maior número de ligações hidrofóbicas e energia livre de ligação. Os estudos farmacocinéticos não revelaram diferenças entre os isômeros.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lesão renal aguda, Monoterpenos, Proteína Nrf2, Proteínas c-Raf

## ABSTRACT

### **Protective effect of *Cymbopogon citratus* essential oil on ischemia-reperfusion-induced kidney cell injury: in vitro and in silico study**

Renal injury due to ischemia and reperfusion (I / R) is one of the main causes of acute kidney injury (AKI) with progression related to oxidative damage, inflammation and cell death, mainly of tubular cells. Different signaling pathways are involved in this process, such as the Ras / Raf1 / ERK and Nrf2-Keap1 transcription pathways. Several antioxidant strategies have been studied in order to prevent or minimize the damage caused by I / R. The essential oil of *Cymbopogon citratus* has citral as its major component, formed by geometric isomers: trans-geranial and cis-neral. These are described as having anti-inflammatory, antioxidant and potential to modulate the aforementioned transcription pathways. The objective of this study was to evaluate the cytoprotective effect of *Cymbopogon citratus* essential oil on proximal tubular cells of the LCC-MK2 lineage in an *in vitro* I / R model, in addition to investigating the interaction of citral isomers, major components of oil, in cell signaling pathways. The cells were exposed to a medium deprived of glucose, pyruvate and fetal bovine serum and subjected to 24 hours of hypoxia, using an anaerobic chamber. Then, reoxygenation and supplementation of the culture medium was performed, followed by treatment with essential oil for another 24 hours. Cell viability was assessed by the 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium (MTT) reduction assay. Flow cytometry techniques were used to evaluate the mechanism of cell death, intracellular ROS production and change in mitochondrial transmembrane potential. A marker of renal damage to proximal tubular cells, the renal injury-1 molecule (KIM-1), was determined from the cell supernatant. Ultrastructural changes were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The analysis of the silica models of the citral isomers were performed by molecular docking and pharmacokinetic prediction tools. The results showed a cytoprotective effect of *Cymbopogon citratus* essential oil by increasing cell viability, reducing intracellular ROS and restoring mitochondrial transmembrane potential after ischemia and reoxygenation. The treatment at a concentration of 125 µg/ml decreased the release of KIM-1 and attenuated the ultrastructural damage caused by I / R. Citral isomers have a greater affinity for the Raf1 protein than for Keap1, with a greater number of hydrophobic bonds and free binding energy. Pharmacokinetic studies did not reveal differences between isomers.

**KEYWORDS:** Acute kidney injury, Monoterpenes, Protein Nrf2, Proteins c-Raf

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**7AAD** - 7-aminoactinomicina

**ARE** - Elemento da Resposta Antioxidante

**ATP** - Adenosina Trifosfato

**DCFH-DA** - Diacetato de diclorofluoresceína

**DMEM** - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNA** - Ácido Desoxirribonucléico

**ERK** – Quinases extracelulares reguladas por sinal

**ERO** - Espécies reativas de oxigênio

**GBR2** - Proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento

**GEF** - fator de troca de nucleotídeo de guanina

**GTP** – Trifosfato de guanosina

**KEAP1** - Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch

**KIM-1** - Kidney Injury Molecule – 1

**LRA** - Lesão Renal aguda

**MAF** - Oncogene do Fibrosarcoma Musculoaponeurotico

**MAPK** - Proteína quinase ativada por mitógenos

**MEK** - Proteína quinase de especificidade dupla

**NAPDH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

**NRF2** - fator 2 relacionado ao fator nuclear E2

**OX** - Xantina oxidase

**RAF1** - Proto-oncogene proteína serina/treonina quinase

**RAS** - Rat Sarcoma vírus



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de formação de radicais livres pela xantina oxidase (OX).....	12
<b>Figura 2:</b> Via de sinalização Nrf2-Keap1-ARE.....	15
<b>Figura 3:</b> Via de sinalização Ras/Raf1/ERK. ....	17
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do isopreno. ....	19
<b>Figura 5:</b> <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf. ....	20
<b>Figura 6:</b> Componentes majoritários do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> . ....	21
<b>Figura 7:</b> Aplicação da metodologia de <i>docking molecular</i> do ligante ao seu sítio de ligação na proteína. ....	23
<b>Figura 8:</b> Esquema mapa de Grid. ....	24
<b>Figura 9:</b> Delineamento do estudo.....	32
<b>Figura 10:</b> Princípio do ensaio de análise de ERO citoplasmática usando DCFH-DA.....	37
<b>Figura 11:</b> Mecanismo de funcionamento da coloração utilizando o corante fluorescente Rodamina 123 (Rho 123). ....	38
<b>Figura 12:</b> Estudo de encaixe para docking molecular da proteína Raf1 pelo Autodock tools versão 1.5.6.....	40
<b>Figura 13:</b> Estudo de encaixe para docking molecular da proteína Keap1 pelo Autodocktools versão 1.5.6.....	40
<b>Figura 14:</b> Cromatograma. Análise do óleo essencial de <i>C. citratus</i> por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas. ....	44
<b>Figura 15:</b> Citotoxicidade do óleo essencial pelo método do MTT. ....	45
<b>Figura 16:</b> Avaliação da proteção do óleo essencial após isquemia/reperfusão.....	46
<b>Figura 17:</b> Ensaio de viabilidade celular pelo método do 7-AAD. ....	47
<b>Figura 18:</b> Histograma representativo da análise da viabilidade celular pelo método do 7-AAD. ....	47
<b>Figura 19:</b> Histograma representativo da análise da viabilidade celular pelo método do 7-AAD. ....	48
<b>Figura 20:</b> Níveis de molécula de lesão renal KIM-1 no sobrenadante de células LLC-MK2. ....	49
<b>Figura 21:</b> Micrografias obtida por microscopia eletrônica de varredura de células renais LLC-MK2.....	50
<b>Figura 22:</b> Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo ensaio do DCFH (diclorofluoresceína).....	51
<b>Figura 23:</b> Histograma representativo da análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracitoplasmáticas pelo ensaio do DCFH (diclorofluoresceína). ....	51

<b>Figura 24:</b> Histograma representativo da análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracitoplasmáticas pelo ensaio do DCFH (diclorofluoresceína). .....	52
<b>Figura 25:</b> Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial pelo ensaio da Rodamina 123. ....	53
<b>Figura 26:</b> Histograma representativo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Psi_m$ ) pelo ensaio da Rodamina 123. ....	53
<b>Figura 27:</b> Histograma representativo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Psi_m$ ) pelo ensaio da Rodamina 123. ....	54
<b>Figura 28:</b> Complexos isômeros do citral e proteína Keap1 (Esquemas em 3D e 2D). ....	57
<b>Figura 29:</b> Complexos ligante co-cristalizado e proteína Keap1 (Esquemas em 3D E 2D)....	58
<b>Figura 30:</b> Complexos isômeros do citral e proteína Raf1 (Esquemas em 3D e 2D).....	62
<b>Figura 31:</b> Complexos ligante co-cristalizado e proteína Raf1 (Esquemas em 3D e 2D).....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição química do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> .....	43
<b>Tabela 2:</b> Lista de parâmetros de pontuação gerados a partir de encaixe molecular mostrando a interação entre a proteína Keap1 (PDB: 4IQK), isômeros do citral e ligante co-cristalizado à proteína. ....	55
<b>Tabela 3:</b> Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre os isômeros do citral, ligante co-cristalizado e a proteína Keap1.....	56
<b>Tabela 4:</b> Lista de parâmetros de pontuação gerados a partir de encaixe molecular mostrando a interação entre a proteína Raf1 (PDB: 3OMV), isômeros do citral e ligante co-cristalizado à proteína. ....	59
<b>Tabela 5:</b> Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre os isômeros do citral, ligante co-cristalizado e a proteína Raf1. ....	60
<b>Tabela 6:</b> Regra dos 5 de Lipinski para o isômeros do citral.....	64
<b>Tabela 7:</b> Propriedades físico-químicas dos isômeros do citral. ....	64
<b>Tabela 8:</b> Propriedades ADMET para os Isômeros do citral. ....	64

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1. Lesão por Isquemia e Reperfusão Renal</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2. Mecanismos da lesão Isquêmica</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3. Estresse oxidativo</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4. Via Nrf2-Keap1</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5. Via Ras/Raf1/ERK</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6. Marcador de lesão tubular KIM-1</b> .....	<b>18</b>
<b>1.7. Óleos essenciais e terpenóides</b> .....	<b>18</b>
<b>1.8. Cymbopogon citratus</b> .....	<b>20</b>
<b>1.9. Citral</b> .....	<b>21</b>
<b>1.10. Análise <i>in silico</i> aplicadas à pesquisa farmacológica</b> .....	<b>22</b>
1.10.1 <i>Docking molecular</i> .....	22
1.10.2 Ferramentas de Predição Farmacocinética e toxicológica .....	24
<b>1.11. Justificativa</b> .....	<b>25</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1. Coleta de material botânico, extração e análise de óleo essencial</b> .....	<b>30</b>
3.1.1. Coleta.....	30
3.1.2. Extração do óleo essencial por arraste a vapor d'água.....	30
3.1.3. Preparo da Amostra e Análise por CG-EM.....	30
3.1.4. Delineamento do estudo .....	31
<b>3.2. Modelo <i>in vitro</i> - Células tubulares renais</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3. Indução de I/R <i>in vitro</i></b> .....	<b>33</b>
<b>3.4. Ensaio de redução do MTT</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5. Ensaio de citometria de fluxo por 7-AAD</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6. Determinação de KIM-1 no sobrenadante de células LLC-MK2</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura</b> .....	<b>35</b>
<b>3.8. Avaliação de Estresse Oxidativo por Citometria de Fluxo</b> .....	<b>36</b>
3.8.1. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio Citoplasmáticas.....	37

3.8.2. Análise do Potencial Transmembrânico mitocondrial.....	38
<b>3.9. Análise estatística.....</b>	<b>39</b>
<b>3.10. Modelo in silico.....</b>	<b>39</b>
3.10.1 Análise de modelagem molecular .....	39
3.10.2 Preparação de ligantes e receptores e estudos de encaixe.....	39
3.10.3 <i>Docking molecular</i> .....	41
3.10.4 Ensaios de Predição Farmacocinética .....	41
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Composição Química do Óleo Essencial.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2. Cultura de Células renais.....</b>	<b>44</b>
4.2.1. Citotoxicidade do óleo essencial do <i>Cymbopogon Citratus</i> em células renais LLC-MK2.....	44
4.2.2. Efeito citoprotetor do OE de <i>Cymbopogon Citratus</i> em células LLC-MK2.....	45
4.2.3. Ensaio de Citotoxicidade por citometria de fluxo 7-AAD .....	46
4.2.4. Determinação dos níveis de KIM-1 .....	48
4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura em células LLC-MK2.....	49
4.2.6. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio.....	50
4.2.7. Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial .....	52
<b>4.3. Ensaios de Docking Molecular.....</b>	<b>54</b>
4.3.1. Interação dos isômeros de citral com a proteína Keap1 .....	54
4.3.2. Interação dos isômeros de citral com a proteína Raf1 .....	58
<b>4.4. ADMET.....</b>	<b>63</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Lesão por Isquemia e Reperfusão Renal

A lesão por isquemia e reperfusão é uma das causas mais importantes de lesão renal aguda (LRA) (MANESH et al., 2019). Ela está associada à redução do suprimento de oxigênio e nutrientes, queda rápida e intensa da taxa de filtração glomerular (TFG), capacidade reduzida de concentração urinária e reabsorção tubular prejudicada (GUVENÇ et al., 2020; GHOLAMPOUR et al., 2019). A isquemia renal pode resultar em lesão transitória, mas as consequências da isquemia e reperfusão (I/R) renal podem ser graves, resultando em insuficiência renal com mal prognóstico clínico (GUO et al., 2019). Estima-se que em pacientes graves a taxa de mortalidade supere os 50% (GOAITO et al., 2019). Além disso, a lesão por I/R é um fator de risco importante de progressão para doença renal crônica (ARFIAN et al., 2019).

A lesão renal aguda causada por isquemia e reperfusão pode ser observada em várias condições clínicas distintas como transplante renal, complicações urológicas, perdas excessivas de sangue relacionada a traumas, cirurgias de grande porte e choque (GUVENÇ et al., 2020; GUO et al., 2019). Essas condições são mais prevalentes em pacientes que se encontram na unidade de terapia intensiva (UTI) (20-40%) (GOIATO, et al., 2019).

Recentemente foi demonstrado na lesão por I/R que além das lesões tubulares, existem alterações microvasculares e um importante papel da inflamação no rim (PARK et al., 2018). Alguns mecanismos fisiopatológicos propostos são que a hipóxia é capaz de aumentar a resposta inflamatória, alterar a hemodinâmica microvascular renal como consequência do aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), induzir lesão endotelial e disfunção tubular que culminam em lesão renal com morte celular (CORDEIRO et al., 2019). Apesar disso, os mecanismos de lesão renal por I/R e progressão para doença renal crônica (DRC) não estão totalmente esclarecidos (ARFIAN et al., 2019; SHIVA et al., 2020).

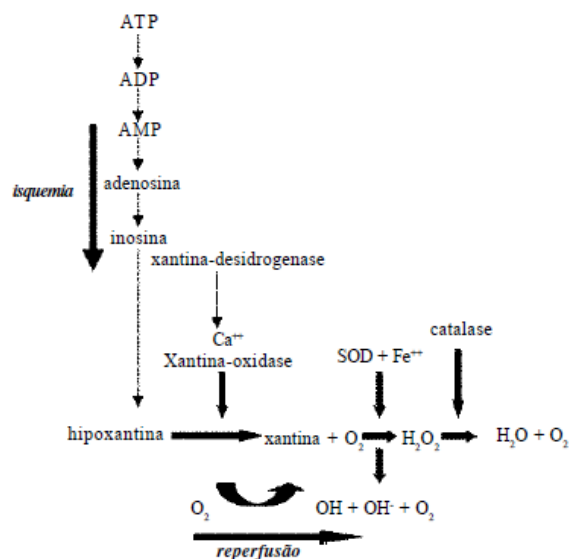
A reperfusão é o principal passo na recuperação da isquemia, no entanto, evidências clínicas e experimentais mostram que os eventos que levam à disfunção tubular e tecidual estão relacionados ao estresse oxidativo causado pela reperfusão (SANTOS et al., 2017). O restabelecimento do fluxo de oxigênio para os tecidos contribui para um aumento de espécies reativas de oxigênio e mudança do ambiente celular no túbulo renal que contribui para o mecanismo fisiopatológico da lesão renal aguda isquêmica (MOURA et al., 2015).

## 1.2. Mecanismos da lesão Isquêmica

A isquemia, definida como a privação do oxigênio resultante da perfusão inadequada de órgãos ou tecido devido à diminuição do sangue arterial ou fluxo venoso, leva à morte celular como resultado da depleção de reservas de energia celular e acúmulo de metabólitos tóxicos (GUVENÇ et al., 2020). A hipóxia causa lesão e disfunção celular com falha da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e aumenta o cálcio intracelular induzindo morte celular e estresse oxidativo. Após lesão, as células epiteliais tubulares podem passar por proliferação e regeneração ou sofrer a transição mesenquimal (EMT) ou desdiferenciação, sendo que células epiteliais sobreviventes substituirão células apoptóticas após LRA (ARFIAN et al., 2019).

No período de isquemia, o ATP é catabolizado gradativamente à ADP e AMP, e, posteriormente, à adenosina, inosina e hipoxantina. Paralelamente, uma protease citosólica ativada pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , acumulado no citosol, converte xantina desidrogenase em xantina oxidase (OX) (BORGES et al., 2019). O oxigênio fornecido pela reperfusão sanguínea aos tecidos previamente isquêmicos, seria o substrato final para a ativação da xantina oxidase, através de uma oxidação sulfidrídica ou proteólise. A transformação da hipoxantina em xantina é consequência da ativação desta enzima propiciando a formação de uratos e ERO como superóxidos e peróxido de hidrogênio. Além disso, o ferro liberado das células durante a isquemia pode atuar como catalisador e aumentar a conversão de peróxido de hidrogênio produzidos durante a reperfusão em radicais hidroxil muito mais reativos, aumentando o estresse oxidativo (Figura 1) (BORGES et al., 2019; EDUARDO et al., 2004).

**Figura 1:** Mecanismo de formação de radicais livres pela xantina oxidase (OX).



LEGENDA: ATP: Adenosina trifosfato; ADP: Adenosina difosfato; AMP: Adenosina monofosfato; SOD: Superóxido dismutase; OH: Radical hidroxil;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peroxido de hidrogênio. Fonte: EDUARDO et al., 2004



Além do dano isquêmico inicial devido à hipoperfusão, a inflamação e o dano oxidativo desempenham um papel substancial na patogênese da I/R durante a reperfusão. Ativação da sinalização do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) desencadeia a superexpressão de citocinas pró-inflamatórias incluindo interleucina-1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ], fator de necrose tumoral- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ] e IL-6. Essas citocinas promovem a infiltração de neutrófilos, cujos grânulos citoplasmáticos são uma fonte de espécies reativas de oxigênio (MANESH et al., 2019). A formação de ERO induz a morte celular renal através do dano ao DNA, instabilidade proteica e peroxidação dos lipídios de membrana, o que pode desencadear a morte celular programada, a apoptose (MANESH et al., 2019; ARFIAN et al., 2019). Um estudo experimental em ratos em 1986, Parks e Granger demonstraram que a lesão da membrana da mucosa foi mais severa em ratos submetidos a 3 horas de isquemia seguida de 1 hora de reperfusão do que a produzida por isquemia exclusiva por 4 horas. Desde então, foi proposto que a reperfusão, embora necessária, tem efeitos mais prejudiciais nas estruturas celulares do que a própria isquemia. Este evento foi chamado lesão de isquemia e reperfusão (PONTES et al., 2018). A tolerância dos tecidos à isquemia é variável e multifatorial dependendo do tempo de hipóxia, das necessidades metabólicas do tecido, do aporte da circulação colateral e de fatores humorais (YOSHIDA et al., 1996). Sendo assim, consequências bioquímicas, hemodinâmicas, anatômicas e patológicas em extensão variável repercutem, principalmente após o início da reperfusão.

### **1.3. Estresse oxidativo**

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são constitutivamente geradas nas células durante reações enzimáticas e não enzimáticas e são necessárias para sustentar vários processos fisiológicos (CHA et al., 2017). As principais fontes internas de ERO são provenientes de reações da cadeia respiratória mitocondrial, processos de fagocitose e reações do sistema do citocromo 450 (MEO et al., 2016). As condições capazes de alterar ou intensificar esses processos, como atividade física, inflamação e estresse aumentam a produção de ERO na célula (HARASYM; OLEDZKI, 2014). O aumento excessivo de ERO durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesas antioxidantes para evitar o dano oxidativo (BARBOSA et al., 2010). O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Esses mecanismos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, capazes de prevenir a formação de ERO, aumentar a eliminação de radicais ou mesmo reparar os danos induzidos por eles (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Algumas substâncias podem agir como antioxidante e serem sacrificados quando atuam sobre os ERO, esse efeito direto exige uma

regeneração do composto antioxidante para que possa reduzir os ERO gerados. Por outro lado, algumas moléculas podem agir como antioxidante indireto e potencializar o mecanismo de autodefesa celular ou o reparo celular contra o estresse oxidativo por regular algumas vias de sinalização (MEHTA; RAYALAM; WANG, 2018).

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, e a capacidade dos sistemas biológicos de desintoxicar esses produtos (ZHANG et al., 2020). A produção excessiva de ERO tem sido implicada em vários processos de doença renal, incluindo nefropatia diabética, nefropatia hipertensiva, lesão renal aguda e glomerulonefrite mediada por imunidade (CHA et al., 2017). São normalmente geradas como subprodutos do metabolismo do oxigênio ou pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NAPDH) e xantina oxidase (OX) (ZHANG et al., 2019).

As ERO mais conhecidas consistem em radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) que estão amplamente envolvidos na proliferação, diferenciação, morte celular, transdução de sinal e dano oxidativo (ZHANG et al., 2020).

A lesão de isquemia e reperfusão tem seus mecanismos intimamente relacionados à resposta inflamatória e à produção de espécies reativas de oxigênio (TAHA et al., 2018). Após a reoxigenação, a produção de radicais de oxigênio implica em danos teciduais e inicia uma cascata de respostas celulares deletérias precedendo a inflamação, morte celular, e por último, falência do órgão. Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das ERO podem ser prevenidos por algumas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalases, além de outros antioxidantes não enzimáticos. No entanto, quando a produção se torna excessiva, o estresse oxidativo pode ter um efeito deletério na função e integridade estrutural de tecidos biológicos (MIGUEL; MENEZES; ARAUJO, 2012).

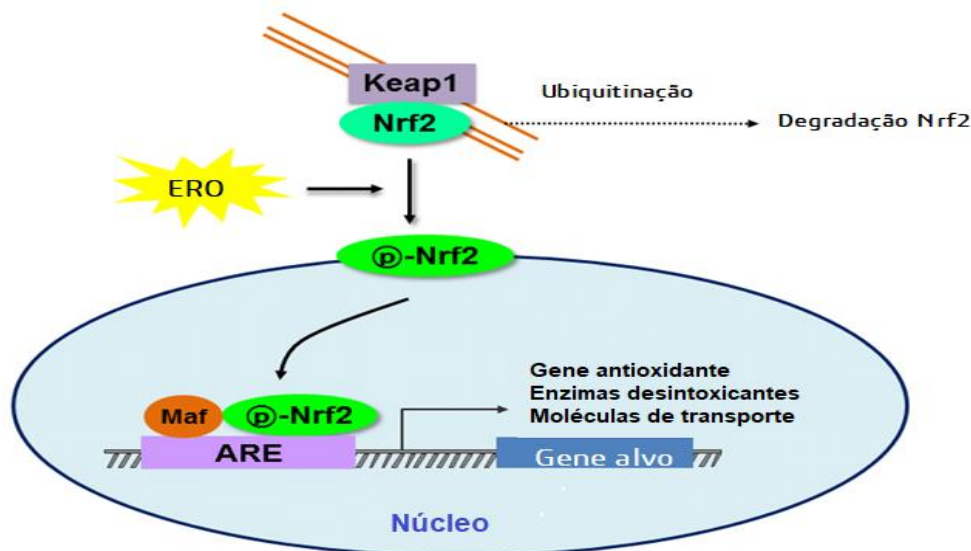
O estresse oxidativo e a inflamação estão envolvidos na fisiopatologia da isquemia e reperfusão (SALAMEH et al., 2020). Substâncias naturais antioxidantes são amplamente pesquisadas para tratar a lesão por isquemia e reperfusão. Estudos recentes têm demonstrado substâncias capazes de inibir várias cascatas de transdução de sinal e fatores de transcrição associados a inflamação e estresse oxidativo como MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) e a via Nrf2-Keap1 (KAULMMAN; BOHR, 2014). A descoberta dessas substâncias capazes de atuar nessas vias de sinalização tem atraído muito interesse nos últimos anos (AHMED et al., 2017).

#### 1.4. Via Nrf2-Keap1

O fator 2 relacionado ao fator nuclear E2 (Nrf2) é um fator de transcrição considerado citoprotetor. Seu principal papel é regular a resposta celular contra o estresse oxidativo, aumentando a produção de defesas antioxidantes e desintoxicantes enzimáticas como superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase, catalase e hemeoxigenase 1 (KREMER et al., 2019; NAKAMURA et al., 2003). A Keap1 (proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch) por sua vez, é uma proteína que contém resíduos de cisteína com grupos sulfidrilas altamente reativos, que atua como o principal regulador negativo da Nrf2 por evitar sua translocação ao núcleo e promover sua degradação por ubiquitinação (LI et al., 2008).

Em resposta ao acúmulo de espécies reativas, os grupos sulfidrilas da Keap1 são modificados, prejudicando a interação Nrf2-Keap1 e liberando a Nrf2 em direção ao núcleo. No núcleo, essa proteína forma um heterodímero com um fator de transcrição proteico chamado Maf (Oncogene do Fibrosarcoma Músculo Aponeurótico), iniciando o processo de transcrição dependente de ARE (Elemento de Resposta Antioxidante), promovendo a transcrição de genes antioxidantes e anti-inflamatórios (Figura 2) (WU; PAPAGIANNAKOPOULOS, 2020).

**Figura 2:** Via de sinalização Nrf2-Keap1-ARE.



LEGENDA: ERO: Espécies reativas de oxigênio; Nrf2: Fator 2 relacionado ao fator nuclear;;Keap1: Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kech; Maf: Fator de transcrição do fibrosarcoma musculo aponeurótico; ARE: Elemento de resposta antioxidante .

Fonte: Adaptado OH; JUN, 2018.

Genes antioxidantes que protegem as células de várias lesões por meio de seus efeitos anti-inflamatórios são capazes de influenciar várias doenças distintas (AHMED et al., 2017). A via Nrf2-Keap1 tem sido muito estudada por ser a principal via do equilíbrio redox e seu papel na nefroproteção tem sido demonstrado (SAITO, 2013; DODSON et al., 2019). Estudos revelam que o Nrf2 regula a produção celular de antioxidantes e, portanto, protege contra o estresse oxidativo na insuficiência renal crônica, inflamação renal e fibrose (PERGOLA et al., 2011).

### **1.5. Via Ras/Raf1/ERK**

A proteína Ras é uma GTPase ativada por sinais extracelulares (ENDO, 2020). Quando ativada, ela é capaz de recrutar um serina/treonina quinase conhecida como Raf-1, um componente chave da via Ras-Raf-ERK1/2 da proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que é responsável por regular processos celulares, como por exemplo, proliferação celular, migração e apoptose (MOR; PHILIPS, 2006; JIN et al., 2013).

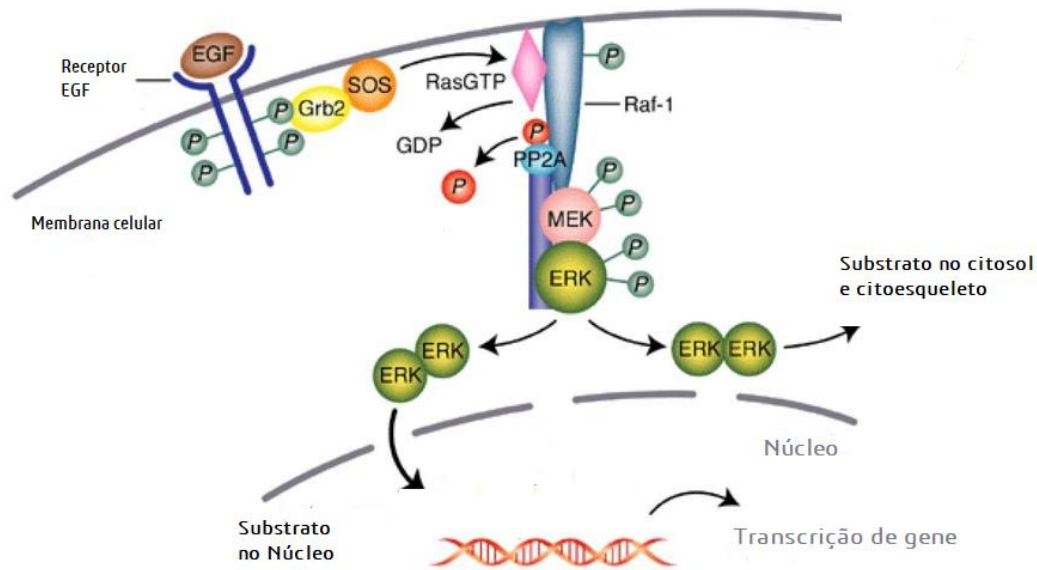
O ponto de partida para essa via é ativação de uma proteína transmembrana, um receptor tirosina quinase (RTK) por um fator de crescimento. A ativação causa a autofosforilação do RTK e a interação com a proteína adaptadora do fator de crescimento, a proteína ligada ao receptor 2 (GRB2). Essa proteína recruta fatores de troca de nucleotídeos de guanosina (GEF) como SOS que são fatores de troca de nucleotídeo de guanosina (GEF) que aumentam a taxa de troca de nucleotídeo Ras do GDP por GTP, aumentando assim o nível de Ras ligado ao GTP ativo. Após a ativação de Ras, Raf é recrutado para a membrana celular (RAUEN, 2013).

Raf é o efetor Ras mais bem caracterizado e é um membro de uma família de quinases serina/treonina, que inclui C-Raf (Raf1), A-Raf e B-Raf. A ativação de Raf estimula uma cascata de sinalização por fosforilação de MAPK que fosforila e ativa sucessivamente proteínas a jusante, como MEK (proteína quinase de especificidade dupla) e posteriormente ERK (quinases extracelulares reguladas por sinal) (DEGIRMENCI; HU, 2020).

A ativação das quinases Raf ocorre quando a Ras ligada à guanosina-5'-trifosfato (GTP) recruta dímeros Raf para a membrana celular, onde Raf é fosforilado por outras quinases e, potencialmente, por meio de autofosforilação. A cascata Ras/Raf/MEK/ERK1/2 transmite sinais mitogênicos e outros sinais estimuladores de receptores de membrana celular para o núcleo através da fosforilação de fatores de transcrição, além de fosforilar muitas proteínas citoplasmáticas que regulam diversos processos celulares (Figura 3) (FISKUS; MITSIADES, 2016).

Estudos prévios demonstraram que a proteína quinase ERK1/2 (MAPK) da via Ras/Raf1/MEK/ERK não é apenas efetor de sinalização mitogênica, pois sua ativação também está envolvida na resposta ao estresse e inflamação (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012). Trabalhos anteriores mostraram que ERK1/2 tem um papel fundamental na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, expressão de enzimas como COX-2 (ciclooxigenase-2), portanto um importante papel na inflamação (MOENS; KOSTENKO; SVEINBJORNSSON, 2013).

**Figura 3:** Via de sinalização Ras/Raf1/ERK.



#### LEGENDA:

EGF: Fator de crescimento epidérmico; Grb2: Proteína adaptadora ligada ao receptor 2;

SOS: Fatores de troca de nucleotídeo guanosina; GDP: Guanosina difosfato;

GTP: Guanosina trifosfato; PP2A: Proteína fosfatase 2; P: Fosforilação

Ras: Proteína GTPase; Raf1: Proteína serina/treonina quinase; MEK: Proteína quinase de especificidade dupla; ERK: Quinases extracelulares reguladas por sinal

Fonte: Adaptado KOLCH et al. 2002

Evidências crescentes demonstram que a ERK junto com outras MAPK regulam a chave do processo celular de muitas doenças renais (CUARENTAL et al., 2019) como o papel da Raf1 na fibrose renal (FENG et al., 2020). A ativação da via Ras/Raf1/ERK tem sido relacionada com algumas condições inflamatórias (YANG et al., 2018). Evidências mostram que substâncias capazes de inibir a via de transdução de sinal das MAPK reduzem a inflamação

e o estresse oxidativo (KAULMANN; BOHN, 2014). Além disso a via de sinalização ERK parece ser capaz de regular a reposta a células T *naive* em lesão por isquemia e reperfusão cerebral (ZHANG et al., 2020).

### **1.6. Marcador de lesão tubular KIM-1**

Evidências recentes mostram o papel do KIM-1 como molécula de sinalização importante no reparo tecidual renal após a lesão de células tubulares e que o aumento da sua expressão está relacionado a uma maior ativação da via ERK/MAPK (ZHANG; CAI, 2016). A molécula de lesão renal-1 (KIM-1) é uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, um receptor de fosfatidilserina que medeia a fagocitose de corpos apoptóticos e lipídios oxidados (YANG et al., 2015) que é indetectável no rim saudável, mas cuja expressão é altamente regulada positivamente na superfície apical de células epiteliais do túbulo proximal durante a lesão renal isquêmica e tóxica (TAVARES et al., 2020). Muitos estudos demonstraram que o epitélio tubular não é apenas um alvo passivo de lesão. As células epiteliais tubulares geram importantes citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tornando-as um importante componente da resposta imune inata. Quando KIM-1 é expresso cronicamente, resulta em fibrose renal progressiva e insuficiência renal crônica, que talvez esteja relacionado à sua função fagocítica de absorver compostos nocivos, como lipídios oxidados (HUMPHREYS et al., 2013).

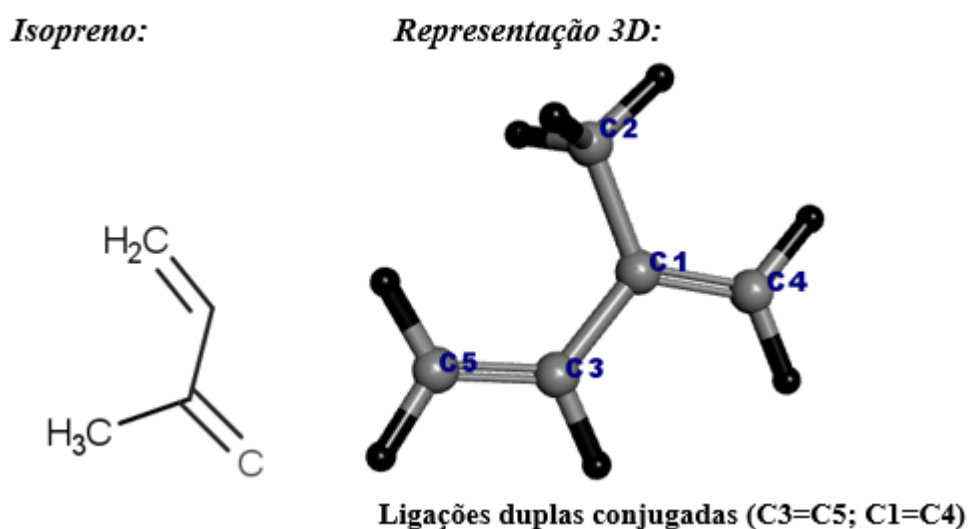
A detecção laboratorial da presença de KIM-1 urinária tem se mostrado fidedigna quando em relação com as concentrações teciduais (LAHOUD et al., 2015). Uma vez que a KIM-1 apresenta-se majoritariamente nas células tubulares proximais como uma proteína transmembrana, o que foi observado, principalmente em ensaios de cultivo celular, é que o domínio extracelular (ectodomínio) é clivado por metaloproteinases, possivelmente como forma de se gerar um sinal de regeneração celular. Logo, a clivagem do ectodomínio resulta na sua detecção na urina (CHARLTON *et al.*, 2014). A molécula de lesão KIM-1 tem sido utilizada como marcador sensível e precoce para avaliar o efeito protetor de algumas substâncias bioativas, incluindo aquelas oriundas de plantas medicinais (SAMPAIO et al., 2016).

### **1.7. Óleos essenciais e terpenóides**

Terpenos, também chamados de terpenóides, constituem a maior classe de produtos naturais com mais de 55.000 compostos conhecidos (CHANG et al., 2010). Estes produtos químicos são parte do metabolismo secundário de espécies vegetais e animais e são derivados de unidades de isopreno (Figura 4) (MATOS et al., 2019). As estruturas típicas dos terpenos contêm um esqueleto carbônico representado por  $(C_5)_n$  e são classificados como hemiterpenos

(C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesquiterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Monoterpenos e sesquiterpenos são compostos geralmente encontrados nos óleos essenciais de várias plantas aromáticas (HARBONE, 1991). Em especial, os sesquiterpenos (C15) são formados biossinteticamente a partir de três unidades de isopreno, ou seja, a unidade básica de formação dos terpenóides. Cada unidade de isopreno é formada por uma estrutura básica de cinco carbonos; por isso, os terpenos também são conhecidos como isoprenoides (BREITMAIER, 2006).

**Figura 4:** Estrutura química do isopreno.



Fonte: Elaborada pelo autor

Muitos compostos desta classe de metabólitos secundários são amplamente empregados no setor industrial como aromatizantes, fragrâncias e especiarias, em produtos de perfumaria e cosméticos, bem como aditivos alimentares (OLIVEIRA, BARRETO, JUNIOR, 2014). Na indústria farmacêutica, além de serem utilizados como excipientes para melhorar permeação transdérmica de fármacos, são utilizados como princípios ativos de medicamentos. O crescente interesse na aplicação clínica destes compostos é atribuída às propriedades biológicas de terpenos, tais como efeito antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, anti-inflamatório e atividades antiparasitárias (PADUCH et al., 2007).

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis produzidos na forma de metabólitos secundários em plantas que podem conter cerca de 20 a 60

componentes em concentrações muito diferentes. Eles são caracterizados porque contêm dois ou três componentes principais em concentrações relativamente altas (20-70%) em comparação com outros componentes presentes em quantidades mínimas. Eles podem consistir em monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanos, que podem conter diferentes grupos funcionais como alcanos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e ácidos (MENDEZ et al., 2019).

### 1.8. *Cymbopogon citratus*

O capim-limão, *Cymbopogon citratus* (Figura 5), também conhecido por erva cidreira, capim-cidreira ou *lemongrass*, é uma planta quase acaule, com folhas longas, estreitas e aromáticas, pertencente à família *Poaceae* (MADI et al., 2020). Esta planta é originária da Ásia e é muito cultivada em países tropicais. Ela é amplamente consumida, devido aos seus efeitos medicinais, cosméticos e nutricionais, além de agradável aroma e sabor. Algumas de suas importantes propriedades farmacológicas já foram relatadas na literatura (SIMOES et al., 2020). No Brasil, seus chás e extratos são utilizados na medicina popular como digestivos, antitussígenos, antigripais, analgésicos, antitérmicos, anti-inflamatório, antioxidante, anti-hipertensivo antiespasmódicos, antialérgicos, entre outros (VILLAVERDE et al., 2013; EKPENYONG; AKPAN; NYOH, 2015).

**Figura 5:** *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

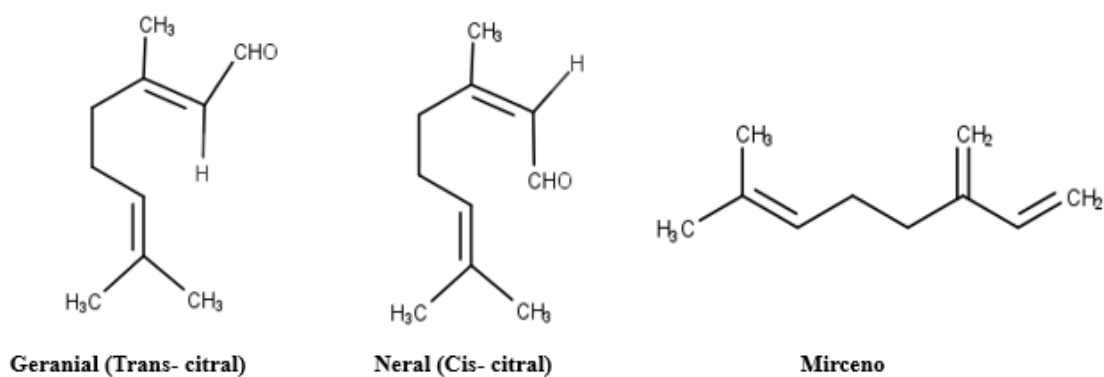


Fonte: NETO; ALVES; MARTINS, 2015 adaptado

O capim-limão é uma planta aromática cultivada para produção comercial de óleo essencial, o qual geralmente apresenta como constituintes majoritários o monoterpeno citral, correspondendo à mistura isomérica de neral e geranial, além do mirceno (figura 6).



**Figura 6:** Componentes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.



### Isômeros Geométricos – Dois planos espaciais

Fonte: OLADEJI et al., 2019 adaptado

O citral é o principal componente encontrado no óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (CASTILLO; IBARRA, 2018). O termo Citral é originário de Citrus latino, remetendo ao limão ou ao capim-limão. É um aldeído monoterpênico de fórmula  $C_{10}H_{16}O$  (PROCHNOW et al., 2017).

### 1.9. Citral

O Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é um aldeído alifático de ocorrência natural da série dos monoterpenos. É formado por dois isômeros geométricos: o trans citral (geranial) e o cis citral (neral). Ele é o principal constituinte do óleo essencial de capim limão, muito utilizado na indústria de alimentos e cosméticos pela sua segurança e aroma característico (LIU et al., 2020). Alguns estudos têm revelado que o citral é uma molécula com um grande potencial terapêutico (NAZ et al., 2018). Trabalhos prévios revelaram que o citral é capaz de inibir o crescimento de várias linhagens de células cancerígenas e induzir apoptose, aumentando a produção de ERO nessas células quando em altas concentrações (BAILLY 2020; SHEIKH et al., 2017). Além disso, o citral é considerado um dos compostos antimicrobianos mais promissores e potentes devido a sua forte atividade antibacteriana e antifúngica (MA et al., 2020). Recentemente, foi demonstrado que ele é capaz de gerar peroxidação lipídica, danificar a fosforilação oxidativa e destruir a membrana celular de uma vasta gama de microorganismos, além de apresentar uma ótima atividade antibiofilme (CAO et al., 2020). Os efeitos antitumorais e antimicrobianos do citral podem ser explicados em parte pela sua capacidade pró-oxidante em altas concentrações (MA et al., 2020; SHEIKH et al., 2017).

Por outro lado, evidências crescentes demonstram uma situação ambígua. A literatura científica tem revelado que o citral é capaz de reduzir o estresse oxidativo, promover proteção celular e desempenhar um papel antiinflamatório em várias condições distintas (BACHIEGA; SFORCIN, 2011; SHEN; SUN; GUO, 2015). Katsukawa et al. (2010) mostrou que o citral inibiu a expressão de Cicloxigenase 2 (COX-2) em células semelhantes a macrófagos humanos estimuladas pelo lipolissacarídeo (LPS). Corroborando com esses resultados, Song et al. (2016) mostrou que o citral também é capaz de inibir a atividade da mieloperoxidase induzida por LPS e diminuir o nível de citocinas inflamatórias, como TNF $\alpha$  IL-1 $\beta$  e IL-6.

Além disso, o citral parece ter um papel muito importante em uma das principais vias de equilíbrio redox, a via Nrf2-Keap1 (BAILLY, 2020). O fator de transcrição Nrf2 é o grande responsável pela expressão basal e induzível de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo e proteção celular, além de estar associado diretamente à transcrição mediada por NF- $\kappa$ B de genes de citocinas inflamatórias (DODSON et al., 2019). Estudos com glomeruloesclerose segmentar focal demonstraram que o tratamento com citral foi capaz de ativar a via Nrf2 e a inibir o estresse oxidativo, além de demonstrar potencial inibição da fosforilação da via ERK/MAPK (YANG et al., 2013).

### **1.10. Análise *in silico* aplicadas à pesquisa farmacológica**

Métodos computacionais (*in silico*) foram desenvolvidos e amplamente aplicados ao desenvolvimento e teste de hipóteses de farmacologia. Esses métodos incluem bancos de dados, relações quantitativas de estrutura-atividade, pesquisa de similaridade, farmacóforos, modelos de homologia e outros modelos moleculares. Tais métodos têm sido utilizados frequentemente na descoberta e otimização de novas moléculas com afinidade para um alvo, além de promover esclarecimento das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, bem como caracterização físico-química (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007). Essas informações têm sido úteis em acelerar o desenvolvimento de novas drogas (SERRANO et al., 2020). Substâncias com propriedades ativas oriundas de produtos naturais cada vez mais são submetidas a análises de triagem virtual para justificar seus efeitos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e tóxicos (WANG et al., 2018; SHAIK et al., 2019).

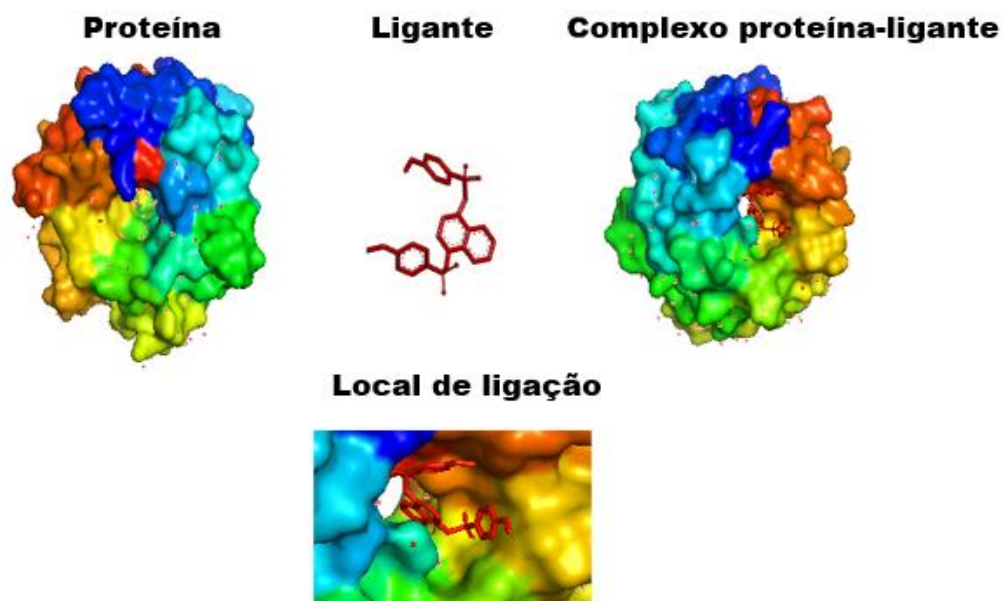
#### **1.10.1 *Docking molecular***

O *docking molecular* é uma ferramenta de triagem virtual baseada em estrutura frequentemente utilizada para facilitar e acelerar estágios iniciais da descoberta de drogas (SERRANO et al., 2020). Considerado um modelo *in silico*, ele permite a identificação de novos compostos de interesse terapêutico, simulando e prevendo interações entre ligante e alvo

(Figura 7). Este processo é geralmente realizado primeiro prevendo a orientação molecular de um ligante dentro de um receptor, e então estimando sua complementaridade através do uso de uma função de pontuação por de diversos cálculos algoritmos (PINZI; RASTELLI, 2019). Esses algoritmos de acoplamento molecular executam previsões quantitativas de energia de ligação, fornecendo classificações de compostos acoplados com base na afinidade de ligação dos complexos ligante-receptor (FERREIRA et al., 2015).

Portanto as simulações de *docking* requerem dois métodos básicos: um método de busca para explorar o espaço conformacional disponível para o sistema e um campo de força para avaliar a energia de cada conformação (HUEY et al., 2007). Diversas ferramentas, como softwares, permitem a realização dessas simulações de acoplamento, como o “*Autodock tools*” e “*Autodock vina*”

**Figura 7:** Aplicação da metodologia de *docking molecular* do ligante ao seu sítio de ligação na proteína.



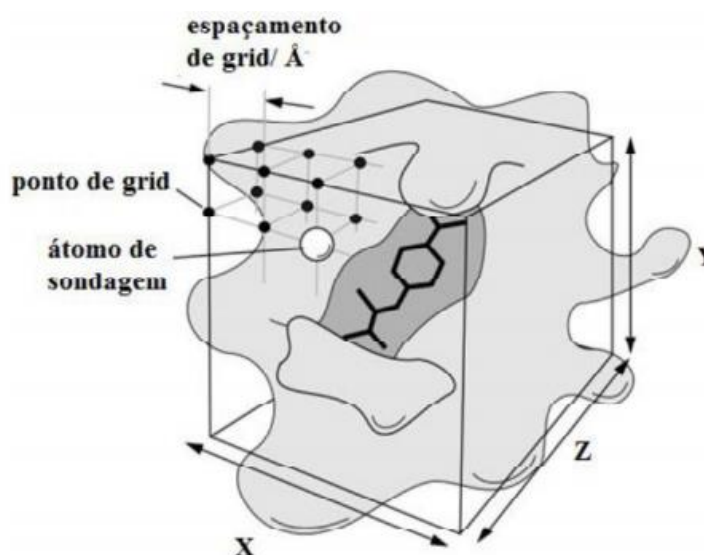
Fonte: Elaborado pelo Autor (Programa Pymoll)

O espaço conformacional disponível para o sistema é definido pelo mapa de Grid, que constitui-se de um conjunto tridimensional de pontos regularmente espaçados, centrados no local do sítio ativo da enzima em estudo (Figura 8) onde cada ponto dentro do mapa de grid armazena a energia potencial de um átomo de sonda ou grupo funcional naquela posição particular (MORRIS et al., 1996). O autogrid, programa utilizado pelo autodock para definir os

mapas de grid é importante, pois ele define a região da proteína a ser analisada quando ocorrer à interação entre o ligante e a macromolécula (MORRIS et al., 1996).

O campo de força é avaliado através de pontuações das interações calculadas em função da energia livre de ligação, composta por termos de energia termodinamicamente significativos, ou seja, termo de energia intermolecular e termo de energia de torção. O termo de energia de ligação intermolecular inclui as contribuições da interação de *van der Waals*, ligações de hidrogênio, potencial eletrostático e energia de dessolvatação na interação proteína-ligante (HUEY et al., 2007). O termo energia de torção incorpora a energia livre liberada devido às ligações rotacionais presentes no ligante (SRIRAMULLU; WU; LEE, 2020).

**Figura 8:** Esquema mapa de Grid.



Fonte: Adaptado MORRIS et al., 1999

#### 1.10.2 Ferramentas de Predição Farmacocinética e toxicológica

A identificação de características de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) desempenha um papel vital em todas as fases de descoberta e desenvolvimento de fármacos (GUAN et al., 2019). Modelos *in silico* relacionados a ADMET são comumente usados para fornecer uma triagem rápida e preliminar das propriedades cinéticas de alguma molécula antes que os compostos sejam investigados *in vitro*. A maioria das falhas em ensaios clínicos são devidos a problemas de ADMET e não de eficácia (DONG

et al., 2018). A toxicidade continua sendo um grande obstáculo, com uma taxa de perda de 40% entre os novos compostos identificados (SCHYMAN et al., 2017).

Atualmente, existem várias ferramentas computacionais gratuitas e comerciais para prever propriedades ADMET (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007). Essas ferramentas são capazes de prever propriedades físico-químicas, permeabilidade gastrointestinal, permeabilidade da barreira hematoencefálica, ligação a proteínas plasmáticas, afinidade por proteínas transportadoras, depuração metabólica, potencial para inibir ou induzir enzimas metabolizadoras de drogas (especialmente CYPs) e geração de metabólitos reativos (RAUNIO, 2011).

### 1.11. Justificativa

A lesão por I/R é uma das causas mais comuns de lesão renal aguda relacionadas a alta morbimortalidade (GUVENÇ et al., 2020). Seus mecanismos estão intimamente relacionados ao aumento do estresse oxidativo, inflamação, alteração da hemodinâmica microvascular e consequente dano ao tecido renal. Em casos graves muitos pacientes não recuperam a função renal totalmente e tempo de isquemia é um fator chave nesse contexto (GUO et al., 2019).

O reestabelecimento do fluxo sanguíneo é a medida terapêutica de escolha. Embora saiba-se que a reperfusão é capaz de agravar o quadro e contribui para um dano adicional quando acontece de forma descontrolada, promovendo o estresse oxidativo (GOAITO et al., 2019). Logo, novas terapias devem ser desenvolvidas para minimizar esses danos. As plantas medicinais são muito estudadas para diversos fins terapêuticos e podem ser alternativas viáveis.

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, cujo principal constituinte é o citral, é um monoterpeno formado por dois estereoisômeros, geranial e neral, que podem apresentar atividades biológicas distintas (MOTA et al., 2019; LIAO et al., 2015). Evidências crescentes demonstram que citral tem o potencial de atuar como nefroprotetor por sua ação antioxidante e anti-inflamatória. Além disso, o citral tem demonstrado um potencial de atuar em algumas vias que regulam inúmeros processos celulares, entre elas as vias Nrf2-Keap1 e Ras/Raf1/ERK (SONG et al., 2016; KA et al., 2015; YANG et al., 2013). Ambas estão relacionadas a processos chaves no desenvolvimento de doenças renais (PERGOLA et al., 2011; FENG et al., 2020).

Diante disso, observa-se a importância do estudo, utilizando o óleo essencial do *Cymbopogon citratus*, sendo possível que a mistura dessas substâncias entre elas o citral possa auxiliar na defesa contra espécies reativas de oxigênio e quadro inflamatório, visto na lesão por I/R. Estudos *in silico* são importantes para otimizar a busca ativa por novas drogas (SERRANO

et al., 2020). Desse modo, o *docking molecular* ajuda a prever a interação do ligante ao alvo enquanto o ADMET fornece propriedades cinéticas e de segurança, que ajudam a selecionar as substâncias mais promissoras. Portanto estudos de modelos *in silico* podem ajudar a esclarecer o mecanismo relacionado aos efeitos dos isômeros do citral e as suas interações com essas vias importantes.

# Objetivos

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito citoprotetor do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na injúria renal aguda em modelo de isquemia e reperfusão.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito citoprotetor do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em cultivo de células LLC-MK2 submetidas a isquemia e reperfusão.
- Investigar os efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre a formação de ERO, disfunção mitocondrial e molécula de injúria renal KIM-1 em células LLC-MK2 submetidas a isquemia e reperfusão.
- Investigar os tipos de interações intermoleculares, distância e capacidade de ligação ao sítio ativo das proteínas entre átomos dos isômeros do Citral (trans-geranial e cis-neral) e das proteínas-alvo das vias Ras/Raf1/ERK e Nrf2-Keap1.
- Comparar as propriedades farmacocinéticas e toxicidade dos isômeros geométricos do Citral (trans-geranial e cis-neral) através de modelo teóricos.



# **Materiais e Métodos**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta de material botânico, extração e análise de óleo essencial

##### 3.1.1. Coleta

Os exemplares de *Cymbopogon citratus* foram coletados às 9 horas da manhã no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos e o óleo essencial foi extraído no Laboratório de Produtos Naturais do Horto, localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a supervisão da Profa. Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira. A identificação da espécie certificada foi realizada através do registro de exsicata (nº 54263) no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará.

##### 3.1.2. Extração do óleo essencial por arraste a vapor d'água

A extração realizada no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará (UFC) deu-se através da utilização das folhas frescas, dessecadas à sombra, trituradas (1kg), e colocadas separadamente em frasco acoplado a um condensador e a uma fonte geradora de vapor d'água para extração do óleo essencial por arraste a vapor. Finalizada a operação, o óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio anidro, com o intuito de retirar a umidade, e analisado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

##### 3.1.3. Preparo da Amostra e Análise por CG-EM

Uma alíquota de 10 µL do óleo essencial de *C. citratus* foi dissolvida em 990 µL de diclorometano/hexano 1:1- grau Cromatográfico. Para análise, foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado a detector de espectrometria de massas GC/EM Shimadzu QP-2010 plus, aplicando gás de arraste hélio 5.0 (99,999% de pureza) com fluxo de 1,0 mL por min. A coluna utilizada foi Equit-5 (5% fenil e 95% de polidimetilsiloxano) com 30 cm de comprimento, 25 mm de diâmetro e 25 µm de espessura do filme líquido. A programação de temperatura iniciou com 60 °C até 246 °C numa taxa de 3 °C/ min, totalizando 62 min. A voltagem do detector utilizada foi 70 eV com faixa de massas variando de 30 a 500 m/z. A temperatura da fonte de ionização e da interface foi 240 °C. A temperatura do injetor foi 220 °C com modo de injeção split 1:10. O volume de injeção foi 1µL. A identificação dos compostos se deu através da similaridade com os espectros de massas da base de dados NIST (National Institute of Standards and Technology).

#### 3.1.4. Delineamento do estudo

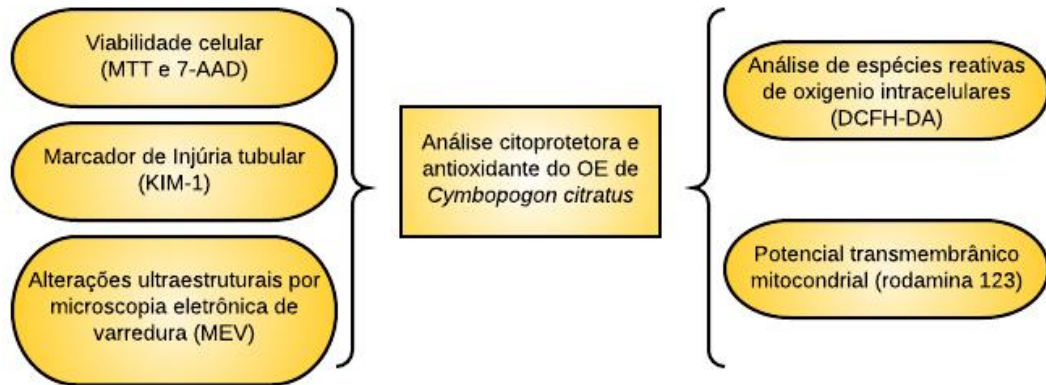
No presente trabalho, foi avaliado o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* como alternativa citoprotetora contra a lesão renal aguda causada por modelos de isquemia seguida de reperfusão (I/R). O estudo foi dividido, de forma geral, em duas etapas, uma *in vitro* e outra *in silico*. (figura 9.0).

Após a caracterização do OE de *Cymbopogon citratus* iniciou-se os estudos *in vitro*. A primeira etapa *in vitro*, consistiu em estudos utilizando ensaios de cultivo celular em uma linhagem bem caracterizada de células renais tubulares proximais imortalizadas, as células LLC-MK2. Essa etapa foi dividida em dois momentos. No primeiro momento a citoproteção relacionada à atividade do óleo de *Cymbopogon citratus*, sendo seu principal constituinte o citral, foi mensurada através de ensaios de viabilidade celular, marcador de injúria tubular KIM-1 e análise de alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura (MEV). No segundo momento foi avaliado o potencial redox do OE de *Cymbopogon citratus* através de técnicas de citometria de fluxo.

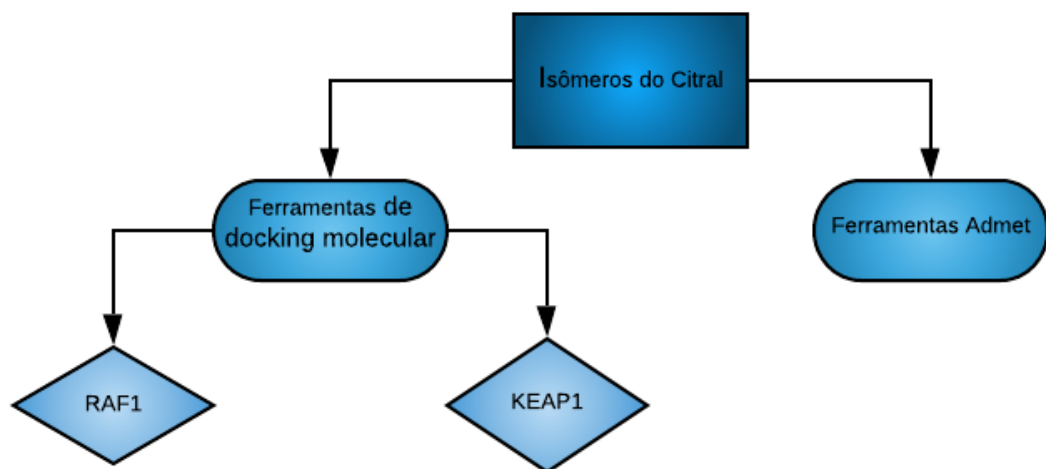
A segunda etapa caracterizou-se por um estudo *in silico*, através de uma triagem virtual dos isômeros geométricos do citral (principal constituinte do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*). Foi feito um estudo de *docking molecular* para as proteínas Keap1 e Raf1 através de ferramentas como *autodock tool* 4.2.6. Os resultados de energia livre de ligação foram validados pelo *autodock vina*. Além disso, foram comparados os resultados de energia de ligação livre dos isômeros do citral com os ligantes da proteína co-cristalizada e avaliado a suas capacidades de ligação ao sítio ativo das proteínas. As análises 2D e 3D foram realizados por programas como Discover studio 2020 e Pymol. A análise cinética e toxicológica foi realizada através do servidor SwissAdme e Emoltox respectivamente.

**Figura 9:** Delineamento do estudo.

1º Etapa: Estudo *in vitro*:



2º Etapa: Estudo *in silico*:



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.2. Modelo *in vitro* - Células tubulares renais

As células epiteliais tubulares renais LLC-MK2 (HULL *et al.*, 1962), uma linhagem imortalizada de células de túbulo renal proximal oriundas de macaco-rhesus (*Macaca mulata*), foram gentilmente doadas pelo Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo e

cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, EUA) composto de glutamina (580 mg/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (110 mg/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, e acrescido de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (130 mg/L) e soro bovino fetal (SBF) a 10% em garrafas plásticas estéreis, e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem confluência (BUTLER e DAWSON, 1992).

Para manutenção das células, o meio de cultivo das garrafas confluentes foi removido, e as células foram lavadas com 3-5 mL de PBS estéril, pH 7.4. A garrafa foi incubada com 1mL de solução de tripsina-EDTA (0.05%/0.02%) por 5-10 minutos a 37°C para deslocamento das células aderidas na superfície de cultivo. Em seguida, para inativação da tripsina-EDTA, foi adicionado 1mL de DMEM completo (adicionado de 10% de soro bovino fetal – SBF), e alíquotas das suspensões celulares obtidas foram transferidas para novas garrafas com meio DMEM completo.

Antes de cada experimento, as células foram mantidas em meio DMEM sem SBF por 24 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para sincronização na fase G<sub>0</sub> do ciclo celular. Após esse período, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspensão em 1mL de meio DMEM completo. Para plaqueamento inicial dos experimentos, as células foram quantificadas e ajustada a concentração para 1x10<sup>5</sup> células/mL. Para quantificação, alíquotas foram removidas para contagem em Câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de Trypan (solução a 0,1% em PBS), a concentração celular foi ajustada e a suspensão foi pipetada na concentração final de 1x10<sup>5</sup> células/mL em placas de 24 e 96 poços.

### 3.3. Indução de I/R *in vitro*

O protocolo *in vitro* que mimetiza a injúria por isquemia/reperfusão foi induzida por um método de hipóxia e reoxigenação, anteriormente descrito denominado método da câmara anaeróbica (GINO; BRINDA, 2014). As células foram plaqueadas em uma concentração de 1 × 10<sup>5</sup> células/ mL em placas de 96 poços, e mantidas *overnight*, para permitir adesão e proliferação celular. Para a indução da isquemia, o meio de cultura foi substituído por DMEM privado de glicose, piruvato e SBF e, em seguida, as placas foram incubadas numa câmara anaeróbica por 24 horas. A reperfusão foi realizada, após o período na câmara, através da adição de um meio de cultura completo e retorno das células à atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 3 horas de reoxigenação (reperfusão), as placas foram tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em várias concentrações (250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 ;7,8 e 3,9 µg/ml)

durante 24h. Diluições em tampão fosfato (PBS) foram realizadas para assegurar que a concentração de DMSO, solvente no qual o óleo foi originalmente diluído, nunca excedesse 0,5%. Todos os ensaios foram realizados em paralelo nas células em condições normais de aerobiose a fim de detectar eventuais concentrações tóxicas do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na linhagem celular. A recuperação da viabilidade celular foi medida pelo ensaio de redução do MTT.

### **3.4. Ensaio de redução do MTT**

O teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é amplamente usado na determinação da viabilidade de células em cultivo. O ensaio é baseado na observação de que a redução do sal de tetrazólio MTT de cor amarela para formazan de cor azul violácea ocorre em células vivas devido à atividade das desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais (em particular, succinato desidrogenase). Após a adição de um agente surfactante para solubilização dos cristais formados, os produtos são lidos por espectrofotometria a 570 nm. Dessa forma, o teste é utilizado como um marcador da capacidade metabólica e viabilidade celular (SLIWKA et al., 2016).

As placas submetidas ao processo de I/R e posteriormente tratadas com diferentes concentrações de óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, bem como as placas mantidas em condições de aerobiose, foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle negativo, foi utilizado PBS estéril, pH 7.4. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 min e 100 µL de sobrenadante foram removidos. 10 µL de uma solução de MTT (Sigma®) a 2,5 mg/mL em PBS foram adicionados e a placa foi incubada por 4 horas a 37°C no escuro. Em seguida foram adicionados 90 µL do surfactante dodecil-sulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17 horas de incubação, as placas foram avaliadas espectrofotometricamente em leitor de placas a 570 nm.

### **3.5. Ensaio de citometria de fluxo por 7-AAD**

Para complementar os resultados de viabilidade celular foi utilizado um ensaio com outro marcador. As células foram marcadas com substâncias fluorescentes 7-aminoactinomicina (7AAD). O 7AAD é um intercalador capaz de complexar-se com o DNA, excitando-se com o laser de 488 nm e emitindo emissão máxima de 647 nm; O 7AAD não é capaz de penetrar em células com membrana íntegra. Dessa forma, células com alta marcação para 7AAD são consideradas células com perda de integridade de membrana.

Para realização da análise, as células LLC-MK2 de cada poço foram suspensas em 100 µL de tampão de ligação e nos tubos foram adicionados 5 µL de 7AAD. Após 15 minutos de incubação no escuro, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação em cada tubo e as células foram analisadas no FACSCalibur (BD Biosciences). Os resultados foram expressos em percentual de células não marcadas; células marcadas por 7AAD, indicativo de permeabilização da membrana.

### **3.6. Determinação de KIM-1 no sobrenadante de células LLC-MK2**

Após a avaliação da citoproteção do OE de *Cymbopogon citratus*, foi analisado a capacidade do OE atenuar os níveis de um marcador sensível de injúria tubular *KIM-1*. Os níveis de KIM-1 foram determinados no sobrenadante de LLC-MK2 através de um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) comercial (R & D Systems, Inc - Cat. DY1750, Minneapolis, MN). Poços da placa de ELISA foram revestidos diluindo o anticorpo de captura (72 µg/mL) para uma concentração de trabalho de 0,4 µg/mL em PBS, obtendo-se o volume final de 100 µL em cada poço. A placa foi selada e incubada *overnight* à temperatura ambiente. Cada placa foi lavada duas vezes com 400 µL de tampão de lavagem (Tween-20 a 0,05% em PBS). As placas foram bloqueadas pela adição de 300 µL de BSA a 1% em PBS durante 2 horas. Uma curva de calibração composta por 100 µL de solução padrão de KIM-1 recombinante humano (nas concentrações de 0 a 20 ng / mL), bem como sobrenadante do cultivo das células LLC-MK2 foram adicionados aos seus respectivos poços e incubados à temperatura ambiente durante 2 horas.

A placa foi lavada novamente e 100 µL de anticorpo biotilado caprino anti-KIM-1 (400 ng/mL) foram adicionados a cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente durante 2 horas, o passo de lavagem foi repetido e, após, 100 µL de estreptavidina-HRP foram adicionados a cada poço e incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após lavagem, 100 µL da solução de substrato foram adicionados a todos os poços e incubados à temperatura ambiente durante 7 minutos. A reação foi parada adicionando 50 de solução de paragem (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M) a todos os poços. A absorbância foi medida a 450 nm com uma correção de absorbância a 540 nm. A concentração de KIM-1 foi calculada com base na curva padrão e expressa em termos absolutos em ng/mg de proteínas.

### **3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Com o objetivo de visualizar alterações ultraestruturais causadas nas células renais LLC-MK2 após isquemia e reperfusão e visando confirmar os efeitos recuperativos do óleo

essencial de *Cymbopogon citratus*, foi realizada a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual é capaz de gerar imagens tridimensionais em alta resolução da superfície de amostras. Essa microscopia não utiliza fótons, e sim um feixe de elétrons que incide a partir de um cátodo e é condensado sobre a amostra. Quando o feixe primário interage com as amostras, os elétrons perdem energia por dispersão e os elétrons dispersos são captados por um detector, o qual cria uma imagem virtual da superfície em análise com o auxílio de um *software* (CHIHANGA et al., 2018).

Para a realização da MEV, células renais LLC-MK2 foram cultivadas em lamínulas de vidro circulares estéreis. As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% em 0,1 M (pH 7,2 à temperatura ambiente, durante 2 horas) e desidratadas com concentrações crescentes de etanol, revestidas com uma camada de 20 nm de ouro em um dispositivo de pulverização de íons QT150 ES-Quorum e avaliadas com um microscópio eletrônico de varredura Quanta 450 FEG-FEI na central analítica da UFC. (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA).

### **3.8. Avaliação de Estresse Oxidativo por Citometria de Fluxo**

No intuito de investigar o potencial do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* em reverter ou reduzir o desequilíbrio redox após injúria por I/R, foram avaliados dois parâmetros da respiração celular: acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracitoplasmáticas e alteração no potencial transmembrânico mitocondrial.

O protocolo de plaqueamento das células renais LLC-MK2 em placas de 24 poços (1 mL/ poço) e o processo de I/R *in vitro*, bem como o tratamento com *Cymbopogon citratus* foram realizados como previamente descrito neste trabalho. Previamente a cada análise por citometria de fluxo, as células foram tripsinizadas e lavadas por três centrifugações subsequentes na presença de tampão fosfato (PBS) a 4000 RPM por 5 minutos. Com o objetivo de excluir uma possível associação dos danos celulares ao tratamento com *Cymbopogon citratus*, além da análise dos parâmetros de respiração celular em células submetidas à I/R, essas análises também foram feitas em células cultivadas e tratadas em condições normais e constantes de aerobiose (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>).

A intensidade de fluorescência foi medida através de citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, São Paulo, SP) equipado com laser de argônio de 15 mW resfriado a ar e operando em 488 nm. Parâmetros como complexidade (Detector lateral de dispersão da luz - SSC) e tamanho (Detector frontal de dispersão da luz - FSC) celular também foram avaliados.

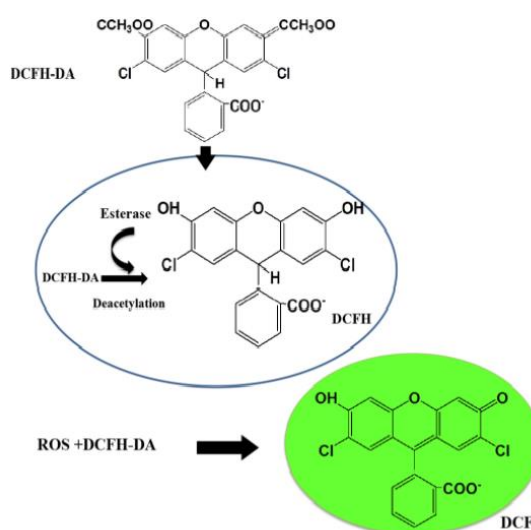


### 3.8.1. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio Citoplasmáticas

O princípio do ensaio baseia-se na introdução da sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no interior das células. O DCFH-DA é um composto estável não-fluorescente lipofílico que facilmente atravessa a membrana das células. Dentro da célula, enzimas citosólicas (esterases) hidrolisam o DCFH-DA para formar a 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a qual, devido a sua polaridade, fica confinada no citoplasma. Espécies reativas de oxigênio geradas durante a explosão respiratória oxidam o DCFH formando a 2',7'-diclorofluoresceína oxidada (DCF), que possui fluorescência verde, com emissão em 510-530 nm (Figura 10). A fluorescência verde produzida pela formação de DCFoxi é proporcional ao acúmulo de ERO da célula. Desta forma a intensidade da fluorescência intracelular se torna uma medida dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células. (BASS et al., 1986).

Para a incorporação do DCFH no interior das células, 5µL (concentração final 100 µM) da solução estoque foram adicionados aos poços da placa de 24 poços contendo as células em cultivo 3 horas após o tratamento com OE de *Cymbopogon citratus*, como previamente descrito (BASS et al., 1986). Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células processado em citômetro de fluxo. Assim, a média de intensidade de fluorescência relativa produzida durante a explosão respiratória pela oxidação do DCFH foi coletada através do filtro de fluorescência verde (FL1).

**Figura 10:** Princípio do ensaio de análise de ERO citoplasmática usando DCFH-DA.



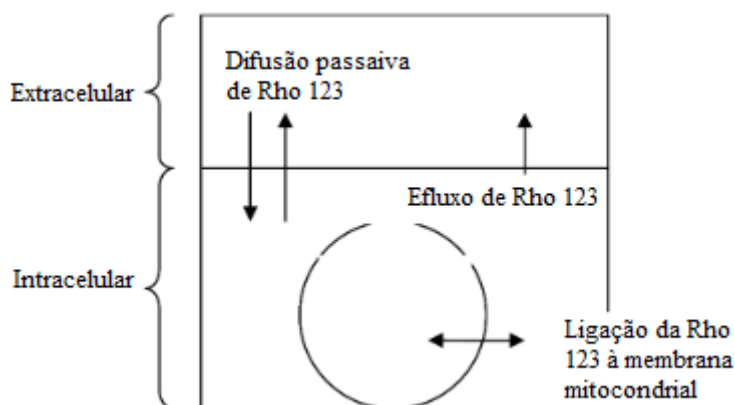
Fonte: Adaptado de RAJNEESH et al., 2017

### 3.8.2. Análise do Potencial Transmembrânico mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o corante Rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) o qual é um corante específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior das organelas, emitindo fluorescência vermelha (Figura 11). Alterações ao nível da integridade mitocondrial (potencial transmembrânico) podem ser detectados em ensaios de citometria de fluxo por aumento da fluorescência verde citosólica em detrimento da vermelha mitocondrial, indicando uma difusão da Rho123 da mitocôndria para o citosol em células danificadas (JOHNSON et al., 1980). Sendo assim, o fluorocromo Rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular. A intensidade de fluorescência relativa produzida pela marcação de mitocôndrias ativas foi coletada através do filtro de fluorescência vermelha (FL2) (YANG et al., 2012).

As células LLC-MK2 submetidas à lesão pelo modelo de Isquemia/Reperusão pelo método da câmara anaeróbica foram tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, como descrito anteriormente neste trabalho. Ao término das 24 horas do tratamento, as amostras foram lavadas com PBS, tripsinizadas e o pellet de células marcado com Rodamina 123 (concentração final de 10 µg/ mL) por meia-hora para, em seguida, ser processado em citômetro de fluxo com excitação a 488 nm e detecção a 563-606 nm.

**Figura 11:** Mecanismo de funcionamento da coloração utilizando o corante fluorescente Rodamina 123 (Rho 123).



Fonte: YANG et al., 2012.

Os resultados do ensaio do DCFH-DA e da Rodamina foram expressos como intensidade relativa de fluorescência, a qual foi obtida a partir dos valores absolutos de intensidade de fluorescência dos quais foi calculada uma média geométrica e atribuído valor 1,0 para o controle, as médias dos demais grupos receberam valores proporcionais calculados por regra de três simples, conforme previamente descrito (JOHNSON et al., 1980).

### 3.9. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para comparação estatística entre os grupos experimentais, foi utilizado one-way ANOVA seguido pelo post-test de Bonferroni. Como critério de significância foi aceito  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism5.0 (EUA).

### 3.10. Modelo in silico

#### 3.10.1 Análise de modelagem molecular

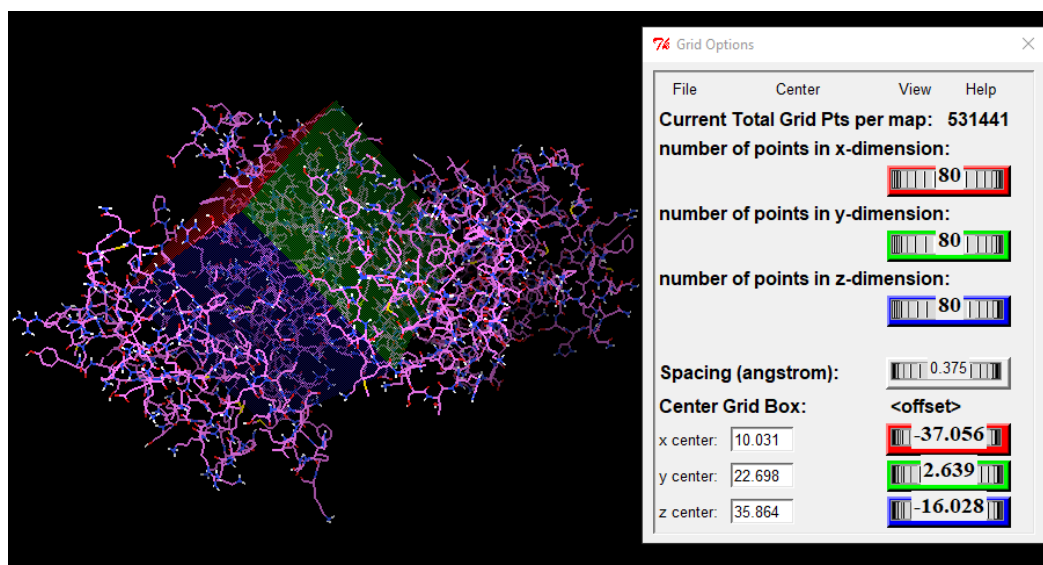
Para determinar os modos de ligação potenciais dos isômeros do citral com as proteínas Raf1 e Keap1, estudos de *docking molecular* foram realizados através dos softwares *Autodock Tools* (ADT) versão 1.5.6 e *Autodock Vina*. Ambos os softwares podem ser adquiridos gratuitamente pelo site: <http://mgtools.scripps.edu/downloads>. A estrutura cristalina de Raf1 (PDB: 3OMV) e da Keap1 (PDB: 4IQK), com seus respectivos ligantes, foram recuperadas do RSCB Protein Data Bank (endereço da web: <http://www.rscb.org/pdb/>) e foram usadas como receptores de *docking molecular*. As moléculas dos ligantes Geranial (CID: 638011) e Neral (CID: 643779) foram obtidas dos bancos de dados de compostos PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### 3.10.2 Preparação de ligantes e receptores e estudos de encaixe

A estrutura dos ligantes e receptores foram convertidas em arquivos no formato PDB, utilizando o programa Discovery Studio 2020. Foram removidas as moléculas de água e os ligantes co-cristalizados das proteínas. Os arquivos PDB, assim obtidos, foram convertidos posteriormente para o formato PDBQT utilizando *ADT* versão 1.5.6. Usando *ADT*, todos os átomos de hidrogênio polares foram adicionados as proteínas. As cargas de Gasteiger foram adicionadas a cada átomo e os átomos de hidrogênio não polares foram dissolvidos com a estrutura da proteína. Todas as estruturas foram salvas em arquivos PDBQT para posterior avaliação usando *ADT*.

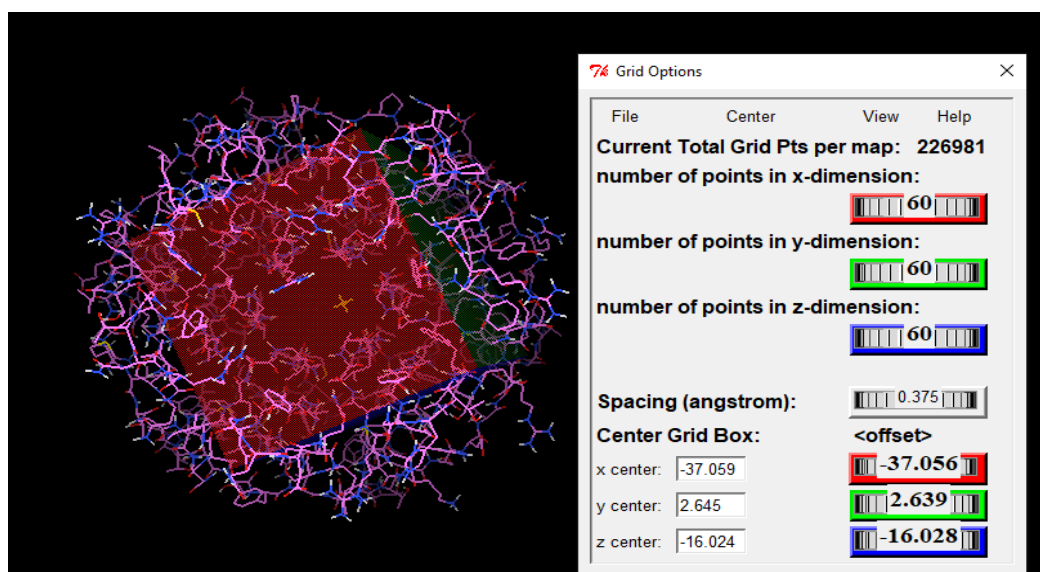
Os cálculos GRID foram realizados usando um espaçamento de grade de  $0,375 \text{ \AA}$ . O arquivo de parâmetro de grade (GPF) foi definido em  $80 \times 80 \times 80 \text{ \AA}$  ao longo dos eixos x, y, z com arranjo de grade e centro de grade que foi definido em 10.031, 22.698 e 35.864  $\text{\AA}$  para Raf1 (Figura 12). Para proteína Keap1 o parâmetro de grade foi  $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}$  com centro de grade definido como -37.059 x, 2.645 y, -16,024 z  $\text{\AA}$  (Figura 13).

**Figura 12:** Estudo de encaixe para docking molecular da proteína Raf1 pelo Autodock tools versão 1.5.6.



Fonte: Elaborada pelo autor Autor

**Figura 13:** Estudo de encaixe para docking molecular da proteína Keap1 pelo Autodocktools versão 1.5.6.



Fonte: Elaborada pelo Autor

### 3.10.3 Docking molecular

O Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) foi usado no *AutoDock* 1.5.6 para cálculos de acoplamento flexível de ligante fixo em receptor. Para cada acoplamento proteína-ligante, um máximo de 10 poses de ligação foram geradas, e a pose mais adequada foi escolhida com base na interação dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo com o ligante. Uma vez que os complexos Proteína-ligante acoplados foram concluídos, uma análise dos locais de ligação foi realizada a fim de criar uma interação de ligante 2D e diagramas 3D para cada composto. A visualização e a análise do complexo acoplado de proteínas e ligantes foram feitas por PyMol e Discovery Studio Visualizer 2020.

### 3.10.4 Ensaio de Predição Farmacocinética

Os isômeros testados foram submetidos a uma triagem *in silico* ADMET usando o banco de dados do servidor SwissAdme (<http://www.swissadme.ch/index.php>). A coleção ADMET fornece componentes que calculam as propriedades previstas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade para coleções de compostos testados. As propriedades do ADMET foram previstas através da solubilidade aquosa, barreira hematoencefálica (BBB), ligação às proteínas plasmáticas, interação com enzimas do complexo do citocromo P450 (CYP) e absorção intestinal.

Para avaliar a toxicidade dos isômeros do citral utilizou-se o banco de dados Emoltox (<http://xundrug.cn/moltox/silicotox>). Foi verificada a possibilidade de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e sensibilização dérmica. Os modelos usados para prever as propriedades ADMET neste protocolo são derivados do cruzamento de dados com uma variedade de fontes de dados experimentais (GUAN et al., 2019).

Para avaliar se o citral possui uma boa disponibilidade foram adotadas as regras dos 5 de Lipinski. Segundo Lipinski, *et al.* (2004), os fármacos devem apresentar massa molecular menor ou igual a 500 Da para possuir uma boa biodisponibilidade oral, possuir log P menor igual a 5, não ultrapassar 5 grupos doadores de hidrogênio e 10 aceptores de hidrogênio para que sejam assim bons candidatos a fármacos.

# Resultados

## 4. RESULTADOS

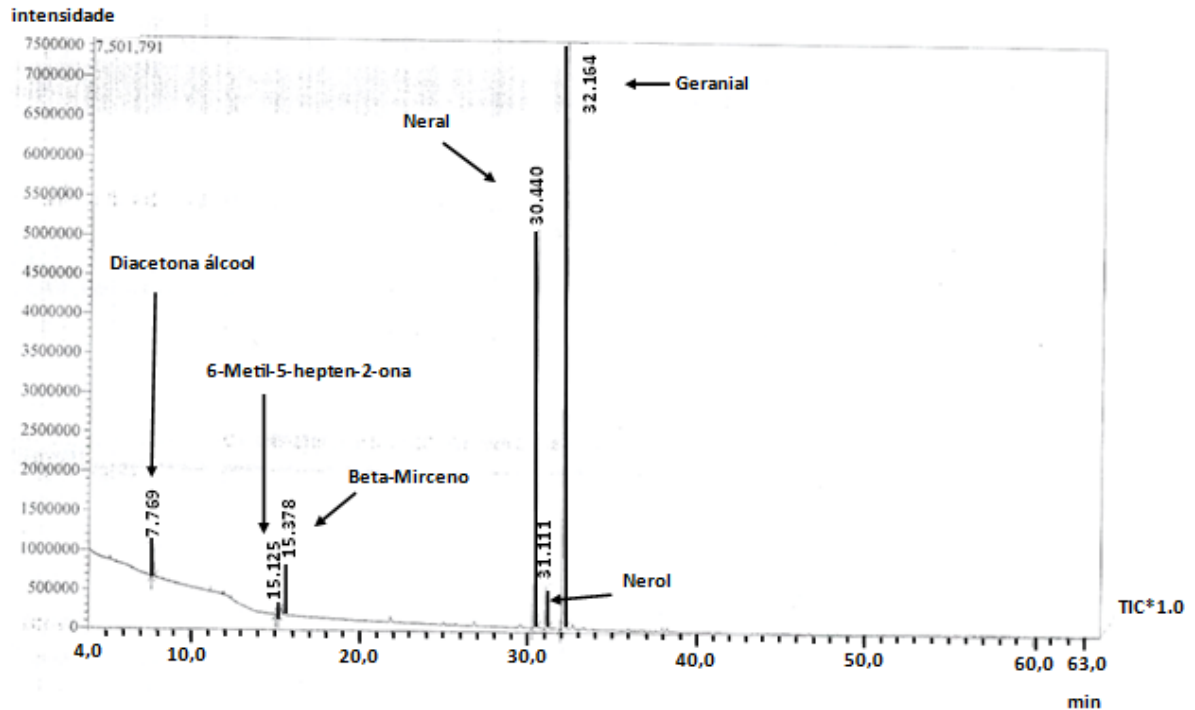
### 4.1. Composição Química do Óleo Essencial

A composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* está presente na tabela 1. A análise por CG-EM mostrou que o OE de *Cymbopogon citratus* é constituído principalmente por monoterpenos aldeído citral, formado por geranial (55,48%) e neral (35,40%), correspondendo a 90,88% do OE. Além desses, foram identificados monoterpenos hidrocarbonetos como beta-mirceno (3,49%), cetonas, 6-metil-5-hepten-2-ona (0,46%) e álcools, nerol (3,49%) além de álcool diacetona (1,68%) (figura 14).

**Tabela 1:** Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Componentes	Tempo de retenção (min)	Relação massa/carga (m/z)	C.citratus (%)
Diacetona alcool	7.769	43.05	1.68%
6-Metil-5-hepten-2-ona	15.125	43.05	0.46%
Beta Mirceno	15.378	41.10	3.49%
Neral	30.440	41.05	35.40%
Nerol	31.111	41.10	3.49%
Geranial	32.164	41.10	55.48%

**Figura 14:** Cromatograma. Análise do óleo essencial de *C. citratus* por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.



Fonte: Elaborada pelo Autor

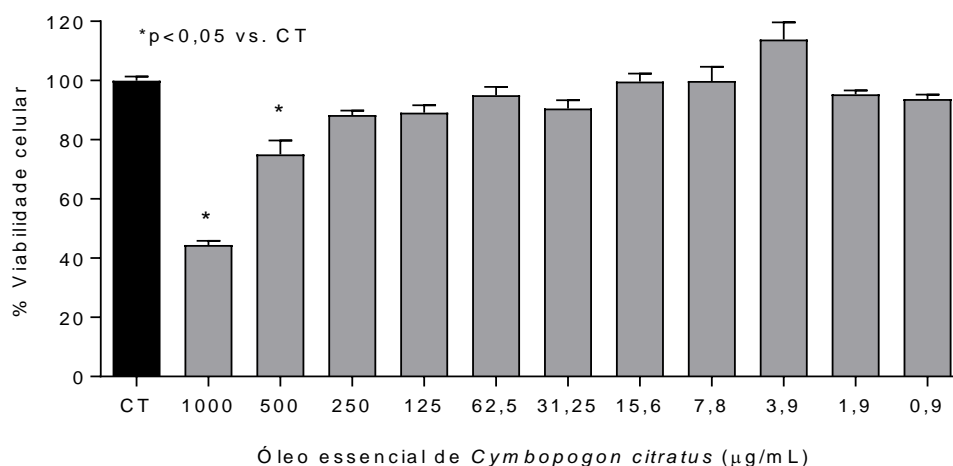
## 4.2. Cultura de Células renais

### 4.2.1. Citotoxicidade do óleo essencial do *Cymbopogon Citratus* em células renais LLC-MK2

Os resultados para a viabilidade celular avaliada por MTT após administração do OE são mostrados na figura 15. Para as concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  de OE o ensaio de MTT mostrou significativamente uma redução da viabilidade celular ( $p < 0,05$ ). As demais concentrações do OE de *Cymbopogon citratus* não alteraram a viabilidade celular de maneira significativa.



**Figura 15:** Citotoxicidade do óleo essencial pelo método do MTT.

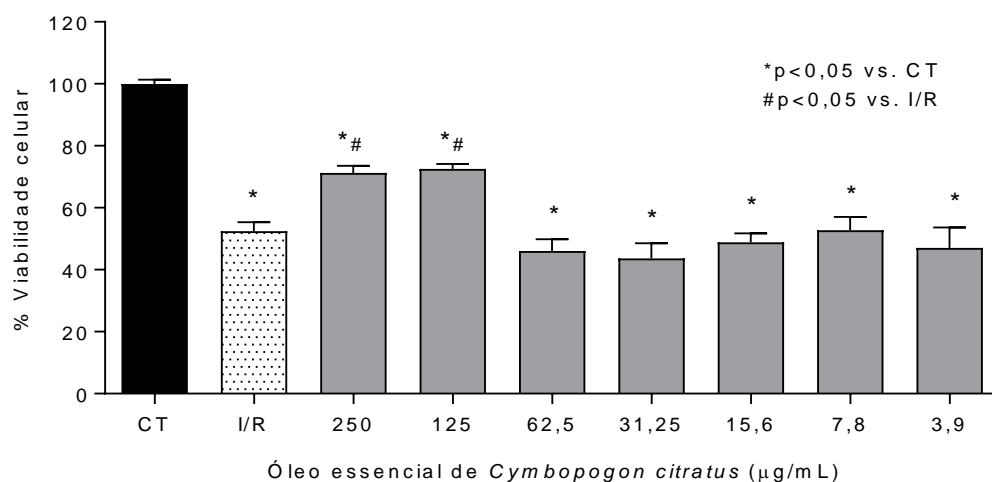


Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  comparado aos grupos de controle de veículo. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, CT = Controle negativo; \* $p < 0,05$ ; em relação as concentrações de 500µg/ml e 1000µg/ml de OE de *Cymbopogon citratus* e grupo controle.

#### 4.2.2. Efeito citoprotetor do OE de *Cymbopogon Citratus* em células LLC-MK2

A administração do OE de *Cymbopogon citratus* foi capaz de atenuar a diminuição de células viáveis no ensaio de MTT após a lesão por isquemia e reperfusão (I/R). Esse feito pode ser destacado quando se utilizou as concentrações de 125µg/ml ( $72.52\% \pm 1.648$ ) e 250µg/ml ( $71.24\% \pm 2.294$ ). Nessas concentrações houve um aumento significativo de células viáveis em relação ao grupo de isquemia e reperfusão ( $52.43\% \pm 2.955$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 16).

**Figura 16:** Avaliação da proteção do óleo essencial após isquemia/reperfusão.

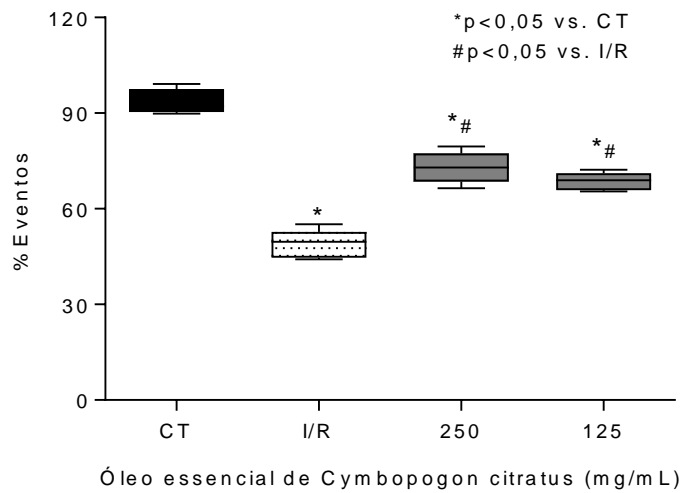


Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$  comparado aos grupos de controle de veículo. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni, CT = Controle negativo; \* $p < 0,05$ ; I/R = isquemia e reperfusão; # $p < 0,05$  em relação ao grupo I/R.

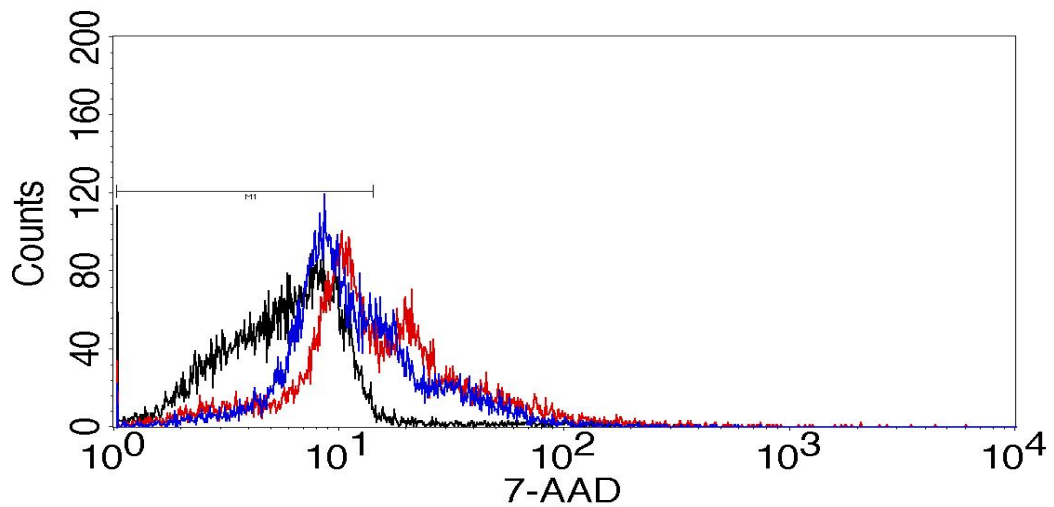
#### 4.2.3. Ensaio de Citotoxicidade por citometria de fluxo 7-AAD

Para complementar os resultados de viabilidade do ensaio do MTT optou-se pelo uso de outro método de princípio diferente, o 7-AAD uma técnica útil em reconhecer fragmentação de membrana celular. Na figura 17 nota-se uma diminuição da viabilidade celular no grupo de isquemia e reperfusão ( $48.88\% \pm 1.982$ ) em relação ao controle ( $93.59\% \pm 1.727$ ) ( $p < 0,05$ ). Esse aumento da citotoxicidade também pode ser visto na figura 18 e 19 relacionado ao aumento da fluorescência representado pela linha vermelha no grupo isquemia e reperfusão. Os tratamentos em concentrações de  $125\mu\text{g/ml}$  e  $250\mu\text{g/ml}$  foram capazes de diminuir significativamente o dano em células renais LLC-MK2 causada pela isquemia e reperfusão ( $p < 0,05$ ), visto pela diminuição da emissão de fluorescência. Houve um aumento de 19,7% e 24,07% de viabilidade celular respectivamente em comparação ao grupo I/R.

**Figura 17:** Ensaio de viabilidade celular pelo método do 7-AAD.

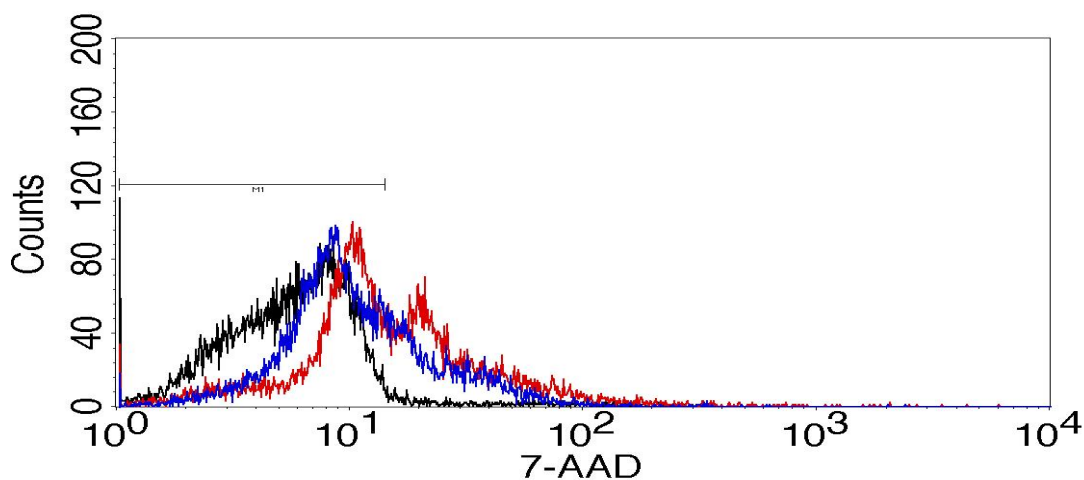


**Figura 18:** Histograma representativo da análise da viabilidade celular pelo método do 7-AAD.



A população marcada pela linha preta representa o controle; em vermelho estão as células submetidas à isquemia/reperfusão; em azul são as células tratadas com o Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (125 μg/mL). Foi considerado como critério de viabilidade a população contida em M1, que no controle representava um número de eventos <95% da população.

**Figura 19:** Histograma representativo da análise da viabilidade celular pelo método do 7-AAD.

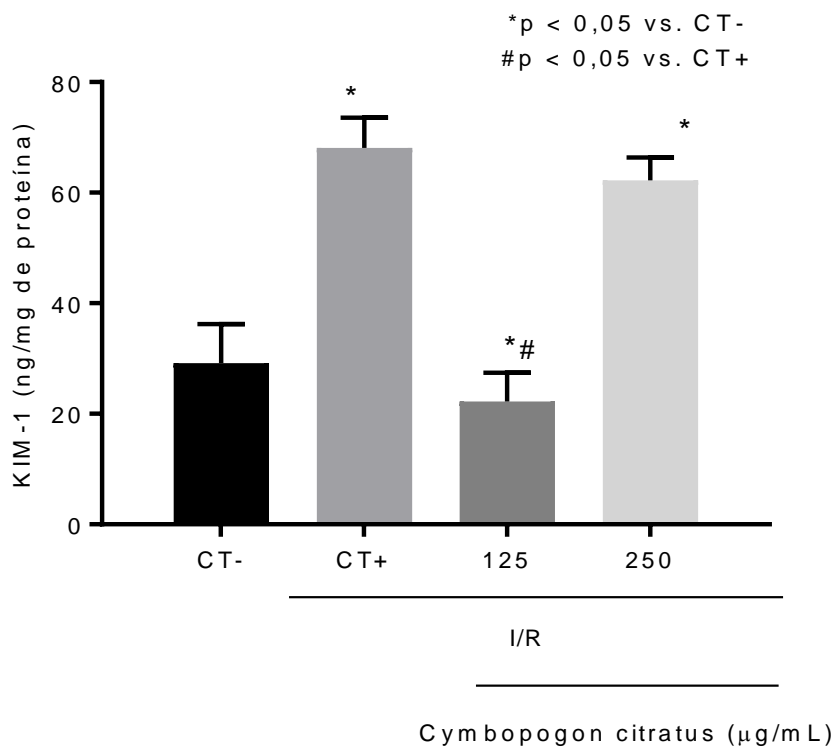


A população marcada pela linha preta representa o controle; em vermelho estão as células submetidas à isquemia/reperfusão; em azul são as células tratadas com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (250  $\mu\text{g/mL}$ ). Foi considerado como critério de viabilidade a população contida em M1, que no controle representava um número de eventos <95% da população.

#### 4.2.4. Determinação dos níveis de KIM-1

A figura 26 mostra que os níveis de KIM-1 no sobrenadante de células do grupo controle positivo (68  $\text{ng/mg} \pm 2.732$ ) que sofreram com dano por isquemia e reperfusão mais que dobraram em relação ao grupo controle negativo (29.19  $\text{ng/mg} \pm 3.526$ ). A concentração de 125  $\mu\text{g/ml}$  de óleo essencial foi capaz de diminuir os níveis da molécula de KIM-1 de maneira significativa (22.24  $\text{ng/mg} \pm 2.598$ ) ( $p < 0,05$ ). Enquanto a concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$  não foi capaz de reduzir os níveis de KIM-1 em relação ao grupo controle positivo (I/R) (62.25  $\text{ng/mg}$ ).

**Figura 20:** Níveis de molécula de lesão renal KIM-1 no sobrenadante de células LLC-MK2.

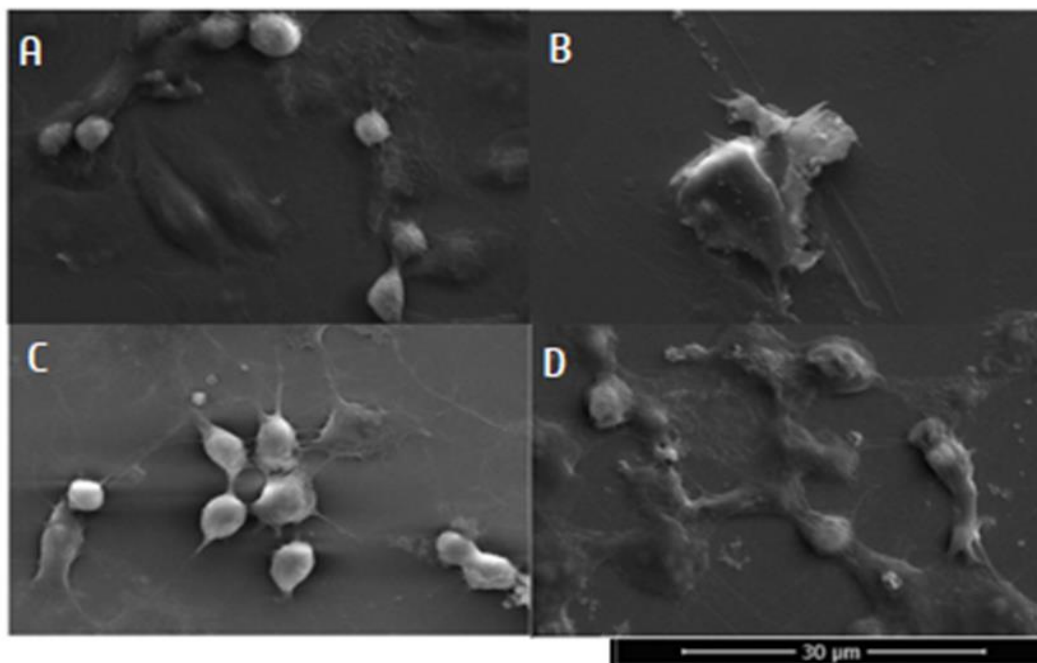


Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. CT- = controle negativo; CT+= controle positivo; I/R = Isquemia/reperfusão. Os dados analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. \*p<0,05 vs. controle; #p<0,05 vs. I/R.

#### 4.2.5. Microscopia eletrônica de varredura em células LLC-MK2

As alterações estruturais das células LLC-MK2 foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostrado na figura 21. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Células submetidas ao protocolo de lesão de I/R apresentaram alterações ultraestruturais, como retração do volume celular, formação de corpos apoptóticos por fragmentação citoplasmática e diminuição adesão à matriz extracelular. Os tratamentos com óleo de *Cymbopogon citratus* nas concentrações de 125 µg/ml e 250 µg/ml foram capazes de reverter parcialmente as alterações. A análise qualitativa e duplo-cego permitiu afirmar que esses resultados foram mais visíveis para as concentrações de 125 µg/ml.

**Figura 21:** Micrografias obtida por microscopia eletrônica de varredura de células renais LLC-MK2.



As imagens foram obtidas com o Microscópio Quanta 450 FEG-FEI ( $\times 3500$ )

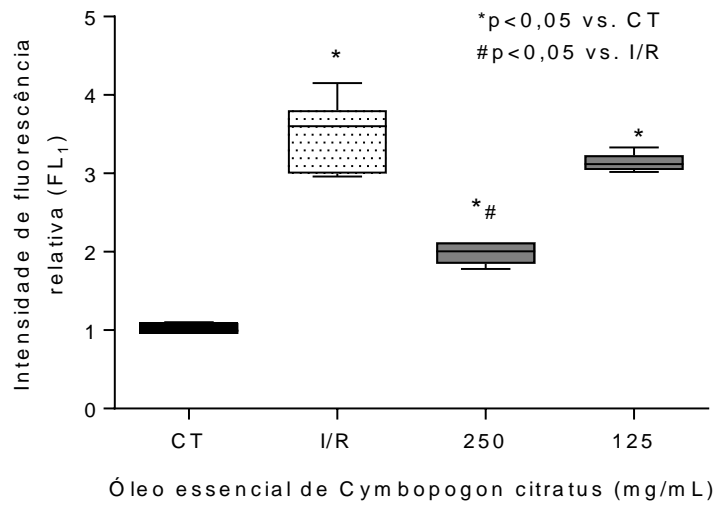
Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: A: Controle negativo; B: Controle positivo – células I/R; C: Tratamento –  $125\mu\text{g/ml}$  de OE de *Cymbopogon citratus*; D: Tratamento –  $250\mu\text{g/ml}$  de OE de *Cymbopogon citratus*.

#### 4.2.6. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio

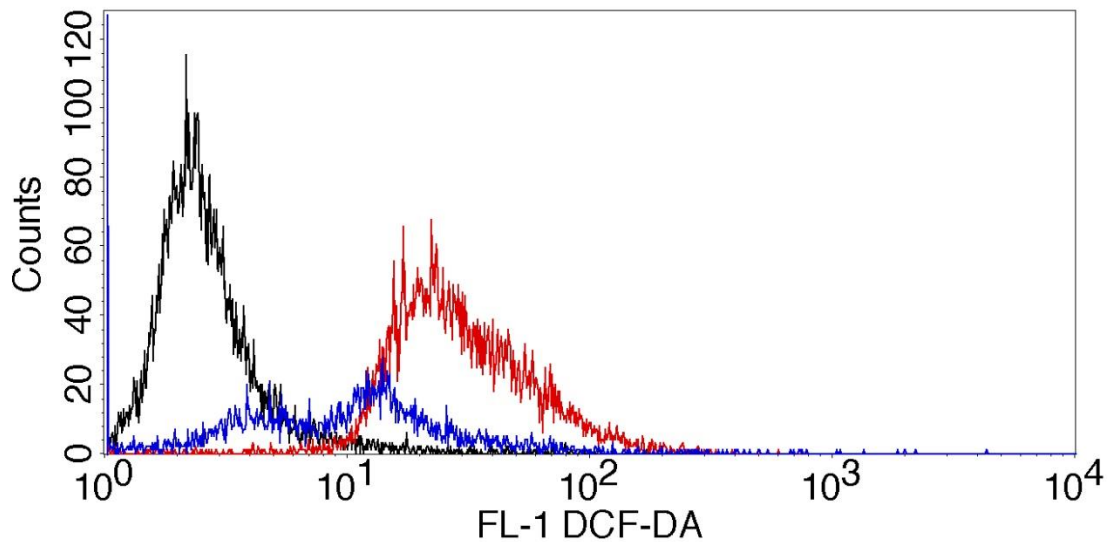
Para avaliar o potencial antioxidante do OE de *Cymbopogon citratus* foi utilizada o DCFH-DA para quantificar a produção de ERO intracelulares. Conforme ilustrado na figura 22, 23 e 24. Os níveis de ERO estiveram aumentados no grupo isquemia e reperfusão. O grupo I/R mais que triplicou a intensidade da fluorescência em relação ao grupo controle (345%) e apenas a concentração de  $250\mu\text{g/ml}$  foi capaz de atenuar o dano oxidativo celular de maneira significativa visto pela menor intensidade de fluorescência ( $p < 0,05$ ). A concentração de  $250\mu\text{g/ml}$  foi capaz de reduzir 43,3% a intensidade de fluorescência em relação ao grupo I/R.

**Figura 22:** Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo ensaio do DCFH (diclorofluoresceína).



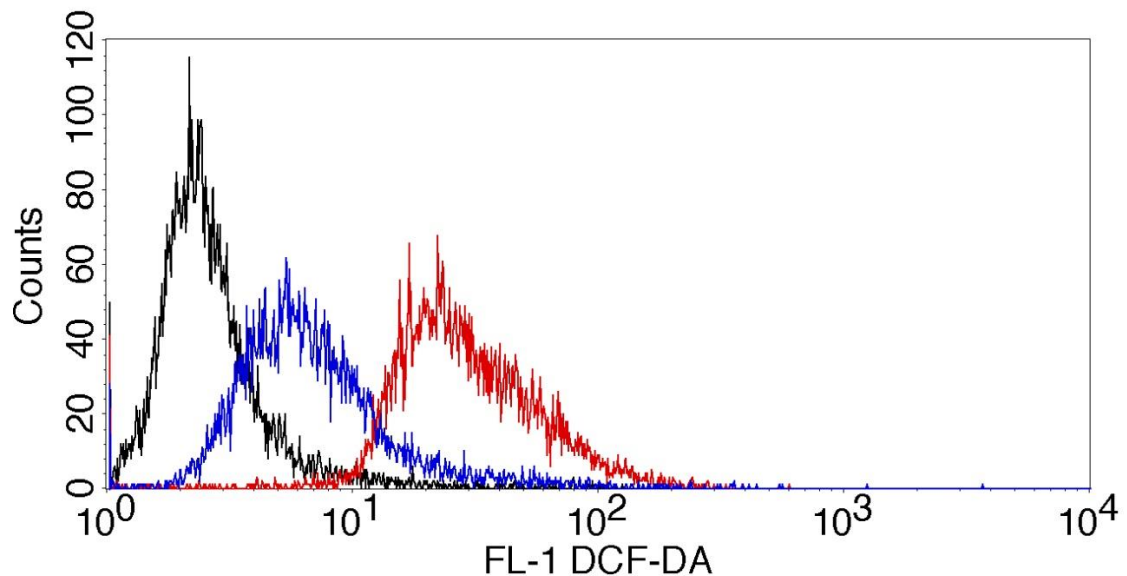
Foi atribuído peso 1 para a média geométrica da intensidade de fluorescência do controle no filtro FL1 e os demais grupos receberam valores proporcionais de intensidade fluorescência relativa.

**Figura 23:** Histograma representativo da análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracitoplasmáticas pelo ensaio do DCFH (diclorofluoresceína).



A população marcada pela linha preta representa o controle; em vermelho estão as células submetidas à isquemia/reperfusão; em azul são as células tratadas com o Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (125 µg/mL).

**Figura 24:** Histograma representativo da análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) intracitoplasmáticas pelo ensaio do DCFH (diclorofluoresceína).



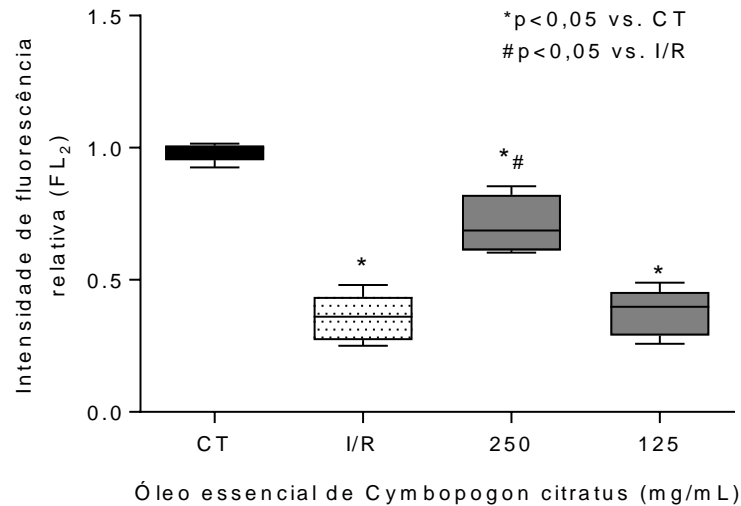
A população marcada pela linha preta representa o controle; em vermelho estão as células submetidas à isquemia/reperfusão; em azul são as células tratadas com o Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (250 µg/mL).

#### 4.2.7. Análise do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Com objetivo de avaliar os possíveis efeitos causados pela isquemia e reperfusão e ação do OE do *Cymbopogon citratus* sobre o potencial de membrana mitocondrial na produção de radicais superóxido, células tratadas e controles foram submetidas à marcação com a Rodamina 123. As figuras 25, 26 e 27 mostram a diminuição da emissão de fluorescência no grupo I/R em relação ao controle (64%) ( $p < 0,05$ ). As células tratadas com OE com a concentração de 250 µg/ml apresentaram significativamente menor alteração do potencial transmembrânico em relação ao grupo I/R. O tratamento na concentração de 250 µg/ml foi capaz de duplicar a intensidade de fluorescência.

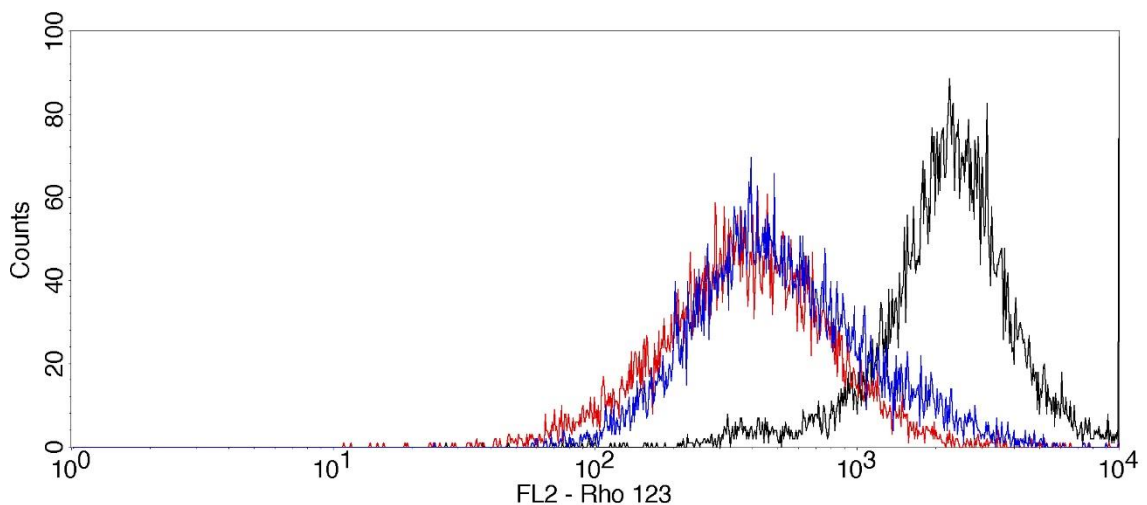


**Figura 25:** Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial pelo ensaio da Rodamina 123.



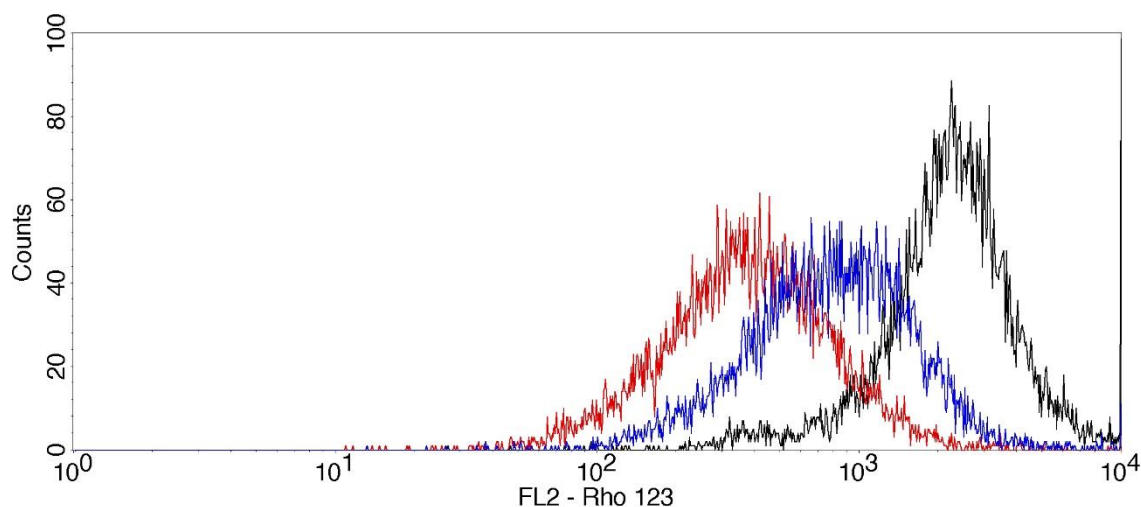
Foi atribuído peso 1 para a média geométrica da intensidade de fluorescência do controle no filtro FL2 e os demais grupos receberam valores proporcionais de intensidade de fluorescência do controle no filtro FL2 e os demais grupos receberam valores proporcionais de intensidade de fluorescência relativa.

**Figura 26:** Histograma representativo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Psi_m$ ) pelo ensaio da Rodamina 123.



A população marcada pela linha preta representa o controle; em vermelho estão as células submetidas à isquemia/reperfusão; em azul são as células tratadas com o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (125  $\mu$ g/mL).

**Figura 27:** Histograma representativo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Psi_m$ ) pelo ensaio da Rodamina 123.



A população marcada pela linha preta representa o controle; em vermelho estão as células submetidas à isquemia/reperfusão; em azul são as células tratadas com o Óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (250  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 4.3. Ensaio de Docking Molecular

Para analisar o potencial de interação entre os isômeros do citral, principal constituinte do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* com as proteínas Keap1 e Raf1, foi feito um estudo de *docking molecular* utilizando as ferramentas *Autodock tools* e *Autodock Vina*.

#### 4.3.1. Interação dos isômeros de citral com a proteína Keap1

A tabela 2 demonstra os parâmetros de pontuação dos isômeros do citral com a proteína Keap1. O isômero geranial (*trans*-citral) demonstrou uma maior energia livre de ligação, -5.1 kcal/mol e uma menor constante  $K_i$  de inibição, 159.47  $\mu\text{M}$  comparado ao seu isômero Neral (*cis*-citral), com valores de -4,8 kcal/mol e  $K_i$  de 289.68  $\mu\text{M}$ . Esses dados foram validados pelo programa *Autodock vina* (-5,8 kcal/mol e -5.1 kcal/mol respectivamente). Os resultados de *docking molecular* para o ligante co-cristalizado da proteína revelaram menores energia livres de ligação, -10,3 e -9,4 para *autodock tools* e *autodock vina* respectivamente com uma constante  $K_i$  de 28.24nM, bem inferior aos isômeros do citral.

**Tabela 2:** Lista de parâmetros de pontuação gerados a partir de encaixe molecular mostrando a interação entre a proteína Keap1 (PDB: 4IQK), isômeros do citral e ligante co-cristalizado à proteína.

<b>Ligante</b>	<b>Parâmetros gerados</b>	<b>Energia de ligação</b>
<b>Geranial (Trans-citral)</b>	Energia livre de ligação	-5.18 kcal/mol
	Energia intermolecular	-6.37 kcal/mol
	Ligações de vdW, hidrogênio + energia de dessolvatação + energia eletrostática	-6.19 kcal/mol
	Energia livre de torção	+1.19 kcal/mol
	Energia interna	-0.44 kcal/mol
	Constante de inibição, Ki	159.47 $\mu$ M
	Autodock Vina - Afinidade (Kcal/mol)	-5.8 kcal/mol
<b>Neral (Cis-citral)</b>	Energia livre de ligação	-4.83 kcal/mol
	Energia intermolecular	-6.02 kcal/mol
	Ligações de vdW, hidrogênio + energia de dessolvatação + energia eletrostática	-5.91 kcal/mol
	Energia livre de torção	+1.19 kcal/mol
	Energia interna	-0.48 kcal/mol
	Constante de inibição, Ki	289.68 $\mu$ M
	Autodock Vina- Afinidade (Kcal/mol)	-5.1 kcal/mol
<b>metoxibenzenosulfonamida (ligante co-cristalizado)</b>	Energia livre de ligação	-10,3 kcal/mol
	Energia intermolecular	-12,69 kcal/mol
	Ligações de vdW, hidrogênio + energia de dessolvatação + energia eletrostática	-12,52kcal/mol
	Energia livre de torção	+ 2.39 kcal/mol
	Energia interna	-2.92 kcal/mol
	Constante de inibição, Ki	28.24nM
	Autodock Vina- Afinidade (Kcal/mol)	-9.3 kcal/mol

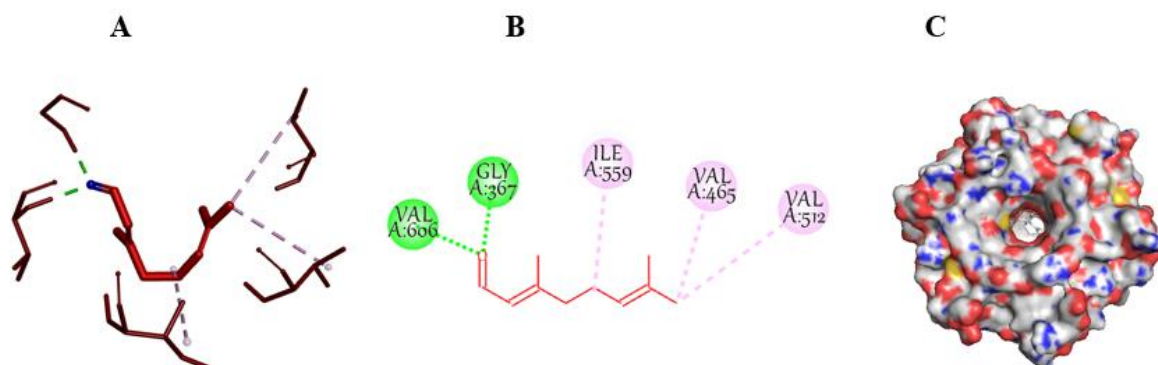
Além de quantificar os parâmetros de pontuação, foram analisados os tipos de interações intermoleculares a distância entre as ligações e os aminoácidos envolvidos entre a proteína Keap1, isômeros do citral e o ligante co-cristalizado. A tabela 3 mostra que tanto o Geranial como o Neral são capazes de formar 2 ligações de hidrogênio com a proteína Keap1 nos aminoácidos VAL 606 e GLY 367. Porém o isômero geranial apresentou 1 ligação hidrofóbica a mais comparada com o seu isômero neral. Quando comparado o potencial de ligação dos isômeros do citral com o ligante co-cristalizado, nota-se que os isômeros do citral ligaram-se a alguns aminoácidos comuns ao ligante co-cristalizado, indicando um potencial de ligação ao sítio ativo da proteína, para o geranial (GLY 367, ILE 559, VAL 465, VAL 512) e para o neral (GLY 367, VAL 465, ALA 366). Além disso, tanto o geranial, neral e o ligante se encontram exatamente na fenda de ligação da proteína (Figura 28 C e Figura 29 C).

**Tabela 3:** Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre os isômeros do citral, ligante co-cristalizado e a proteína Keap1.

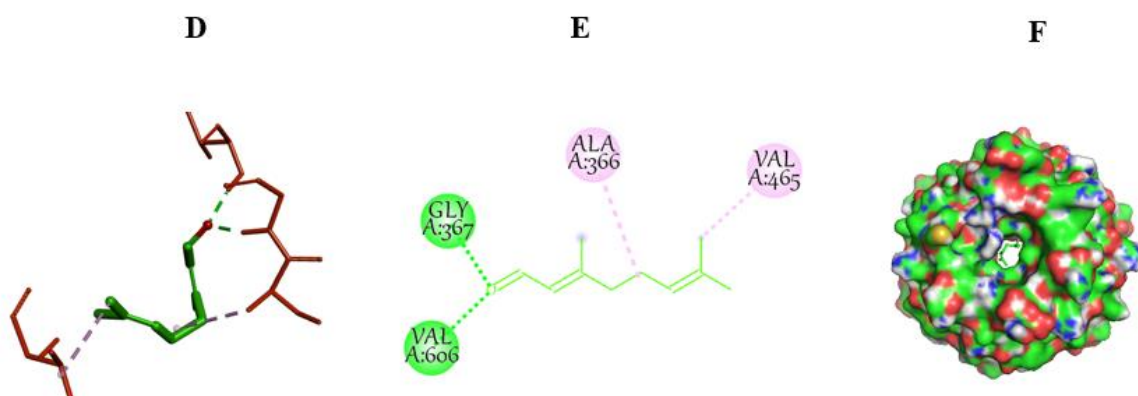
Ligante	Ligações de hidrogênio	Distância ( Å )	Ligações hidrofóbicas	Distância ( Å )
<b>Geranial (Trans citral)</b>	VAL 606	3,3	ILE 559	4,62
	GLY 367	4,21	VAL 465	5,57
			VAL 512	3,24
<b>Neral (Cis citral)</b>	VAL 606	4,44	ALA 366;	3,73
	GLY 367	3,17	VAL 465	3,74
<b>4 -metoxibenzosulfonamida (ligante co-cristalizado)</b>			VAL 512	5,66
	VAL 418;	3,15	ALA 366;	4,51
	GLY 367;	3,49	CYS 513	4,51
	ILE 559	4,72	GLY 558	4,65
			VAL 465	5,71
		VAL 606	3,90	

**Figura 28:** Complexos isômeros do citral e proteína Keap1 (Esquemas em 3D e 2D).

**Geranial (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O)**



**Neral (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O)**

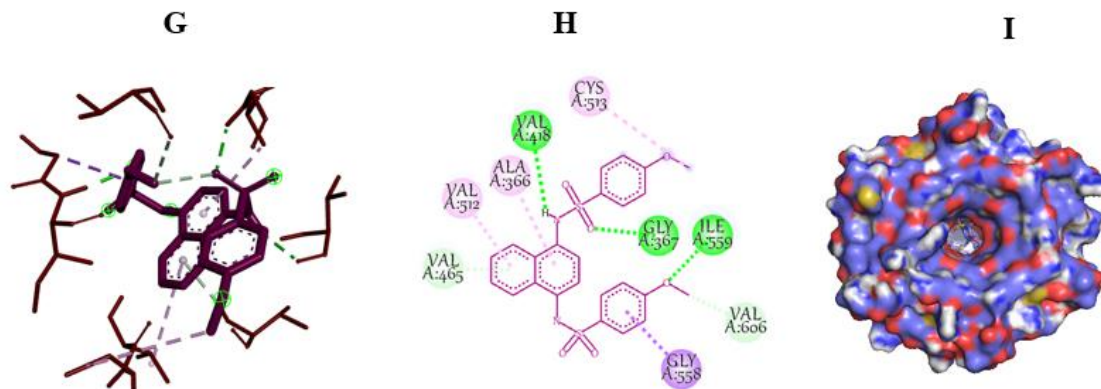


**Legenda:**

(A): Esquema 3D complexo geranial-Keap1; (B): Esquema 2D complexo geranial-Keap1; (C): Esquema proteína modelo “Surface” complexo geranial-Keap1; (D): Esquema 3D complexo neral-Keap1; (E): Esquema 2D complexo neral-Keap1; (F): Esquema proteína modelo “Surface” complexo neral-Keap1.

**Figura 29:** Complexos ligante co-cristalizado e proteína Keap1 (Esquemas em 3D E 2D).

#### 4- Metoxibenzenosulfonamida (C<sub>24</sub> H<sub>22</sub> N<sub>2</sub> O<sub>6</sub> S<sub>2</sub>)



Legenda:

(A): Esquema 3D complexo proteína co-cristalizada-Keap1; (B): Esquema 2D complexo proteína co-cristalizada-Keap1; (C): Esquema proteína modelo “Surface” complexo proteína co-cristalizada-Keap1.

#### 4.3.2 Interação dos isômeros de citral com a proteína Raf1

Para analisar o potencial dos isômeros do citral em interagir com a via Ras/Raf1/ERK foi feito um estudo de *docking molecular* para a interação com a proteína Raf1. Os resultados de energia livre de ligação podem ser observados na tabela 4. A energia livre de ligação para o geranial e neral revelou não haver diferença de afinidade entre os isômeros, -5.4 kcal/mol no *autodock tools* para ambos, com uma diferença não significativa para *autodock vina* (-6.3 kcal/mol e -6.4 kcal/mol respectivamente). O ligante co-cristalizado apresentou uma menor constante de inibição que os isômeros do citral (146.60 nM).

**Tabela 4:** Lista de parâmetros de pontuação gerados a partir de encaixe molecular mostrando a interação entre a proteína Raf1 (PDB: 3OMV), isômeros do citral e ligante co-cristalizado à proteína.

<b>Ligante</b>	<b>Parâmetros gerados</b>	<b>Energia de ligação</b>
<b>Geranial (Trans-citral)</b>	Energia livre de ligação	-5.4 kcal/mol
	Energia intermolecular	-6.59 kcal/mol
	Ligações de vdW, hidrogênio + energia de dessolvatação + energia eletrostática	-6.24 kcal/mol
	Energia livre de torção	+1.19 kcal/mol
	Energia interna	-0.43 kcal/mol
	Constante de inibição, Ki	110.98 $\mu$ M
	Vina- Afinidade (Kcal/mol)	-6.3 kcal/mol
<b>Neral (Cis-citral)</b>	Energia livre de ligação	-5.4 kcal/mol
	Energia intermolecular	-6.59 kcal/mol
	Ligações de vdW, hidrogênio + energia de dessolvatação + energia eletrostática	-6.32 kcal/mol
	Energia livre de torção	+1.19 kcal/mol
	Energia interna	-0.47 kcal/mol
	Constante de inibição, Ki	110.29 $\mu$ M
	Vina - Afinidade (Kcal/mol)	-6.4 kcal/mol

<b>(1E)-5-(1-piperidina-4-il-3-piridina-4-il-1H-pirazol-4-il)-2,3-di-hidro-1H-inden-1-1 oxima</b> <b>(ligante co-cristalizado)</b>	Energia livre de ligação	-9,32 kcal/mol
	Energia intermolecular	-10.52 kcal/mol
	Ligações de vdW, hidrogênio + energia de dessolvatação + energia eletrostática	-10.38 kcal/mol
	Energia livre de torção	+ 2.39 kcal/mol
	Energia interna	-0.91 kcal/mol
	Constante de inibição, Ki	146.40 nM
	Vina- Afinidade (Kcal/mol)	-7.5 kcal/mol

A análise de interações intermoleculares, distância de ligação e aminoácidos envolvidos entre a proteína Raf1, isômeros do citral e ligante co-cristalizado pode ser vista na tabela 5.

**Tabela 5:** Interações de hidrogênio e hidrofóbicas entre os isômeros do citral, ligante co-cristalizado e a proteína Raf1.

Ligante	Ligações de hidrogênio	Distância ( Å )	Ligações hidrofóbicas	Distância ( Å )	
<b>Geranial (Trans citral)</b>			TRP 423	5,37	
			TRP 423	5,54	
			TRP 423	5,78	
			PHE 475	4,54	
			PHE 475	5,70	
		SER 428	3.81	PHE 475	5,06
		LYS 431	4,66	CYS 424	3.74
				LEU 406	5,54
				ALA 373	7,72
				ALA 373	4.46
				ALA 373	5,0
				VAL 363	5,24
				ILE 355	5.44

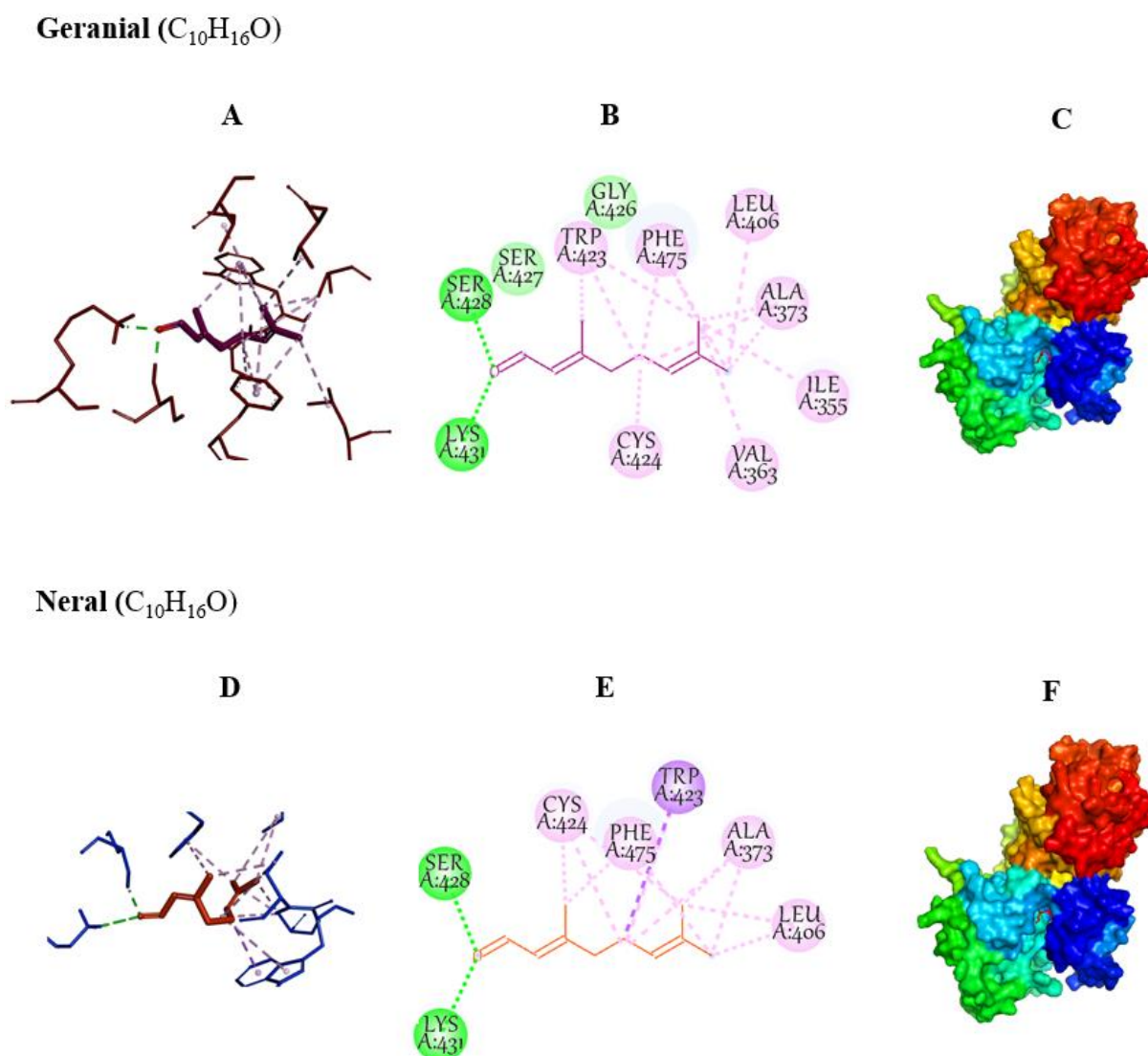


				3,65
			CYS 424	4,77
			CYS 424	3,40
			CYS 424	4,61
			PHE 475	4,01;
			PHE 475	4,87
			TRP 423	3,85
<b>Neral (Cis citral)</b>	SER 428	3.94	TRP 423	3,88
	LYS 431	5.09	ALA 373	5,1
			ALA 373	3,56
			ALA 373	4,93
			LEU 406	4,49
			LEU 406	
			VAL 363	4,47
			VAL 363	4,55
			VAL 363	6,17
			TRP 423	5,43
<b>(1E)-5-(1-piperidina-4-il-3-piridina-4-il-1H-pirazol-4-il)-2,3-di-hidro-1H-inden-1-1 oxima</b>	GLU 393	4,42	PHE 475	5,43
	CYS 424	4,30	ALA 373	5,88
<b>(ligante co-cristalizado)</b>	GLY 426	4.24	ALA 373	5,45
			ALA 373	6,21
			ILE 419	4,67
			LYS 375	3,50
			LYS 375	3,99
			GLY 426	4,75

Tanto o geranial como o neral são capazes de formar 2 ligações de hidrogênio na proteína Raf1 para os aminoácidos SER 428 e LYS 431. O isômero geranial apresentou uma ligação hidrofóbica a mais, porém apenas o isômero neral foi capaz de formar uma ligação Pi-sigma com o aminoácido TRP 343 (figura 30). O ligante co-cristalizado da proteína apresentou uma ligação de hidrogênio a mais que os isômeros do citral, além disso ele foi capaz de formar

ligações mais fortes do tipo van der waals (vdW) (Figura 31). Os isômeros do citral foram capazes de se ligar a vários aminoácidos em comum da proteína Raf1 comparado com o ligante co-cristalizado (CYS 424, TRP 423, PHE 475, ALA 373, VAL 365). As figuras 30 C e 31 C mostram que os isômeros do citral se ligam ao mesmo sítio do ligante co-cristalizado da proteína.

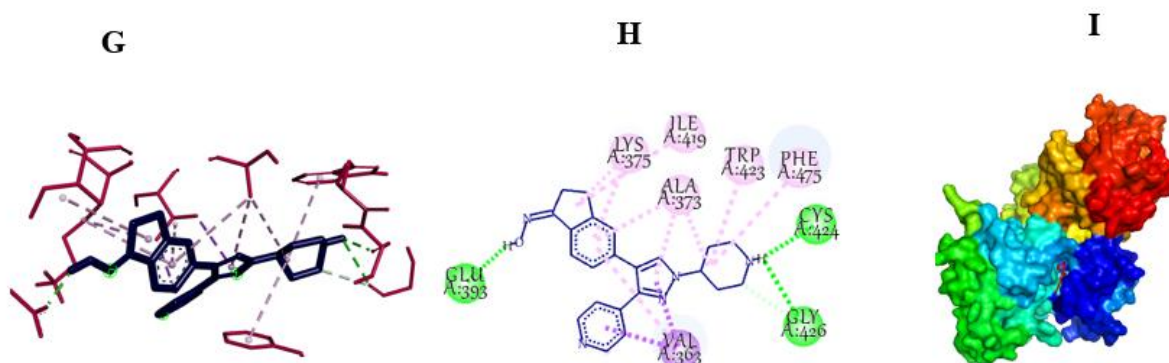
**Figura 30:** Complexos isômeros do citral e proteína Raf1 (Esquemas em 3D e 2D).



Legenda: (A): Esquema 3D complexo geranial-Raf1; (B): Esquema 2D complexo geranial-Raf1; (C): Esquema proteína modelo “Surface” complexo geranial-Raf1; (D): Esquema 3D complexo neral-Raf1 (E): Esquema 2D complexo neral-Raf1; (F): Esquema proteína modelo “Surface” complexo neral-Raf1.

**Figura 31:** Complexos ligante co-cristalizado e proteína Raf1 (Esquemas em 3D e 2D).

**(1E)-5-(1-piperidin-4-yl-3-pyridin-4-yl-1H-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one oxime** (C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O)



Legenda: (A): Esquema 3D complexo proteína co-cristalizada-Raf1; (B): Esquema 2D complexo proteína co-cristalizada-Raf1; (C): Esquema proteína modelo “Surface” complexo proteína co-cristalizada-Raf1.

#### 4.4. ADMET

As propriedades físico-químicas e toxicológicas dos isômeros do citral foram determinadas utilizando o banco de dados SwissADME e Emoltox. A fim de considerar os isômeros do citral bons candidatos a fármacos foram analisadas as regras dos 5 de Lipinski. A análise das tabelas 6 e 7 revelaram não haver diferenças significativas entre os isômeros do citral quanto suas propriedades físico-químicas. Ambos os compostos não violaram a regra dos 5 de Lipinski. Já a tabela 8 demonstrou não existir diferenças entre as características farmacocinéticas e toxicológicas entre os isômeros do citral. Os dados levantados mostram que o citral é uma molécula com boa biodisponibilidade e não é substrato para enzimas do citocromo P450. No entanto por ser uma molécula pequena e apolar ultrapassa a barreira hematoencefálica e pode se acumular no Sistema nervoso central tendo em vista que também não é substrato da glicoproteína P. O estudo teórico de toxicidade mostrou que o citral apresenta ser uma molécula segura, porém seus isômeros podem causar sensibilidade dérmica.

**Tabela 6:** Regra dos 5 de Lipinski para o isômeros do citral.

Isômero	Peso Molecular	iLogP	Doadores de Hidrogênio	Aceptores de Hidrogênio	Violações de Lipinski
Geranial (Trans-citral)	152,23g/ mol	2,51	0	1	0
Neral (Cis-citral)	152,23g/mol	2,47	0	1	0

**Tabela 7:** Propriedades físico-químicas dos isômeros do citral.

Isômero	Log S	Número de rotações	Tensão em área de superfície polar (TPSA)
Geranial	-2.43	4	17.07 Å <sup>2</sup>
Neral	-2.43	4	17.07 Å <sup>2</sup>

**Tabela 8:** Propriedades ADMET para os Isômeros do citral.

Farmacocinética								
	Absorção	Permeabilidade	Substrato Gp-	Inibidor CYP				
	GI	BHE	P	1 <sup>a</sup> 2	2C19	2C9	2D6	3A4
Geranial	Alta	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Neral	Alta	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade								
	Hepática	Renal	Carcinogênese	Mutagênese		Sensibilização dérmica		
Geranial	Não	Não	Não	Não		Sim		
Neral	Não	Não	Não	Não		Sim		

# Discussão

## 5. DISCUSSÃO

A injúria por isquemia e reperfusão é a principal causa de lesão renal aguda, com alta morbimortalidade e apresenta relação de progressão para doença renal crônica (ARFIAN et al., 2019). A ausência de tratamento específico motiva a busca por moléculas capazes de proteger o tecido contra a inflamação e o dano oxidativo. Sabe-se que a reperfusão principal opção de tratamento agrava a lesão por causar um aumento do estresse oxidativo e consumir a defesa antioxidante celular (PEI et al., 2020). O estresse oxidativo potencializa os processos inflamatórios e tem sido implicado na progressão e desenvolvimento de doenças renais graves (REZK et al., 2021).

Nesse contexto, o presente trabalho mostrou que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi capaz de reduzir o dano renal causado pela isquemia seguida de reperfusão em linhagem de células LLC-MK2.

Apesar de não reconhecer exatamente os mecanismos da lesão renal por isquemia e reperfusão, alguns trabalhos demonstraram o efeito protetor contra esse tipo de lesão (LIANG, et al., 2020). Nesse estudo, avaliamos efeito citoprotetor do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, cujo principal constituinte é um monoterpeneo citral, mistura dos isômeros geranial e neral. Para esse modelo experimental foram utilizadas células epiteliais tubulares proximais da linhagem LCC-MK2 com objetivo de mimetizar de maneira confiável e reprodutível o dano causado pelo processo de isquemia e reperfusão. Modelos in vitro provaram ser úteis para determinar as respostas de populações de células únicas a I / R. Embora existam limitações, devido à ausência de outras populações de células e condições ambientais não fisiológicas, os modelos in vitro mostraram um nível notável de consistência na reprodução as respostas fenotípicas dos tecidos à I/R (GRANGER; KVIETYS, 2015).

Nesse estudo o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi constituído principalmente por 90,88% de citral, um aldeído monoterpênico revelado pela GC/MS. ALMEIDA et al. (2018) encontrou resultados semelhantes, 89,57% de citral no óleo de *Cymbopogon citratus* após análise por GC/MS. Outros trabalhos encontraram 82,55% (BAYALA et al., 2018), 79,6% (GONZALES et al., 2020).

Durante a I/R, ERO como superóxido e peróxido de hidrogênio intracelulares são gerados pela NADPH oxidase e mitocôndrias disfuncionais. Essas espécies reativas de oxigênio causam lesão celular tubular por oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, danos ao DNA e

apoptose (BARBOSA et al., 2010). As células tubulares proximais são as mais suscetíveis a lesão por I/R pois são metabolicamente muito ativas e possuem maior conteúdo mitocondrial (BEACH et al., 2020). A disfunção da bomba  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPase contribui para entrada de sódio,  $\text{H}_2\text{O}$ , cálcio, formação da xantina oxidase, maior estresse oxidativo, edema citotóxico e morte celular (HOSSZU; FEKETE; SZABO, 2020). Nesse modelo experimental, a lesão por I/R foi capaz de diminuir a viabilidade celular assim como visto em concentrações mais elevadas do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

O citral, componente majoritário do óleo essencial *Cymbopogon citratus*, é considerado como principal responsável pelas atividades atribuídas ao óleo (SILVA; RECK; FONSECA, 2016). Alguns trabalhos têm demonstrado o seu potencial citotóxico em concentrações mais elevadas. Estudos revelaram que o citral é capaz de promover apoptose por conta própria, e aumentar a citotoxicidade de algumas drogas em concentrações acima daquelas com papel antioxidante e antiinflamatório (DANGKONG; LIMPANASITHIKUL, 2014; FANG et al., 2017).

Além disso, um ensaio prévio demonstrou que tanto o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* como seu componente majoritário citral são capazes de ter efeito citotóxico em células tumorais (BAYALA et al., 2018). Nesse estudo apenas as concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  foram citotóxicas sobre a linhagem utilizada, enquanto as concentrações de 125 $\mu\text{g/mL}$  e 250 $\mu\text{g/mL}$  de óleo essencial promoveram um aumento da viabilidade celular e, portanto, um potencial efeito citoprotetor contra a I/R. No entanto deve ser levado em conta as limitações dos ensaios de citotoxicidade por meio de viabilidade celular (RISS et al., 2004).

O ensaio de MTT avalia a atividade das esterases mitocondriais e citoplasmáticas como uma medida indireta de células viáveis. Para reduzir as chances de super ou subestimar a toxicidade e confirmar os valores aqui obtidos foi utilizado outra metodologia, o 7-Aminoactinomicina D (7-AAD), é um corante de DNA que distingue células viáveis, apoptóticas / mortas em citometria de fluxo (ZEMBRUSKI et al., 2012). O método de 7-AAD pode determinar morte celular de forma mais sensível do que outros métodos para viabilidade celular (VARAN et al., 2019). Os resultados obtidos por essa técnica são semelhantes ao encontrado pelo MTT e corroboram com os achados citoprotetores do óleo essencial *Cymbopogon citratus* nas doses descritas acima.

O efeito citoprotetor também foi visto em outros trabalhos. Posteriormente foi demonstrado a potencial ação antioxidante do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em células mononucleares de sangue periférico humano (JAMUNA et al., 2017). O citral apresentou efeito protetor contra citotoxicidade por aspirina em células epiteliais de intestino

delgado de ratos (BOUZENNA et al., 2017) além de seus efeitos *in vivo* também serem alvos de estudos. MOTA et al. (2020) demonstrou que o citral também foi capaz prevenir o estresse oxidativo sistêmico induzido por CFA em ratos.

A citoproteção do OE de *Cymbopogon citratus* também foi avaliada por meio do KIM-1. KIM-1 (Kidney Injury Molecule -1) é uma proteína transmembrana que está presente no túbulo renal proximal e é super regulada na ocorrência de uma lesão em células epiteliais tubulares proximais, sendo assim considerada um sensível marcador de lesão tubular proximal (MAGRO; VATTIMO, 2007). Estudos prévios mostram que esse marcador pode ser uma molécula de sinalização importante para o reparo celular durante as lesões tubulares e ser capaz de regular processos como fagocitose, autofagia e apoptose (GOU et al., 2016). Danos tóxicos e isquemia nos rins causam morte celular apoptótica das células epiteliais tubulares (TAVARES et al., 2020). Quando as células tubulares mortas sofrem apoptose elas expressam em sua superfície o KIM-1. Esse marcador age como receptor fagocítico de células apoptóticas que deverão ser substituídas durante o reparo celular (ZHANG; CAI, 2016). Estudos mostram que KIM-1 é um marcador sensível para lesão tubular proximal de causa tóxica e isquêmica (SAMPAIO et al., 2016). Portanto esse marcador foi analisado no sobrenadante de células LLC-MK2 neste estudo para avaliação da citoproteção do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Nesse estudo, foi visto que o tratamento com a concentração de 125µg/mL de OE de *Cymbopogon citratus* foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis de KIM-1 após a I/R, enquanto que a concentração de 250 µg/mL de OE de *Cymbopogon citratus* não reduziu os níveis desse marcador. Esses dados foram complementados com a MEV.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi capaz de atenuar o dano celular causado pela isquemia e reperfusão e atenuar parcialmente essas alterações. A concentração de 125µg/mL apresentou maior efeito reparador sobre as alterações ultraestruturais corroborando com os resultados do KIM-1.

Para analisar a capacidade o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em reduzir o estresse oxidativo celular, foi utilizado um ensaio com corante fluorescente DCFH-DA. O ensaio com DCFH-DA demonstrou a capacidade do óleo em reduzir as espécies reativas de oxigênio intracelular. Esse efeito pode justificar parcialmente sua ação citoprotetora, já que o efeito antioxidante do óleo foi visto apenas nas concentrações de 250µg/mL. Esses resultados são complementados com os encontrados pelo estudo da análise do potencial transmembrânico mitocondrial.

A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (BARBOSA et al., 2010). Durante a isquemia e reperfusão há uma



disfunção mitocondrial e um aumento de ERO (BEACH et al., 2020). A diminuição da oferta de oxigênio durante a isquemia inibe a fosforilação oxidativa e, portanto, diminui a produção de adenosina trifosfato (ATP) pela mitocôndria. A célula é incapaz de manter sua função e o gradiente transmembrana é neutralizado, induzindo o aumento do influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), o que culmina em excitotoxicidade. O dano mitocondrial ocorre pela degradação dos fosfolipídios e por produtos da degradação lipídica. Essas mudanças são acompanhadas pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), que dissipa o potencial da membrana e prejudica ainda mais a produção de ATP (BORGES et al., 2019).

Nesse estudo para avaliar a mudança do potencial transmembrânico mitocondrial foi utilizada a Rodamina 123. As células que sofreram isquemia e reperfusão com o aumento do estresse oxidativo celular apresentaram disfunção mitocondrial com alteração do seu potencial transmembrânico. Esse feito foi suprimido pelo uso do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ , concentração essa, onde o óleo apresentou atividade antioxidante. Substâncias que agem como antioxidantes são capazes de melhorar o potencial transmembrânico.

Neste estudo nota-se que o efeito citoprotetor do OE de *Cymbopogon citratus* é visto também em concentrações ausentes de efeito antioxidante. A concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$  apresentou um efeito reparador na MEV e diminuição de molécula renal KIM-1.

Apesar do citral poder promover o estresse oxidativo, evidências mostram que ele também pode atuar como anti-inflamatório e antioxidante de forma concentração-dependente (BAILLY, 2020). Vários modelos experimentais demonstram o potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante dessa molécula. O citral foi capaz de inibir a produção de óxido nítrico e expressão de INOS e Fator de transcrição NF- $\kappa$ B induzida por LPS (LEE et al., 2008). Também foi responsável por diminuir os níveis de citocinas pró inflamatórias TNF alfa, IL 1 $\beta$  e IL 6 (SONG et al, 2016; EMÍLIO-SILVA et al., 2020). Katsukawa et al. (2010) atribuiu ao citral o potencial do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em ativar PPAR- $\gamma$  (receptor ativador de peroxissoma gama) e PPAR- $\alpha$  (receptor ativador de peroxissoma alfa) e suprimir a expressão da COX-2 (ciclooxigenase 2).

Além disso, o citral demonstrou um potencial de modular algumas vias importantes dentro da ativação do processo inflamatório e estresse oxidativo (KA et al., 2015). Estudos prévios demonstraram que o citral foi capaz de aumentar expressão de Nrf2, e suprimir a fosforilação de algumas proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) relacionadas ao estresse oxidativo e proliferação celular e apoptose, como ERK, JNK e p38 (YANG et al, 2013).

Esses dados encontrados na literatura motivaram a análise da interação entre os isômeros do citral, e essas vias de sinalização. Estudos recentes têm demonstrado o potencial do citral em modular o fator de transcrição Nrf2. O fator de transcrição Nrf2 é considerado citoprotetor e responsável pelo aumento da expressão de diversas enzimas antioxidantes em resposta a agentes oxidantes e eletrófilos (LI et al., 2008). Uma das formas de modular a ativação da Nrf2 é através da proteína Keap1. A Nrf2 está ligada à sua proteína repressora Keap1 no citosol, promovendo a sua degradação por ubiquitinação. Substâncias capazes de inibir a ligação da Keap1 a Nrf2 são capazes de promover um aumento da atividade de enzimas antioxidantes por liberar a Nrf2 ao núcleo (YAO et al., 2020). Resultados prévios mostraram que substâncias naturais capazes de aumentar a ativação da via Nrf2 apresentam um efeito protetor após a lesão por isquemia e reperfusão (ZHAO et al., 2019).

Um ensaio *in silico* de *docking molecular* foi utilizado como ferramenta para avaliar a potencial interação entre os isômeros do citral e a proteína repressora Keap1. No presente estudo houve uma diferença entre as pontuações de encaixe e número de ligações intermoleculares entre os isômeros do citral. O geranial apresentou energia livre de ligação maior e uma ligação hidrofóbica a mais que o seu isômero neral. Alguns trabalhos já demonstraram diferenças de atividades em relação a esses isômeros. Nakamura et al. (2003) revelou que o geranial, mas não o neral, é capaz de induzir o aumento de glutathione transferase e atribui esse efeito a potencial ativação da via Nrf2. A diferença de bioatividade entre os isômeros também foi vista em outros estudos. Liao et al. (2015) mostrou que o neral apresentou maior inibição da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 e expressão de mediadores inflamatórios INOS, COX 2 que o seu isômero geranial.

Um estudo de *docking molecular* realizado com 178 compostos para a proteína Keap1 demonstrou que compostos com oxigênio abundantes, glicosídeos e energia livre de ligação  $> -6$  kcal/mol possuem um maior potencial de ativar a via Nrf2 através da inibição da Keap1 (LI et al., 2019). No presente estudo encontramos energias livres de ligação relativamente baixas dos isômeros do citral para proteína Keap1 ( $< -6$  kcal/mol). O ligante cristalizado à proteína apresentou alta energia livre de ligação (-10,3 kcal/mol e -9,4 kcal/mol) para *autodock tool* e *vina*, respectivamente, e uma constante de inibição bem inferior a nível nanomolar em relação aos isômeros do citral, micromolar.

Outro estudo de *docking molecular* direcionada à proteína Keap1 foi realizado para os componentes majoritários do extrato metanólico de *Cymbopogon citratus* e foi identificado nesse estudo flavonoides com altas energia livre de ligação, Apigenina (-9,1 kcal/mol), Ácido clorogênico (-9,3 Kcal/mol), Kaemperol (-9,5 Kcal/mol), Luteolina (-9,2 Kcal/mol), Quercetina

(-9,5 Kcal/mol) para proteína Keap1 (ELEKOFEHITIN; ONUNKUN; OLALEYE, 2020). Esse mesmo estudo demonstrou que esses flavonoides se ligam a aminoácidos em comum aos isômeros do citral mostrados neste trabalho. Apigenina e o Kaemperol fazem duas ligações de hidrogênio com os aminoácidos VAL 606 e GLY 367, assim como geranial e neral. Um outro estudo de *docking molecular* realizado na China com 17 compostos com potencial ativação da via Nrf2 revelou que a ligação ao aminoácido ILE 559 era comum e atribuiu a essa ligação a potencial ativação da Nrf2 (LI et al., 2020). É importante destacar que neste presente estudo apenas o isômero geranial apresentou ligações hidrofóbicas com esse aminoácido em questão. Esses dados levantados corroboram com o fato do isômero geranial potencialmente ser o isômero ativo capaz de interagir com Keap1.

Uma questão importante que precede o *docking* é reconhecer o sítio ativo da proteína. Essa determinação é geralmente realizada com a co-cristalização de um ligante na proteína seguida da determinação da posição experimental desse ligante por cristalografia. Assim, em geral, considera-se o volume em torno do ligante co-cristalizado como sendo a região ativa da proteína (MORRIS et al., 1999).

No presente estudo foi demonstrado que os isômeros do citral possuem aminoácidos em comum ao ligante co-cristalizado da proteína. A capacidade dos isômeros do citral de se ligarem a mesmo sítio de ligação de outras moléculas ativadores de Nrf2, sugere o seu potencial de ativar essa via. Além disso estudos mostram o potencial do citral em ativar a via Nrf2.

Logo, esses dados sugerem o potencial efeito citoprotetor do citral através da inibição da toxicidade direta sobre células renais. Ka et al. (2015) mostrou que o citral é capaz de atenuar o dano causado por nefrite lúpica em camundongos por meio da ativação da via Nrf2. Corroborando com esse achado, YANG et al. (2013) mostrou o efeito nefroprotetor do citral contra a glomeruloesclerose segmentar através da ativação da via Nrf2. A baixa energia livre de ligação e poucas ligações de hidrogênio e hidrofóbicas vistas neste estudo para os isômeros do citral revela uma baixa possibilidade do citral ser um inibidor do complexo Keap1-Nrf2. No entanto, isso não exclui totalmente a sua possibilidade de ativar a via Nrf2. Alguns compostos eletrofílicos de origem natural ativam os genes regulados por Nrf2-ARE e aumentam a resposta citoprotetora (MOU et al., 2020). Nakamura et al. (2013) demonstrou que o isômero geranial pode agir como eletrófilo, sendo capaz de reagir com nucleófilos como grupos tióis da glutatona. Dessa forma, existe a possibilidade do citral agir como um eletrófilo e ligar-se a grupos tióis da Keap1, liberando a Nrf2 para o núcleo. Apesar do estudo com agentes eletrófilos ativadores Nrf2 serem promissores, sua baixa seletividade a grupos tióis de cisteína da Keap1 é uma limitação importante (MOU et al., 2020).

Além do aumento de enzimas antioxidantes, enzimas de desintoxicação de fase II, a ativação da via Nrf2 é capaz de modular fatores de transcrição e vias de sinalização importantes dentro do processo inflamatório. A regulação positiva de Nrf2 é capaz de suprimir o fator de transcrição NF- $\kappa$ B inibir Ras e MAPK (AHMED et al., 2017). As famílias de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) presentes em todas as células eucarióticas permitem respostas coordenadas e integradas a diversos estímulos. As vias MAPK, uma vez ativadas, exercem efeitos importantes na fisiologia celular (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012). Essas vias estão implicadas em vários processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, sobrevivência celular, motilidade celular, metabolismo, resposta ao estresse e inflamação. Os mamíferos expressam múltiplas vias MAPK, maioria ativadas juntos com fator NF- $\kappa$ B recrutados por estresse e estímulos inflamatórios. Portanto, essas vias representam alvos importantes em potencial para novos medicamentos anti-inflamatórios (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012). Evidências mostram o potencial efeito protetor de alguns agentes capazes de suprimir a fosforilação de algumas MAPK durante a isquemia e reperfusão (ZHU et al., 2017).

A via ERK (quinases extracelulares reguladas por sinal) é um dos membros da família MAPK, e desencadeia a ativação da NADPH oxidase (NOX), que produz grandes quantidades de ERO, responsável pela formação de estruturas de DNA em forma de malha, composta por proteínas granulares e nucleares liberada dos neutrófilos chamada de NET (*Neutrophil Extracellular Traps* – Armadilha Extracelular de Neutrófilos). Evidências demonstram que a formação das NETs estão envolvidas no dano por isquemia e reperfusão renal (MELO et al., 2020). A supressão da fosforilação da ERK poderia resultar em uma diminuição da explosão oxidativa visto na lesão por isquemia e reperfusão. Uma das formas de modular a fosforilação da ERK é por meio da via Ras/Raf1/ERK (MCKAY; MORRISON, 2007). Essa via também tem sido relacionada com a ativação de processos pró apoptóticos. Estudos recentes mostram que ativação da via RAS/RAF1/MEK/ERK está envolvida na ativação da proteína p53 (YANG et al., 2021). Essa proteína pode induzir apoptose mitocondrial aumentando fatores pró apoptóticos vistos na lesão por I/R, de forma que substâncias capazes de inibir sua ativação apresentam efeito protetor (LIU et al., 2020).

Neste estudo observamos o grau de interação dos isômeros do citral com a proteína Raf1. Os resultados desse presente estudo mostraram que os isômeros do citral possuem maior afinidade à proteína Raf1 que à Keap1, visto as energias livre de ligação calculadas com as ferramentas *autodock tools* e *autodock vina*. Além disso, é possível analisar o maior número de ligações hidrofóbicas vistas entre os isômeros do citral e a proteína Raf1. Neste trabalho não encontramos diferenças de energia de ligação para os isômeros do citral. Por outro lado, Liao

et al. (2015) demonstrou uma inibição mais significativa da fosforilação da ERK para o geranial que para o seu isômero neral. É importante destacar que a ERK pode ser ativada de maneira independente da via Ras/Raf1/ERK (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012).

Quando comparado ao ligante co-cristalizado da proteína, os isômeros do citral tiveram vários aminoácidos em comum. Esses dados mostram que os isômeros do citral podem se ligar ao sítio ativo da proteína. Um estudo de *docking molecular* realizado por Jin et al. (2013) para uma droga com potencial capacidade de ser um inibidor da Raf1 mostrou que ela se ligou a aminoácidos em comum aos isômeros do citral. Inclusive formando duas ligações de hidrogênio, sendo uma com o aminoácido LYS431, vistas também no geranial e neral, porém com distância inferior às encontradas neste estudo, de 2,34 Å. Assim como nesse estudo, houve também 3 ligações hidrofóbicas com o aminoácido TRP 423 vistas no geranial e duas sendo uma ligação pi-sigma vistas no neral. Apesar da fosforilação da ERK está envolvida na explosão oxidativa vista nos danos por isquemia e reperfusão, não se conhece bem o papel da Ras/Raf1 nesse contexto. Feng et al. (2020) mostrou o papel da Raf1 na transição epitélio-mesenquimal e sua contribuição para fibrose intersticial renal.

Alguns estudos mostraram que o citral é capaz de suprimir a fosforilação não só da ERK, mas também foi capaz de suprimir a fosforilação de outras MAPK independentes de Ras/Raf1. SUBRAMANIYAN; NATARAJAN. (2017) revelou que o citral suprimiu significativamente a expressão de ERK-1, JNK e p38 em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) induzido por alta concentração de glicose. A desregulação da Raf/MAPK é bem elucidada em vários cânceres humanos, e os inibidores da Raf1 são pesquisados para fins antitumorais (JIN et al., 2013). O citral, molécula analisada neste estudo também apresenta mecanismos antitumorais conhecidos (BAILLY, 2020). Evidências recentes mostraram um novo mecanismo molecular do citral para atenuar a progressão de células cancerosas. Naz et al. (2018) demonstrou, através de dinâmica molecular e ligação de fluorescência, que o citral é capaz de inibir a atividade enzimática da proteína quinase 4 reguladora de microtúbulos (MARK4) e formar um complexo bastante estável com essa proteína. Esse mesmo estudo revelou energias livre de ligação para *autodock tools* e *autodock vina* inferiores às encontradas nesse presente trabalho para Raf1, -5,1 kcal/mol e -5,6 kcal/mol respectivamente. A análise teórica dos isômeros do citral mostrou energia ligação razoável para proteína Raf1, -6,3kcal/mol para o geranial e -6,4kcal/mol para o neral. A sua capacidade de ligação ao sítio ativo da proteína e por possuir aminoácidos em comum com outros inibidores de Raf1 os postula como potenciais moduladores dessa proteína.

Além de analisar as diferentes interações dos isômeros do citral com as proteínas Keap1 e Raf1, foi analisado as características cinéticas e tóxicas desses isômeros. Os resultados a partir de banco dados não mostraram diferenças significativas relacionado aos aspectos ADMET e físico-químicos entre esses isômeros. Os parâmetros físico-químicos analisados como número de átomos doadores de hidrogênio ( $\leq 5$ ), número de átomos aceptores de hidrogênio ( $\leq 10$ ), coeficiente de partição,  $\log P$  ( $\leq 5$ ), além da massa molecular ( $\leq 500\text{g/mol}$ ) atendem a regra dos 5 de Lipinski portanto o citral apresenta uma molécula com boa biodisponibilidade. No entanto, o citral possui algumas limitações. O citral é um composto quimicamente frágil, pouco solúvel em água e instável contra o calor, ar, luz e pH ácido (BAILLY, 2020; BHAT et al., 2020). Para estabilizar o citral nessas condições sistema encapsulados são projetados. Numerosas formulações contendo citral foram propostas, como complexos de inclusão com ciclodextrinas (CAMPOS et al., 2019), nano-fibras (AYTAC et al., 2018) e diversas outras nano-formulações, incluindo nanopartículas lipídicas sólidas revestidas com drogas estáveis (ZIELINSKA et al., 2018).

Neste estudo, através de um banco de dados revelou que os isômeros do citral potencialmente não são capazes de inibir a CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4. Em contraponto, um estudo *in vivo* com óleo de *Cymbopogon citratus* mostrou que esse óleo é capaz de inibir a CYP1A1 e 3A (LI et al., 2018). Além disso Seo et al. (2008) em seu trabalho mostrou que o citral pode inibir fortemente a hidroxilase CYP2B6 em microsomas de fígado humano. Essas informações levantadas são importantes para se entender que os estudos *in silico* pode ter limitações e discordância com os resultados *in vivo* e *in vitro*.

Quanto à toxicidade, os resultados mostram que o citral é relativamente seguro em doses farmacologicamente ativas. Um trabalho prévio mostrou que um tratamento com 200 mg/kg durante 5 semanas foi bem tolerado em ratos onde o citral apresentou efeito nefroprotetor (KA et al., 2015). O citral foi testado *in vivo* até 500 mg/kg em camundongos com danos ao fígado induzidos por acetaminofeno. O citral reduziu drasticamente a lesão hepática e não apresentou hepatotoxicidade (UCHIDA et al., 2017). Um estudo de toxicidade com o citral realizado pelo programa nacional de toxicologia dos EUA, concluiu que não há evidência de carcinogenicidade do citral em ratos expostos por dois anos (RESS et al., 2003). Além desses achados, o estudo teórico dos isômeros do citral mostrou que essas moléculas podem causar sensibilização a pele. Os óleos essenciais são muito utilizados como óleos para massagem e para fins de aromaterapia por causa da fragrância dos seus terpenos voláteis. No entanto, muitos desses terpenos são capazes de se auto oxidar e gerar formação hidroperóxidos altamente sensibilizantes a pele (HAGVAL; CHALKIDIS, 2020). Os isômeros do citral são exemplos

disso. Ambos os isômeros geranial e neral são capazes de agir como haptenos e causar dermatite de contato (HAGVAL et al., 2012).

Dessa forma, os dados do presente trabalho sugerem que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentam um efeito citoprotetor contra o dano renal causado por isquemia seguida de reperfusão. A molécula ativa do óleo possivelmente é o citral, componente majoritário que é capaz de ser antioxidante e antiinflamatório e reduzir a expressão da molécula de lesão renal KIM-1 a depender da concentração utilizada. Algumas vias de sinalização podem justificar seus efeitos e devem ser melhor estudadas. Esse estudo corrobora com dados encontrados na literatura que demonstram o geranial ser a possível molécula ativa do citral capaz de agir como eletrófilo e ativar a via Nrf2. Por outro lado, o isômero neral também se mostra uma molécula ativa em outras circunstâncias. A literatura mostra que ambos os isômeros podem interagir com a via ERK/MAPK. Esse estudo demonstrou um potencial papel modulador de ambos os isômeros para proteína Raf1, essa interação pode estar implicada no efeito citoprotetor visto na concentração 125ug/ml de OE. Novos estudos devem ser feitos para entender o papel dessa proteína no dano por isquemia e reperfusão. Por fim, o citral apresenta-se uma molécula segura e com grande potencial terapêutico nesse modelo de estudo.

# Conclusão



## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o efeito citoprotetor do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na injúria renal aguda em modelo de isquemia e reperfusão. Esse efeito pode ser atribuído principalmente ao seu componente majoritário, citral, capaz de diminuir a formação de ERO intracelulares e atenuar mudança de potencial transmembranico mitocondrial além de diminuir a morte celular, critério avaliado através dos níveis do marcador de lesão renal KIM-1. Além disso, esse estudo demonstrou que o OE *Cymbopogon citratus* pode ser citoprotetor mesmo em concentrações com ausência de efeito antioxidante.

A análise teórica dos isômeros do citral através de ensaios *in silico* mostrou que parece haver uma pequena diferença de bioatividade entre os isômeros, geranial e neral para proteína Keap1 o que não foi visualizado para proteína Raf1. Os resultados encontrados mostraram que o citral potencialmente tem uma maior capacidade de inibir a proteína Raf1 que a Keap1. Esse foi um estudo preliminar das possíveis interações dos isômeros desse monoterpeneo com as proteínas Raf1 e Keap1. Novos trabalhos devem ser desenvolvidos para entender realmente o papel dessas vias na ação citoprotetora do citral e seu potencial no tratamento do dano causado isquemia e reperfusão renal. Ademais os parâmetros ADMET e físico-químicos direcionam o citral como bom candidato a fármaco.

## 7. REFERÊNCIAS

AHMED, S. M. U.; NAMANI, A.; WANG, X. J.; TANG, X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1863, p. 585-597, 2017.

ALMEIDA, K. B.; ARAUJO, J. L.; CAVALCANTI, J. F.; ROMANOS, M. T. V.; MOURAO, S. C.; AMARAL, A. C. F.; FALCAO, D. Q. In vitro release and anti-herpetic activity of *Cymbopogon citratus* volatile oil-loaded nanogel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 28, p.495-502, 2018.

ARFIAN, N.; WAHYUDI, D. A. P.; ZULFATINA, B; I.; CITTA, A. N.; ANGGOROWATI, N.; MULTAZAM, A.; ROMI, M. M.; SARI, D. C. R. Chlorogenic Acid Attenuates Kidney Ischemic/Reperfusion Injury via Reducing Inflammation, Tubular Injury, and Myofibroblast Formation. **Biomed Res Int**, 2019.

AYTAC Z.; CELEBIOGLU, A.; YILDIZ, Z. I.; UYAR, T. Efficient Encapsulation of Citral in Fast-Dissolving Polymer-Free Electrospun Nanofibers of Cyclodextrin Inclusion Complexes: High Thermal Stability, Longer Shelf-Life, and Enhanced Water Solubility of Citral. **Nanomaterials**. v.8, n.10, 2018.

BACHIEGA, T.; F.; SFORCIN, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, n. 1, p. 909-913, 2011.

BAILLY, C. Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereoisomers. **European Journal of Pharmacology**. v. 871, 2020.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito implicações e fatores modulatórios. **Rev.Nutr**. v. 23, n. 4, 2010.

BASS, D. A.; OLBRAND, P.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; McCALL, C.E. Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 136-141, 1986.

BAYALA, B.; BASSOLE, I. H. N.; MAQDASY, S.; SILVERE, B.; SIMPORE, J.; LOBACCARO J. M. Cymbopogon citratus and Cymbopogon giganteus essential oils have cytotoxic effects on tumor cell cultures. Identification of citral as a new putative anti-proliferative molecule. **Biochimie**. v. 153, p. 162-170, 2018.

BEACH, T. E.; PRAG, H. A.; PALA, L.; LOGAN, A.; HUANG, M. M.; GRUSZZYK, A. V.; MARTIN, J. L.; MAHBUBANI, K.; HAMED, M. O.; HOSGOOD, S. A.; NICHOLSON. M. L.; JAMES, A. M.; HARTLEY, R; C; MURPHY, M. P.; PARTSY, K. S. Targeting succinate dehydrogenase with malonate ester prodrugs decreases renal ischemia reperfusion injury. **Redox Biology**. v.36, 2020.

BHAT, P. A.; NAZIR, N.; CHAT, O. A.; DAR, A. A. Exploiting self-assembled soft systems based on surfactants, biopolymers and their mixtures for inhibition of Citral degradation under harsh acidic Conditions. **Food Chemistry**. v. 340, 2020.

BORGES, J. C. A.; SATURNINO, K. C.; CRUZ, V. S.; ARAUJO, E.G. Ação antioxidante da Curcumina (Curcuma longa L.) na injúria de isquemia e reperfusão tecidual. **Centro Científico Conhecer**. v. 16. n. 29, p. 48-62, 2019.

BOUZENNA, H.; HFAIEDH, N.; METGES, M. A. G.; ELFEEKI, A.; TALARMIN, H. Biological properties of citral and its potential protective effects against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 87, p. 653-660, 2017.

BREITMAIER, E. Terpenes: importance, general structure and biosynthesis. **Terpenes**, v.1, p.19, 2006.

BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford; Blackwell, 1992.

CAMPOS, C. A.; LIMA, B. S.; TRINDADE, G. G. G.; SOUZA, E. P. B. S. S.; MOTA, D. S. A.; HEIMGARTH, L. et al. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. **Life Science**. v. 229, p. 139-148, 2019.

CAO, J.; LIU H.; WANG, Y.; HE, X.; JIANG, H.; YAO, J.; XIA, F.; ZHAO, Y. Antimicrobial and antivirulence efficacies of citral against foodborne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633. **Food Control**, v. 120, 2020.

CARRERAS, L. N.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial health properties of iridoids terpenes. **Nutr. clin. diet. Hosp.** v. 32, n. 3, 81-91, 2012.

CASTILLO, J. A. M.; IBARRA, M. C. B. Inhibitory effect of the essential oil of *Cymbopogon Citratus* on the strain of *Porphyromona Gingivalis*: In Vitro Study. **Odontologia**. v. 20, n. 2, p. 5-13, 2018.

CHA, J. J.; HYE, S. M.; KI, T. K.; JUNG, Y. G.; HYUN, W. K.; JI, E. L.; JEE, Y. H.; GAYOUNG, L.; HUN, J. H.; YUN, S. B.; SAE, R. L.; SUNG, H. M.; SUNG, S. L.; GANGHYUN, K.; YOUNG S. K.; DAE, R. C. APX-15, a first-in-class pan – NADPH-oxidase (Nox) inhibitor, protects db/db mice from renal injury. **Laboratory Investigation**. v. 97, p. 419-431, 2017.

CHANG, T.-H.; HSIEH, F.L; KO, T. P.; TENG, K. H.; LIANG, P. H.; WANG, A. H. J. Structure of a Heterotetrameric Geranyl Pyrophosphate Synthase from Mint (*Mentha piperita*) Reveals Intersubunit Regulation. **The Plant Cell Online**, v. 22, n. 2, p. 454–467, 2010.

CHARLTON, J. R.; PORTILLA, D.; OKUSA, M. D. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29, n. 7, p. 1301-11, 2014.

CHIHANGA, T.; MA, Q.; NICHOLSON, J. D.; RUBY, H. N.; EDELMANN, R. E.; DEVARAJAN, P.; KENNEDY, M. A. NMR spectroscopy and electron microscopy identification of metabolic and ultrastructural changes to the kidney following ischemia-reperfusion injury. **AJP-Renal Physio**, v. 314, n. 2, p. 154–166, 2018.

CORDEIRO, P. M.; FERNANDES, S. M.; FONSECA, C. D.; WATANABE, M.; LOPES, S. M.; VATTIMO, M.F.F. Effects of *Justicia acuminatissima*, or Amazonian Sara Tudo, on ischemic acute kidney injury: an experimental study. **Journal of school of nursing**. v. 53, 2019.

CUARENTAL, L.; SUCUNZA-SAENZ, D.; RIVAS, L. V.; FERNANDEZ, B. F.; SANZ, A. B.; ORTIZ, A.; VAQUERO, J. J.; NIN, M. D. S. MAP3K kinases and kidney injury. **Rev. La Sociad Española de Nefrologia**. v. 39, n. 6, p.568-580, 2019.

DANGKONG, D.; LIMPANASITHIKUL W. Effect of citral on the cytotoxicity of doxorubicin in human B-lymphoma cells. **Pharm. Biol.** v. 53, n. 2, p. 262-270, 2014.

DEGIRMENCI, U.; WANG, M.; HU, J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. **Cells**. v.9, n.1, 2020.

DODSON, M.; VEJA, R.; CHOLANIANS, A. B.; SCHIMIDLIN, C. J.; CHAPMAN, E.; ZHANG, D. D. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 59, p. 555-575, 2019.

DONG, J.; WANG, N. N.; YAO, Z. J.; ZHANG, L.; CHENG, Y.; OUYANGS, D.; LU, A. P. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **Journal of Cheminformatics**. v. 10, n. 29, 2018.

EDUARDO, L.; MIRANDA, C. VIAROS, F.; CENEVIVA, R.; EVORAS, P. R. B. As bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. *Acta Cir. Bras.* v.19, n. 1, p. 3-11, 2004.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*. v. 157, p. 9-20, 2007.

EKPENYONG, C. E.; AKPAN E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. **Chinese Journal of Natural Medicines**. V 15, n. 5, p. 321-337, 2015

ELEKOFEHINTI, O.; ONUNKUN, A. T.; OLALEYE, T. M. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf mitigates ER-stress induced by streptozotocin in rats via down-regulation of GRP78 and up-regulation of Nrf2 signaling. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 262, 2020.

EMILIO-SILVA, M. T.; RODRIGUES V. P.; BUENO, G.; OHARA, R.; MARTINS, M. G.; JUNIOR, J. A. C. H.; BRANCO, L. G. S.; ROCHA, M. R. L.; CLELIA, A. Hypothermic Effect of Acute Citral Treatment during LPS-induced Systemic Inflammation in Obese Mice: Reduction of Serum TNF- $\alpha$  and Leptin Levels. **Bimolecules**. v. 10, n. 10, 2020.

ENDO, T. Dominant-negative antagonists of the Ras–ERK pathway: DA-Raf and its related proteins generated by alternative splicing of Raf. **Experimental Cell Research**. v. 387, 2020.

FANG, Z.; WANG, Y.; LI, H.; YU, S.; LIU, Z.; FAN, Z.; CHEN, X.; PAN, X.; LI, X.; WANG, C. Combination Treatment of Citral Potentiates the Efficacy of Hyperthermic Intraperitoneal Chemoperfusion with Pirarubicin for Colorectal Cancer. **Mol.Pharm**. v. 14, n. 10, 2017.

FENG, D.; DONG, L. S. TONG, W.; XIAN, D. Z. O-GlcNAcylation of RAF1 increases its stabilization and induces the renal fibrosis. **BBA - Molecular Basis of Disease**. V. 1866, 2020.

FERREIRA, L. G.; SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**. v. 20, p.13385-13421, 2015.

FISKUS, W.; MITSIADES, N. B-RAF Inhibition in the clinic Present and Future. **Annu. Rev. Med**. v. 67, p. 29-43, 2016.

GHOLAMPOUR, F.; BAGHERI, A.; BARATI, A.; MASOUDI, R.; OWJI, S. M. Remote Ischemic Perconditioning Modulates Apelin Expression After Renal Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of Surgical Research**, v. 247, p. 429-437,2019.

GINO, A.K.; BRINDA, P. Standartization of in vitro cell-based model of renal ischemia and reperfusion injury. **Indian J. Pharm. Sci**. v. 76, n.4, p. 338-353, 2014.

GOIATO, R. G. C.; GANDOLFI, J. V.; CAVALLARI, V.; AMENDOLA, C. P.; AJEJE, E. N. T.; JUNIOR, J. N. S.; POLACCHINI C. A.; LOBO, S. M. Lesão renal aguda após cirurgias não cardíacas: incidência e impacto das disfunções orgânicas extra-renais nos desfechos. **Archives of Health Science**, v. 26, n. 2, p. 84-88, 2019.

GONZALES, A.P. G. G.; YOSHIOKAA, E. T. O.; MATHEWSC, P. D.; MERTINSD, O.; CHAVES, F. C. M.; VIDEIRA, M.N; DIASA, M. D. Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects . **Aquaculture**, v. 528, 2020.

GOU, R.; JUNTONG, C.; SHIFENG, S.; RUIQIANG, W.; YUDONG, F.; ZIJUN, Y.; LIUWEI, W.; LIN, T. KIM-1 Mediates high glucose-induced autophagy and apoptosis in renal tubular epithelial cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 38, p. 2479-2488, 2016.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biology**. v.6, p.524, 551, 2015.

GUAN, L.; YANG, H.; CAI, Y.; SUN, L.; DI, P.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. ADMET-score – a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Med. Chem. Commum**. v. 10, p. 148-157, 2019.

GUO, A.; WANG, W.; SHI, H.; WANG, J.; LIU, T. Identification of Hub Genes and Pathways in a Rat Model of Renal Ischemia-Reperfusion Injury Using Bioinformatics Analysis of the Gene Expression Omnibus (GEO) Dataset and Integration of Gene Expression Profiles. **Med Sci Monit**, v. 25, p. 8403- 8411, 2019.

GUVENÇ, M.; CELLAT, M.; UYAR, A.; OZKAN, H.; GOKCEK, I.; ISLER, C. T.; YAKANS, A. Nobiletin Protects from Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by Suppressing Inflammatory Cytokines and Regulating iNOS-Enos Expressions. **Inflammation**, v. 43, p.336-346, 2020.

HAGVAL, L.; CHALKDIS, K, P. Contact allergy to oxidized terpenes and occupational contact dermatitis in massage therapist- A case series. **Contact Dermatitis**. p. 390-392, 2020.

HAGVAL, L.; KALBERG, A. T.; CHRISTENSSON, J.B. Contact allergy to air-exposed geraniol: clinical observations and report of 14 cases. **Contact Dermatitis**. v. 67, n.1, p. 20-27, 2012

HARASYM, J.; OLEDZKI, R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. **Nutrition**. v.20, p. 511-517, 2014.

HARBONE, J.B. . Ecological chemistry of plant terpenoids. Oxford science publications, New York, p. 399-426, 1991

HOSSZU, A.; FEKETE, A.; SZABO, A. J. Sex differences in renal ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 319, 2020.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. **Journal of Computational Chemistry**. v. 28, n.6, p. 1146-1152, 2007.

HUE, R.; MORRIES, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with charge basead-Desolvation. **J. Computacional Chemistry**. v. 28, p. 1145-1152, 2007.

HUMPHREYS, B. D.; XU, F.; SABBISSETTI, V.; GRGIC, I.; NAINI, S. M.; WANG, N. CHEN, G.; XIAO, S.; PATEL, D.; HENDERSON, J. M.; ICHIMURA, T.; MOU, S.; SOEUNG, S.; MCMAHON, A. P.; KUCHROO, V. K.; BONVENTRE, J. V. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 123, n. 9, p. 4023-4035, 2013.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (Gpx): Their fundamental role in the entire antioxidante defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**. v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

JAMUNA, S.; SADULLAH, S.; ASHOKKUMAR, R.; SHANMUGANATHAN, G.; MOZHI, S. S.; DEVARAJ, N. Potential antioxidant and cytoprotective effects of essential oil extractedfrom *Cymbopogon citratus* on OxLDL and H2O2LDL induced HumanPeripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). **Food Sciences and Human Wellness**. v. 6, p. 60-69, 2017.

JIN, F.; GAO, D.; ZHANG, C.; LIU, F.; CHU, B.; CHEN, Y.; CHEN, Y. Z.; TAN, C.; JIANG, Y. Exploration of 1-(3-chloro-4-(4-oxo-4H-chromen-2-yl) phenyl)-3-phenylurea derivatives as



selective dual inhibitors of Raf1 and JNK1 kinases for anti-tumor treatment. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 21, p. 824-831, 2013.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 77, n. 2, p. 990-4, 1980

KA, S. M.; LIN, J. C.; LIN, T. J.; LIU, G. C.; CHAOS, L. K.; HO, C. L.; YEH, L. T.; SYTWU, H. K.; HUA, K. F.; CHEN, A. Citral alleviates an accelerated and severe lupus nephritis model by inhibiting the activation signal of NLRP3 inflammasome and enhancing Nrf2 activation. **Arthritis research therapy**. V. 17, 2015.

KATSUKAWA M.; NAKATA, R.; TAKIZAWA, Y.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  and suppresses COX-2 expression. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1801, n.11, p. 1214-1220, 2010.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition Research**. v. 34, p. 907-929, 2014.

KOLCH, W.; KOTWALIWALE, A.; VASS, K.; JANOSH, P. The role of Raf kinases in malignant transformation. **Molecular Medicine**, v. 4, n.8, p. 1-18, 2002.

KREMER, J. L.; MELO G. P.; MARINELLO, P. C.; BORDINI, H. P.; ROSSANEIS, A. C.; SABIO, L. R.; CECCHINI, CECCHINI, A. L.; JR, A. V.; LUIZ, R. C. Citral prevents UVB-induced skin carcinogenesis in hairless mice. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v. 198, 2019.

KYRIAKIS; J. M.; AVRUCH, J. MAPK signal transduction pathways in mammals activated by stress and inflammation: a 10-year update. **Physiol. Rev**. v. 92, n. 2, p. 689-737, 2012.

LAHOUD, Y.; HUSSEIN, O.; SHALABI, A.; NATIV, O.; AWAD, H.; KHAMAISI, M. et al. Effects of phosphodiesterase-5 inhibitor on ischemic kidney injury during nephron sparing surgery: quantitative assessment by NGAL and KIM-1. **World J Urol**. v. 33, n. 12, p. 2053-62, 2015.

LEE, H. J.; HEON, S. J.; DAE, J. K.; YOUNG, H. N.; DONG, Y. Y.; JIN, T. H. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and Nf-kappa B Activation in RAW 264.7 cells. **Arch Pharm Res.** v. 31, n. 3, p. 342-351, 2008.

LI, W.; KHOR, T. O.; XU, C.; SHEN, G.; JEONG, W. S.; YU, S.; KONG, A. N. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkB-inflammatory response and elicits apoptosis. **Biochempharm.** v. 76, p. 1485-1489, 2008.

LI, C. C.; YU, H. F.; CHANG, C. H.; LIU, Y.T.; YAO, H. T. Effect of lemongrass oil and citral on hepatic drug metabolizing enzymes, oxidative stress and acetaminophen toxicity in rats. **Journal of food and drug analysis.** v.26, n. 1, p. 432-438, 2018.

LI, M.; HUANG, W.; JIE, F.; WANG, M.; ZHONG, Y.; CHEN, Q.; LU, B. Discovery of Keap1–Nrf2 small–molecule inhibitors from phytochemicals based on molecular docking. **Food and Chemical Toxicology.** v. 133, 2019.

LI, B.; NASSER, M. I.; MASOD, M.; ADLAT, S.; HUANG, Y.; YANG, B.; LUO, C.; JIANG, N. Efficiency of Traditional Chinese medicine targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 126, 2020.

LIANG, S.; XU, Z.; RUAN, Y.; NIU, T.; GUO, W.; JIANG, W. HOU, J. Isoquercitrin Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury Through Antioxidation, Anti-inflammation, and Antiapoptosis in Mice. **Transplantation Proceedings.** v. 52, p. 1014-1019, 2020

LIAO, P. C.; YANG, T. S.; CHOU, J. C.; CHEN, J.; LEE, S. C.; KUO, Y. H.; HO, C. L.; CHAO, L. K. P. Anti-inflammatory activity of neral and geranial isolated from fruits of *Litsea cubeba* Lour. **Journal of Functional Foods.** v. 19, p. 248-258, 2015.

LIU, H.; WANG, Y.; CAO J.; JIANG, H. YAO J.; GONG, G.; CHEN, X.; XU, W.; HE, X. Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture.** v. 512, 2020.

LIU, Y.; FUA, Y.; LIU, Z.; SHU, S.; WANG, Y.; CAI, J.; TANG, C.; ZHENG, D. Irisin is induced in renal ischemia-reperfusion to protect against tubular cell injury via suppressing p53. **Molecular Basis of Disease**. 1866, 2020.

MA, H.; ZHAO, Y.; LU, Z.; XING, R.; YAO, X.; JIN, Z.; WANG, Y.; YU, F. Citral-loaded chitosan/carboxymethyl cellulose copolymer hydrogel microspheres with improved antimicrobial effects for plant protection. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 164, p. 986-993, 2020.

MADI, F. Y.; CHOUCRY, M. A.; MARASY, .A; MESELHY, R. M.; SAYEDA; KASHOURY, A. UPLC-Orbitrap HRMS metabolic profile of *Cymbopogon citratus* grown in Egypt; neuroprotective effect against AICINeurotoxicity induced by 3 in rats. **Journal Ethnopharmacology**. v. 259, 2020.

MAGRO, M. C. S.; VATIMO, M. F. Evaluation of Renal Function: Creatinine and other Biomarkers. **Revista Brasileira de terapia intensiva**. v. 19, n. 2, p. 182-185, 2007.

MANESH, Y. H.; HEMMATI, S.; SHIROOE, S.; NABAVI, S. M.; BONAKDAR, A. T.; FAYAZNIA, R.; ASGARDOON, M. H.; DEHNAVI, A. Z.; GHAFOURI, M.; WANDIOU, J. G.N.; CAPRIOLI, G.; SUT, S.; MAGGI, F. DALL`ACQUA, S. Protective effects of hydroalcoholic extracts from an ancient apple variety 'Mela Rosa dei Monti Sibillini' against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Food Funct**, v. 10, p. 7544-7552, 2019.

MATOS, S. P.; TEXEIRA, H. F; LIMA, A.A.N; JUNIOR, V.V; KOESTER, L.S. Essential Oils and Isolated Terpenes in Nanosystems Designed for Topical Administration: A Review. **Biomoleculas**. v.9, n. 4, 2019.

MCKAY, M. M.; MORRISON, D. K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. **Oncogene**. v. 26, n. 2, p. 3313-3334, 2007.

MEHTA, J.; RYALAM, S.; WANG, X. Cytoprotective Effects of Natural Compounds Against oxidative stress. **Antioxidants (Basel)**.v.7, n.10, 2018.

MELO, Z.; YANET, K. G-M.; DAVID, G-M.; ELISEO, P-B.; ALEJANDRO, A.; CANALES, A.; RICARDO, G. G.; ADRIANA, F. A.; JULIO, P.; RAQUEL, E. Sex- dependente mechanism involved in renal tolerance to ischemia- reperfusion: Role of inflammation and histone H3 citrullination. **Transplant Immunology**. v. 63, 2020.

MENDEZ, G. L.; CASTRO, N. P.; CASTRO, E. P.; ALARCON, M. T.; BARROS, A. H. Essential oils as a source of bioactive molecules. **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.** v 48, n. 1, p. 80-93, 2019.

MEO, S. D.; REED, T. T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V. M. Role of Ros and RNS sources in physiological and pathological conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Logevity**. v. 2016, 2016.

MIGUEL, M. P; MENEZES, L. B; ARAUJO, E. G. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (Caryocar brasiliense). **Centro Científico Conhecer**. v.8, n.15; p. 1960-1976, 2012.

MOENS, U.; KOSTENKO, S.; SVEINBJORNSSON, B. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation. **GENES**.v.4; p.101-133, 2013

MOR, A.; PHILIPS, M. R. Compartmentalized Ras/ MAPK Signaling. **Annu. Rev. Immunol.** v. 24; p. 771-800, 2006.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R.S; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**. v.19, n.14, p. 1639-1662, 1999.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J.; HUEY, R. AutoDock Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors Version 2.4. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**. v. 10, p. 293-304, 1996.

MOTA, C. M. D.; SANTOS, C. R.; CAROLINO, R. O. G.; FRANCI, J. A.; BRANCO, L. G. S. Citral-induced analgesia is associated with increased spinal serotonin, reduced spinal nociceptive signaling, and reduced systemic oxidative stress in arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 250, 2020.

MOU, Y.; WEN, S.; LI, Y. X.; GAO, X. X.; ZHANG, X.; JIANG, Z. Y. Recent progress in Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. V. 202, 2020.

MOURA, L.R.R.; JUNIOR, M. S. D.; MATOS, A.C. C.; SILVA, A.P. Lesão de isquemia e reperfusão no transplante renal: paradigmas hemodinâmico e imunológico. **Einstein**. V. 13, n. 1, p. 129-135, 2015.

NAKAMURA, Y.; MIYAMOTO, M.; MUKARAMI, A.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 302, p. 593-600, 2003.

NAZ, F.; KHAN, F. I.; MOHAMMAD, T.; KHAN, P.; MANZOOR, S. HASAN, G. M.; LOBB, K. A.; LUGMAN, S.; ISLAM, A.; AHMAD, F.; HASSAN, I. Investigation of molecular mechanism of recognition between citral and MARK4: A newer therapeutic approach to attenuate cancer cell progression. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.107, p. 2580-2589, 2018.

NETO, I. R. S.; ALVES, M. G. L.; MARTINS, M. T. C. S. UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS PELOS GRUPOS DE IDOSOS E DE JOVENS NO MUNICÍPIO DE PARARI – PB. **Revista acadêmico-científica**. v.7, n. 1, 2015.

OH, Y. S.; JUN, H. S. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. **Internacional Journal of Molecular Science**. v. 19, n. 1, 2018.

OLADEJI, O. S.; ADELOWO, F. E. A.; AVODELE, D. T.; ODELADE, K. A. Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. **Scientific African**, v. 6, 2019

OLIVEIRA, M. A.; BARRETO, A. A. O.; JUNIOR, L. J. Q. Aplicação de terpenos como agentes analgésicos: uma prospecção tecnológica. **Geintec**. v.4, n.4, p. 1292-1298, 2014.

PADUCH, R.; SZERZEN, M. K.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, M. T. J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315–327, 2007.

PARK, J.; H.; KHO, M. C.; OH, H. C.; KIM, Y. C.; YOON, J. J.; LEE, Y. J.; KANG, D. G.; LEE, H. S. 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-Galloyl- $\beta$ -D-Glucose from *Galla rhois* Ameliorates Renal Tubular Injury and Microvascular Inflammation in Acute Kidney Injury Rats. **The American Journal of Chinese Medicine**. v. 46, n. 4, p. 785-800, 2018.

PEI, J.; CAI, S.; SONG, S.; XU, Y.; FENG, M.; LUO, G.; WANG, Y.; SUN, F.; SHI, H.; XU, S. Normobaric hyperoxia plays a protective role against renal ischemiareperfusion injury by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 532, p. 151-158, 2020.

PERGOLA, P. E.; KRAUTH, M.; HUFF, W.; FERGUSON, D. A.; COLIN S. R.; M. C. J.; WARNOCK, D. G. Effect of Bardoxolone Methyl on Kidney Function in Patients with T2D and Stage 3b–4 CKD. **Am J Nephrol**. v. 33, p. 469-476, 2011.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **Journal of Molecular Science**. v. 20, 2019.

PONTES, H. B. D. et al. Evaluation of the Effects of Atorvastatin and Ischemic Postconditioning Preventing on the Ischemia and Reperfusion Injury: Experimental Study in Rats. **Braz. J. Cardiovasc Surgery**. vol.33 n.1, 2018.

PROCHNOW, D.; ALTISSIMO, B. S.; SILVA, J. C.; MEIRA, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; SCHMIDT D. Chemical composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hér) Britton due to water deficit and seasonality. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v. 16, n. 2, p. 121-128, 2017.

RAJNEESH.; PATHAK J.; CHATTERJEE, A.; SINGH, S. P.; SINHA, R. P. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). **Bio Protocol**. v. 7, n. 17, 2017.

RAUEN, K. A. The Raspathies. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. v. 14, p. 355-369, 2013.

RAUNIO, H. In Silico Toxicology – Non-Testing Methods. *Frontiers in Pharmacology*. 2011.  
RESS, N. B.; HAILEY, J. R.; MARONPOT, R. R.; BUCHER, J. R.; TRAYLOS, G. S.; HASEMAN, J.K; ORZECHA, D.P; JOHSON, J. D.; HEJTMANCIK, M. R. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated citral in rats and mice. **Toxicol Sci**. v. 71, n. 2, p.198-206, 2003.

REZK, A. M.; IBRAHIM, I. A. A. E. H.; MAHMOUD, F.; MAHMOUD, A. A. Quercetin and lithium chloride potentiate the protective effects of carvedilol against renal ischemia-reperfusion injury in high-fructose, high-fat diet-fed swiss albino mice independent of renal lipid signaling. **Chemical- Biological interactions**, 2021.

RISS, T. L.; MORAVEC, R.A; NILES; et al. Cell Viability Assays. **Assay Guidance manual [internet]**, Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences , 2004.

SAITO, H. Toxicopharmacological perspective of the Nrf2-Keap1 defense system against oxidative stress in kidney diseases. **Biochemical Pharmacology**. v. 85, p. 865-872, 2013.

SALAMEH, A.; DHEIN, S.; MEWES, M.; SIGUSH, S. KIEFER, P.; VOLLROTH, M.; SEEGER, J.; DAHNERT, I. Anti-oxidative or anti-inflammatory additives reduce ischemia/reperfusion injury in an animal model of cardiopulmonary by-pass. **Saudi Journal of Biological Science**. v. 27 ,2020.

SAMPAIO, T. S; MENEZES, R. R. P. B; COSTA, M. F. B; MENESES, G. C., ARRIETA, M. C. V; FILHO, A. J. M. C., MORAIS, G. B.; LIBÓRIO, A. B., ALVES, R. S. EVANGELISTA, J. S. A. M; MARTINS, A. M. C. Nephroprotective effects of (-)- $\alpha$ -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**. v.23, n. 14, p. 1843-1852, 2016.

SANTOS, C. H. M.; DOURADO, D. M.; SAMPAIO, T. L.; DIAS, L; E. S.; ALMEIDA, M. H. M.; OLIVA, J. V. D. G.; CHAVES, I. O. C.; PONTES, H. B. D. Effect of postconditioning and atorvastatin in preventing remote intestinal reperfusion injury. **J. Coloproctol.** v. 37, n. 4, p. 301-305, 2017.

SCHYMAN, P.; LIU, R.; DESAI, V.; WALLQVIST, A. Vnn Web server for ADMET Predictions. **Frontiers in Pharmacology.** v.8, 2017.

SEO, K. A.; KIM, H.; KU, H. Y.; AHN, J.; PARK, S. J.; BAE, S. K.; SHIN, J. G.; LIU, K. H. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. **Chem Bio Interact.** v. 174, n. 3, p. 141-147, 2008.

SERRANO, A.; IMBERNON, B.; SÁNCHEZ, H.P.; CECILIA, J. M.; CRESPO, A. B.; ABELLAN, J. L. QN-Docking: An innovative molecular docking methodology based on Q-Networks. **Applied Soft Computing Journal.** v.96, 2020.

SHAIK, N. A.; AL- KREATHY, H. M.; AJABNOOR, G. M.; VERMA, P. K.; BANAGANAPALLI, B. Molecular designing, virtual screening and docking study of novel curcumin analogue as mutation (S769L and K886R) selective inhibitor for EGFR. **Saudi Journal of Biological Sciences.** v. 26, n. 3. p. 439-448, 2019.

SHEIKH, B. Y.; SARKER, M. R.; NOOR, M.; KAMARUDIN, A.; MOHAN, G. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of citral via p53 and ROSinduced mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal HCT116 and HT29 cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 96, p. 834-846, 2017.

SHEN, Y.; SUN, Z.; GUO, X. Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR- $\gamma$ . **European Journal of Pharmacology.** v. 747, p. 45-51, 2015.

SHIVA, N.; SHARMA, N.; KULKARNI, Y. A.; MULAY, S. R.; GAIKWAD, A. B. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. **Life Science.** v. 256, 2020.



SILVA, L. P.; RECK, R. T.; FONSECA, F. N. Desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas a partir de capim limão (*Cymbopogon citratus*). **Saúde meio Ambient.** v. 5, n. 2, p.82-92, 2016.

SIMOES, D. M.; MALHEIROS, J.; ANTUNES, P. E.; FIGUEIRINHA A. COTRIM, M. D.; FONSECA, D. A. Vascular Activity of infusion and fractions of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in human arteries. **Journal Ethnopharmacology.** v. 258, 2020.

SLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBELSKA, K.; CIERPIAT, T.; LYZWA, P.; KIETBASINSKI, P.; JAROMIN, A.; FLIS, A.; CHILMONCZK, Z. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. **PLOSS ONE.** v. 11, n.5, 2016.

SONG, Y.; ZHAO, H.; LIU, J.; FANG, C.; MIAO, R. Effects of Citral on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Inflammation.** v.39, n.2, pg. 663-671, 2016.

SRIRAMULLU, D. K.; WU, S.; LEE, S.G. Effect of ligand torsion number on the AutoDock mediated prediction of protein-ligand binding affinity. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry.** v. 83, p. 359-365, 2020.

SUBRAMANIYAN, S. D.; NATAJARAN, A. K. Citral, A Monoterpene Protect Against High Glucose Induced Oxidative Injury in HepG2 Cell In Vitro-An Experimental Study. **J CLIN DIAGN RES.** v. 11, n. 8, 2017.

TAHA, M. O.; SILVA, T. M. A.; OTA, K. S.; VIELA, W. J.; SIMOES, R. S.; JUNIOR, A. S.; FAGUNDES, D. J. The role of atenolol in the modulation of the expression of genes encoding pro- (caspase-1) and anti- (Bcl2L1) apoptotic proteins in endothelial cells exposed to intestinal ischemia and reperfusion in rats. **Acta Cir Bras.** v.33, n. 12, p 1061-1066, 2018.

TAVARES, M. B.; MELO, C. V. B.; FERNANDES, P. N.; ALMEIDA, M. C. C; CARNEIRO, M, F. S. M.; SANTOS, R. F. S.; OLIVEIRA, M. B.; MARTINELLI, R.; SANTOS, W. L. C. Biomarkers of acute kidney injury in patients with nephrotic syndrome. **Brazilian Journal of Nephrology,** 2020.

UCHIDA, N. S.; FILHO, S. E. S.; CARDIA, G. F. E.; CREMER, E.; COMAR, M. S. S.; SILVA, E. L. AMADO, C. A. B.; CUMAN, R. K. N. Hepatoprotective Effect of Citral on Acetaminophen-Induced Liver Toxicity in Mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.

VARAN, H. D.; BAY, M.; OZTURK, A.; DALVA, K. ILHAN, O. Comparison of the methods evaluating post thawing viability of peripheral blood stem cell graft. **Transfusion and Apheresis Science**. v. 58, p. 192-195, 2019.

VILLAVERDE, J. M.; SANCHES, L. TERRA, V. A.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L.; LUIZ, R. C. Effects of essential oil from lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on human melanoma (SK-MEL 147) and keratinocyte (HaCaT) cells. **Biosaúde**. v. 15, n. 1, p. 22-36, 2013.

WANG, Y. L.; DONG, P.P.; LIANG, J. H.; LI, N.; SUN, C. P.; TIAN, X. G.; HUO, X. K.; ZHANG, B. J.; MA, X. C.; LV, C. Z. Phytochemical constituents from *Uncaria rhynchophylla* in human carboxylesterase 2 inhibition: Kinetics and interaction mechanism merged with docking simulations. **Phytomedicine**. v. 51, p. 120-127, 2018.

WU, W. L.; PAPAGIANNAKOPOULOS, T. The Pleiotropic Role of the

KEAP1/NRF2 Pathway in Cancer. **Annual Review of Cancer Biology**. v. 4, p. 413-435, 2020.

YANG, L.; FAWCETT, J. P.; ØSTERGAARD, J.; ZHANG, H.; TUCKER, I. G. Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. **Mol Pharm.**, v. 9, n. 1, p. 29-36, 2012.

YANG, S. M.; HUA, K. F.; LIN, Y. C.; CHEN, A. CHANG, J. M.; CHAO, L. K.; HO, C. L.; KA, S. M. Citral Is Renoprotective for Focal Segmental Glomerulosclerosis by Inhibiting Oxidative Stress and Apoptosis and Activating Nrf2 Pathway in Mice. **PLOS ONE**. v.8 n.9, 2013.

YANG, L.; BROOKS, C. R.; XIAO, S.; SABBISSETTI, V.; YEUNG, M. Y.; HSIAO, L.L.; ICHIMURA, T.; KUCROO, V.; BONVENTRE, J. V. KIM-1-mediated phagocytosis reduces

acute injury to the kidney. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 125, n. 4, p.1620-1636, 2015.

YANG, S. C.; CHEN, P. L.; CHANG, S. H.; WENG, Y. T.; CHANG, F. R.; CHANG, K. Y.; CHEN, C. Y.; KAO, T.; HWANG, T. L. Luteolin attenuates neutrophilic oxidative stress and inflammatory arthritis by inhibiting Raf1 activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 154, p. 384-396, 2018.

YANG, S.; CHEN, R.; WANG, M.; ZHA, J. Carbamazepine at environmentally relevant concentrations caused DNA damage and apoptosis in the liver of Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) by the Ras/Raf/Erk/P53 signaling pathway. **Environmental Pollution**, v. 270, 2021.

YAO, H.; ZHANG, N.; ZHANG, W.; LI, J.; HUA, H.; LI, Y. Discovery of polypodiside as a Keap1-dependent Nrf2 activator attenuating oxidative stress and accumulation of extracellular matrix in glomerular mesangial cells under high glucose. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 28, 2020.

YOSHIDA, W. B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. **Cir Vasc Angiol**. v. 12, p. 82-95, 1996.

ZEMBRUSKE, N. C.; STACHE, V.; HEFELI, W.; WEISS, J. 7- Aminoactinomycin D for staining apoptosis in flow cytometry. **Analytical Biochemistry**. v. 429, n. 1, p. 79-81, 2012.

ZHANG, H.; YANG, X.; LI, X.; CHENG, Y.; ZHANG, H.; CHANG, L.; SUN, M.; ZHANG, Z.; WANG, Z.; NIU, Q.; WANG, T. Oxidative and nitrosative stress in the neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether-153: possible mechanism and potential targeted intervention. **Chemosphere**. v. 238, 2020.

ZHANG, H.; ZHANG, T.; WANG, D.; JIANG, Y.; GUO, T.; ZHANG, Y.; ZHU, F.; HAN, K.; UM, L.; WANG, G. IFN- $\gamma$  regulates the transformation of microglia into dendritic-like cells via the ERK/cmyc signaling pathway during cerebral ischemia/reperfusion in mice. **Neurochemistry International**. v. 141, 2020

ZHANG, X.; ZHU, Y.; DONG, S.; ZHANG, A. LU, Y.; LI, Y.; LV, S.; ZHANG, J. Role of oxidative stress in cardiotoxicity of antineoplastic drugs. **LIFE SCIENCE**. v. 232, 2019.

ZHANG, Z.; CAI, C. Kidney Injury molecule-1 (Kim-1) mediates renal epithelial cell repair via ERK/MAPK signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. v. 416, n. 2, p. 109-125, 2016.

ZHAO, Y.; LIU X.; FU, X.; MO, Z.; JIANG, Y.; YAN, Y. Protective effects of epigallocatechin gallate against ischemia reperfusion injury in rat skeletal muscle via activating Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Life Sciences**, 2019.

ZHU, N.; CAI, C.; ZHOU, A.; ZHAO, X. XIANG, Y.; ZENG, C. Schisandrin B Prevents Hind Limb from Ischemia-Reperfusion-Induced Oxidative Stress and Inflammation via MAPK/NF- $\kappa$ B Pathways in Rats. **Biomed Research internacional**, 2017.

ZIELINSKA, A.; GOMES, C. M.; FERREIRA, N. R.; SILVA, A. M.; NOWAK, I.; SOUTO, E. B. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. **Int J Pharm**. v. 553, n. 2, p. 428-440, 2018.