



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mafalda Rafaela Coelho Freitas

Relatórios de Estágio sob orientação da Dra. Mariana Sampaio de Vargas Lança e da Dra. Nádia Ferreira Ramos e Monografia intitulada “Isoeugenol, a skin allergen with therapeutic potential in Diabetes mellitus” sob a orientação da Professora Doutora Sónia Alexandra Pinto Ribeiro Silva Santos, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Mafalda Rafaela Coelho Freitas

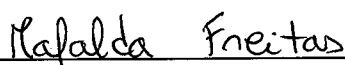
Relatórios de Estágio sob orientação da Dra. Mariana Sampaio de Vargas Lança e da Dra. Nádía Ferreira Ramos e Monografia intitulada “Isoeugenol, a skin allergen with therapeutic potential in Diabetes mellitus” sob a orientação da Professora Doutora Sónia Alexandra Pinto Ribeiro Silva Santos, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023

Eu, Mafalda Rafaela Coelho Freitas, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2018285767, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Isoeugenol, a skin allergen with therapeutic potential in Diabetes mellitus” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 4 de setembro de 2023.



(Mafalda Rafaela Coelho Freitas)

Agradecimentos

Aos meus pais, ao meu irmão, aos meus avós e restante família, por todo o apoio incondicional e por acreditarem sempre em mim.

Ao Diogo, por ser o significado de companheirismo e apoio em todos os momentos, ajudando-me a crescer diariamente.

A todos os meus amigos que fizeram parte deste bonito percurso, que possibilitaram a criação de memórias e a vivência de experiências únicas.

À minha Bia, por todos os momentos que vivenciamos juntas e por me ter acompanhado em todas as etapas desde o primeiro dia.

À minha afilhada, Marta, por ter contribuído para que estes anos fossem inesquecíveis.

Às minhas amigas por me apoiarem em todas as decisões da minha vida e por estarem sempre presentes.

A toda a equipa do departamento de Clinical Trials da PHAGECON, pelos ensinamentos, pelo apoio e profissionalismo.

A toda a equipa técnica da Farmácia Soure, pela oportunidade, carinho e amizade. Um obrigada nunca será suficiente.

À minha orientadora, Professora Doutora Sónia Silva Santos, um especial agradecimento, por todo o conhecimento e disponibilidade transmitida ao longo destes meses.

À cidade de Coimbra, que foi a minhas segunda casa durante estes 5 anos de memórias e desafios.

A todos vocês, que por algum motivo se cruzaram no meu caminho,

Obrigada!

Índice

Parte I - Relatório de Estágio em Ensaios Clínicos

Lista de Abreviaturas	7
1. Introdução.....	8
2. Análise SWOT	9
2.1. Pontos Fortes	10
2.1.1. Equipa	10
2.1.2. Autonomia e versatilidade de tarefas.....	11
2.1.3. Formação na área dos Ensaios Clínicos.....	12
2.1.4. Software para a gestão de ensaios clínicos	13
2.2. Pontos Fracos	14
2.2.1. Departamento em desenvolvimento.....	14
2.2.2. Duração do período de estágio	15
2.3. Oportunidades.....	15
2.3.1. Investigação Clínica – uma área em ascensão e repleta de oportunidades....	15
2.3.2. <i>In Rotation Program</i>	17
2.4. Ameaças	18
2.4.1. Aplicação limitada de conhecimentos adquiridos no MICF	18
3. Conclusão	19
Bibliografia.....	20

Parte II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	22
1. Introdução.....	23
2. Análise SWOT	24
2.1. Pontos Fortes	25
2.1.1. Equipa técnica e integração num grupo de farmácias.....	25
2.1.2. Serviços farmacêuticos disponibilizados à população	26
2.1.3. Medicamentos manipulados	27
2.2. Pontos Fracos	27
2.2.1. Associação entre o nome comercial e os respetivos princípios ativos.....	27
2.2.2. Aconselhamento de produtos de uso veterinário	27
2.3. Oportunidades.....	28
2.3.1. Formações e aprendizagem constante.....	28
2.3.2. Promoção do uso responsável do medicamento e da literacia em saúde.....	29
2.4. Ameaças	30
2.4.1. Medicamentos esgotados.....	30
2.4.2. Alterações dos preços dos medicamentos.....	30
3. Casos Práticos.....	31

3.1. Caso 1 - Cólicas no bebé.....	31
3.2. Caso 2 - Ansiedade e perturbações <i>minor</i> do sono.....	32
3.3. Caso 3 - Acne no adulto.....	33
3.4. Caso 4 - Suspensão pressurizada para inalação.....	33
3.5. Caso 5 - Peladas.....	34
4. Conclusão.....	35
Bibliografia.....	36

Parte III – Monografia “Isoeugenol, a skin allergen with therapeutic potential in Diabetes mellitus”

Abstract.....	39
Resumo.....	40
List of abbreviations.....	41
1. Introduction.....	43
2. Glucose homeostasis.....	44
3. Insulin signalling pathways.....	45
4. Diabetes Mellitus – Classification and pathophysiology.....	45
4.1. Type 1 Diabetes Mellitus.....	45
4.2. Type 2 Diabetes Mellitus.....	47
4.3. Other specific types of diabetes.....	49
5. Diabetes Mellitus therapeutics.....	50
6. Complications associated with Diabetes Mellitus.....	51
6.1. The polyol pathway.....	53
6.2. The hexosamine pathway.....	54
6.3. The Protein Kinase C pathway.....	54
6.4. The Advanced Glycation End products pathway.....	55
7. The antioxidant and anti-inflammatory therapeutic potential of skin allergens.....	55
8. Skin Allergen: Isoeugenol.....	56
8.1. The antioxidant and anti-inflammatory role of isoeugenol in complications associated with Diabetes Mellitus.....	57
8.2. Limitations of scientific research on isoeugenol in Diabetes Mellitus: A critical analysis.....	64
9. Future perspectives.....	65
10. Conclusion.....	66
References.....	68
Annexes.....	75

Parte I

Relatório de Estágio em Ensaio Clínicos

PHAGECON - Pharmaceutical Services and Consulting

Sob orientação da Dra. Mariana Lança



PHAGECON

PHARMACEUTICAL SERVICES AND CONSULTING

Lista de Abreviaturas

ALCOA++	<i>Attributable, Legible, Contemporaneous, Original, Accurate, Complete, Consistent, Enduring, Available</i>
CEIC	<i>Comissão de Ética para a Investigação Clínica</i>
CRA	<i>Clinical Research Associate</i>
CRC	<i>Clinical Research Coordinator</i>
CRO	<i>Clinical Research Organization</i>
CTMS	<i>Clinical Trial Management System</i>
CTIS	<i>Clinical Trials Information System</i>
EDC	<i>Electronic Data Capture</i>
eCRF	<i>Electronic Case Report Form</i>
eTMF	<i>Electronic Trial Master File</i>
FFUC	<i>Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra</i>
GCP	<i>Good Clinical Practice</i>
IATA	<i>International Air Transport Association</i>
IWRS	<i>Interactive Web Response System</i>
IP	<i>Investigational Product</i>
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
KOLs	<i>Key Opinion Leaders</i>
MDM	<i>Master Data Management</i>
MICF	<i>Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas</i>
SIV	<i>Site Initiation Visit</i>
SOPs	<i>Standard Operating Procedure</i>
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>

I. Introdução

O plano curricular do Mestrado Integrado em Ciência Farmacêuticas (MICF) pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) permite aos estudantes, através da unidade curricular Estágio Curricular, a oportunidade de contactarem com a realidade profissional. Os objetivos principais dos estágios curriculares passam por consolidar e aprofundar as competências e conhecimentos adquiridos durante o percurso académico, mas também explorar as diferentes áreas profissionais em que o farmacêutico se pode inserir.

A FFUC é a única faculdade do país que proporciona aos estudantes a possibilidade de estagiar numa outra área, para além do estágio obrigatório em farmácia comunitária, com exceção de farmácia hospitalar. Assim, é possível oferecer aos estudantes a perspetiva de que o farmacêutico, independentemente do menor contacto direto com os pacientes, pode contribuir igualmente para o acesso a cuidados em saúde e a terapêuticas.

Neste sentido, optei por realizar o meu estágio curricular na área da investigação clínica, cuja principal missão é proporcionar aos doentes tratamentos inovadores que sejam capazes de ajudar a melhorar a sua vida. De forma a aprofundar e adquirir novos conhecimentos o meu estágio foi realizado no departamento de *Clinical Trials* na empresa PHAGECON – Pharmaceutical Services and Consulting. O mesmo decorreu entre os dias 9 de janeiro e 31 de março em Lisboa, sob a orientação da Dra. Mariana Lança.

A PHAGECON – Pharmaceutical Services and Consulting é uma empresa portuguesa direcionada para o setor farmacêutico fundada em 2006 na cidade de Coimbra, que impulsionada pela crescente exigência deste setor e pela busca da excelência transferiu as suas instalações para Lisboa em 2016. Atualmente, a empresa tornou-se uma referência na área de consultoria farmacêutica pelo que é reconhecida pela sua missão e por contribuir para o sucesso do setor farmacêutico. Apresenta serviços de excelência pensados de acordo com as necessidades de cada cliente, com abordagens inovadoras baseadas na experiência e no conhecimento atual do setor. Desta forma, poderá proporcionar serviços especializados de consultoria em Ensaios Clínicos, Assuntos Regulamentares, Farmacovigilância, Assuntos Científicos, Garantia de Qualidade, Traduções e Formação¹.

O presente relatório pretende descrever e fundamentar quais foram as competências adquiridas, tarefas desempenhadas bem como a minha experiência na empresa, particularmente no departamento *Clinical Trials*.

2. Análise SWOT

A ferramenta estratégica utilizada para avaliar e analisar o estágio curricular é designada de análise SWOT, acrónimo das palavras *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities*, *Threats*, que se traduzem em Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças. Este procedimento permite obter uma avaliação interna, através dos pontos fortes e pontos fracos, e uma avaliação externa através das oportunidades e ameaças². Estes quatro parâmetros afetaram tanto de forma positiva como negativa o desempenho do meu estágio curricular.

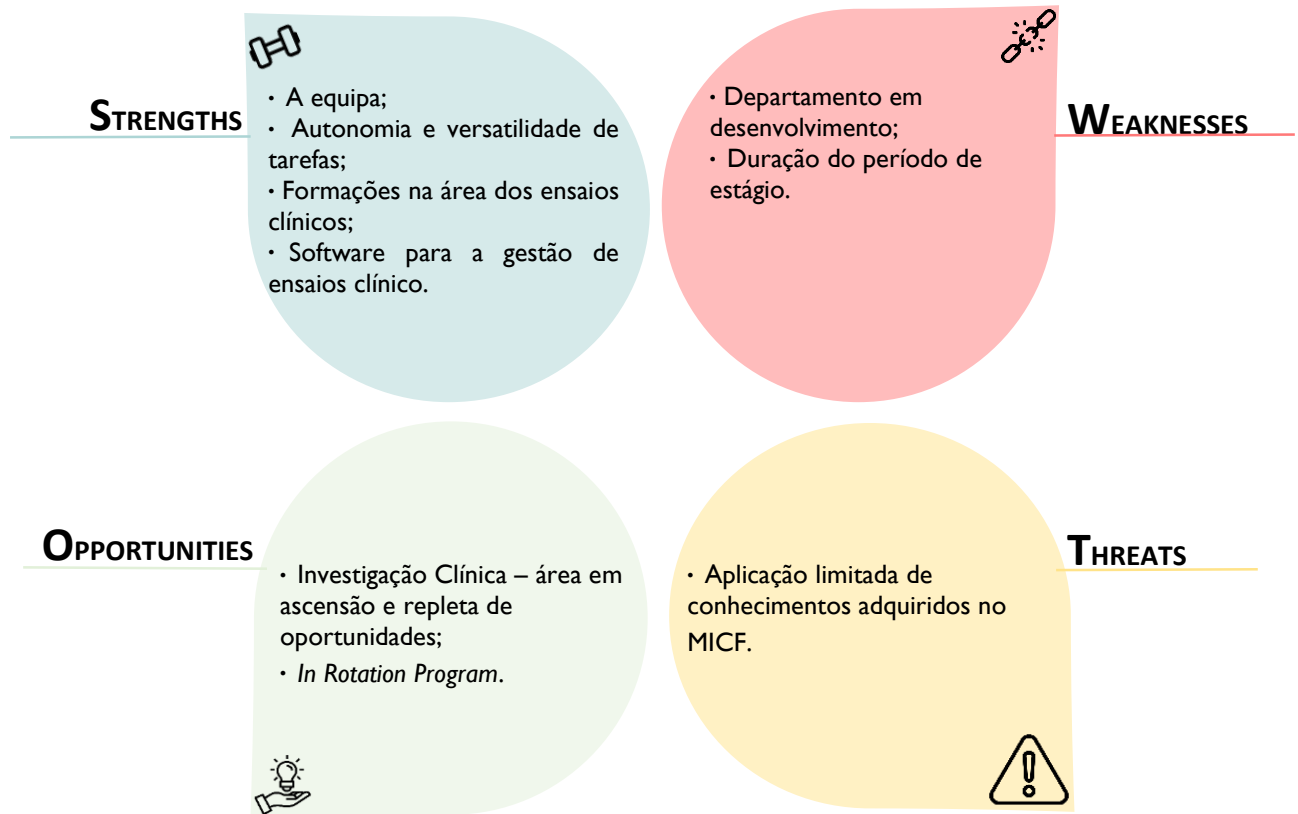


Figura I: Análise SWOT relativa ao estágio na PHAGECON – Pharmaceutical Services and Consulting.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Equipa

A PHAGECON é uma empresa de consultoria farmacêutica, constituída por profissionais qualificados de diversas áreas e que todos os dias trabalham lado a lado, com o propósito de oferecer soluções flexíveis e adaptadas à realidade do cliente. Apesar da capacidade de prestação de diferentes serviços é, no entanto, notável o poder de comunicação entre todos em prol do que a empresa pretende alcançar - ser uma empresa de referência na área da consultoria farmacêutica³.

Todos os departamentos da empresa trabalham em *open space*, pelo que naturalmente permite a promoção do espírito em equipa, facilitando a discussão de ideias ente os elementos e propicia a partilha de pontos de vista e experiências dos restantes colegas. Atualmente, o departamento de *Clinical Trials* é constituído por três elementos que se encontram em permanente comunicação bem como em execução de tarefas conjuntas.

Durante o meu estágio curricular tive a possibilidade de participar nas reuniões semanais do departamento, momento destinado ao planeamento das atividades. Eram debatidas as tarefas em execução, as tarefas a serem realizadas e os seus *deadlines*. Na maioria das vezes estas reuniões eram finalizadas com um momento de *brainstorming* com partilha de ideias inovadoras e novas abordagens, contribuindo para o desenvolvimento do departamento.

A existência de uma equipa de excelência é uma mais valia para o sucesso da investigação clínica, nomeadamente equipas multidisciplinares constituídas por diversos profissionais capazes de oferecer diferentes visões e conhecimentos. O contributo das equipas dos promotores de estudos, das equipas dos centros de investigação e dos doentes são essenciais para que haja cada vez mais ensaios clínicos, permitindo desta forma o acesso a terapêuticas inovadoras e a uma melhoria no acompanhamento dos doentes.

De facto, a possibilidade de ter participado numa equipa dedicada à investigação clínica foi extremamente gratificante e futuramente diferenciador, dado que esta experiência me concedeu não só aprendizagens clínicas e científicas como também bases de trabalho em equipa e comunicação, que serão sempre uma mais valia para a prestação de um serviço de excelência. Por último, salientar o bom ambiente dentro do departamento, o que naturalmente permite o seu crescimento e alcance rápido dos objetivos e a facilidade de integração de novos elementos.

2.1.2. Autonomia e versatilidade de tarefas

O estágio no departamento de *Clinical Trials* permitiu-me uma experiência multidisciplinar, uma vez que me foi proporcionado a realização de diversas atividades e sempre com uma função muito ativa no departamento para que pudesse desenvolver e melhorar as minhas competências. Nas primeiras semanas de estágio comecei pelo meu plano *onboarding*. Deste plano constavam os procedimentos internos da empresa e formação específica na área da investigação clínica. A PHAGECON por se inserir na indústria farmacêutica tem a obrigatoriedade de providenciar aos colaboradores uma formação em farmacovigilância, pelo que tive o privilégio de assistir nestas primeiras semanas e, assim aprender um pouco mais sobre esta área que é tão importante na segurança da população.

Após a finalização do plano *onboarding*, foi-me proposto pesquisar e explorar a plataforma *ClinicalTrials.gov*, onde podemos encontrar a mais variada informação sobre os estudos clínicos a nível global. É possível filtrar os estudos por áreas terapêuticas, por promotores de estudos, por *status* e também pelo tipo de estudo. Os estudos intervencionais são todos os que implicam uma alteração da prática clínica e exigem a obtenção de um consentimento informado, por outro lado os estudos observacionais caracterizam-se por não haver diferença em relação aos procedimentos esperados na prática clínica, o *standard of care*, e exigem igualmente a obtenção do consentimento informado.

Esta tarefa teve como principal objetivo ficar familiarizada com a plataforma, mas também ajudar os restantes elementos da equipa a selecionar estudos e contactos relevantes que estivessem alinhados com a estratégia do departamento. Desta forma, foi feito um levantamento por área terapêutica e de acordo com as necessidades nacionais e com as previsões de *pipeline* disponíveis pelos promotores.

Com o mesmo intuito, foi-me proporcionada a possibilidade de contactar com a vertente de negócio do departamento de ensaios clínicos, nomeadamente na pesquisa do perfil de *attendees* presentes em congressos. Esta atividade não está diretamente ligada à investigação clínica, no entanto permite que um departamento ainda em desenvolvimento possa identificar os *stakeholders*, os possíveis parceiros ou a concorrência, assim como localizar os KOLs, *Key Opinion Leaders*, especialistas numa determinada área e que são fundamentais para discutir o *state of the art* assim como definir orientações, desafiando o *standard of care* em prol de melhores soluções para os doentes.

Por fim, foi-me proposta a realização de uma revisão bibliográfica com o auxílio da plataforma *PubMed* para o tratamento da dor pós-operatória pediátrica, ação necessária para

a conclusão de uma sinopse de um ensaio clínico. Com esta atividade consegui não só aprofundar os meus conhecimentos sobre tratamento e dor em pediatria, mas também perceber que a pesquisa bibliográfica é fundamental na área dos ensaios clínicos, visto que se trata de uma das maiores fontes de conhecimento e informação, permitindo a constante atualização sobre as mais diversas temáticas.

Deste modo, considero que tenha sido um ponto forte a autonomia e confiança depositada em mim por parte da equipa do departamento de *Clinical Trials* na execução das tarefas propostas, uma vez que sempre se mantiveram disponíveis para me ajudar e responder às minhas questões.

2.1.3. Formação na área dos Ensaio Clínicos

Segundo o princípio 8 da *guideline* sobre *Good Clinical Practice (GCP) International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, não existe especificação sobre a formação e experiência que deve ter cada elemento envolvido na condução de um estudo, no entanto, é obrigatório que os profissionais envolvidos na investigação clínica e que desempenham funções tanto nos centros de investigação clínica, como em CROs (*Clinical Research Organization*) ou a nível dos promotores, estejam qualificados para exercer as suas funções, nomeadamente em GCP e na legislação aplicável.⁴ Assim, de modo a que pudesse realizar as tarefas propostas pelo departamento, o meu plano *onboarding* consistia fundamentalmente na formação destes dois itens.

Adquirir os conhecimentos necessários em GCP permite aos vários intervenientes no estudo de investigação clínica tomar conhecimento sobre a segurança e a qualidade que os ensaios clínicos devem garantir, através da abordagem de temas como as responsabilidades, qualificações da equipa de investigação, papel das comissões de ética, obtenção do consentimento informado, documentação necessária, entre outros. Deste modo, no final do treino em GCP todos devem ser capazes de compreender que a segurança, o bem-estar e os direitos dos participantes devem ser protegidos e que os dados obtidos do estudo devem seguir os princípios ALCOA++ (*Attributable, Legible, Contemporaneous, Original, Accurate, Complete, Consistent, Enduring, Available*) de modo a garantir o rigor e integridade necessário na investigação clínica⁵.

Em Portugal é a Lei n.º 21/2014, de 16 de abril que visa a regulamentação da investigação clínica, pelo que é possível compreender quem são as entidades que intervêm na decisão sobre a realização e parecer de um ensaio clínico, são estas o INFARMED, I.P. e a Comissão de Ética para a Investigação Clínica (CEIC).

A partir do dia 31 de janeiro de 2023 todos os pedidos de ensaios clínicos começaram a ser submetidos via *Clinical Trials Information System* (CTIS). A submissão é composta por duas partes através deste processo centralizado, a primeira relativa à avaliação científica e comum a todos os Estados Membros que participam no estudo, e a segunda relativa aos requisitos locais sendo no caso de Portugal a avaliação e validação de um ensaio clínico ser da responsabilidade da INFARMED, I.P. e CEIC. Este regulamento permite que as candidaturas sejam feitas de forma única para ensaios realizados em diferentes países europeus, refletindo-se na redução dos encargos administrativos para os investigadores e promotores, no recrutamento mais ágil, na simplificação dos relatórios de segurança e na coordenação e rapidez para a autorização dos ensaios clínicos.

Por último, ainda tive a oportunidade de realizar um treino da *International Air Transport Association* (IATA) para o preparação e envio de amostras biológicas. Este treino proporcionou conhecimentos sobre os requisitos de embalagem, rotulagem e documentos necessários para o transporte destas amostras.

Indubitavelmente que todas as formações providenciadas e conhecimentos transmitidos foram cruciais para o desenvolvimento das atividades propostas e farão a diferença na minha entrada no mercado de trabalho.

2.1.4. Software para a gestão de ensaios clínicos

Determinados programas informáticos desempenham um papel fundamental na gestão de ensaios clínicos. A equipa do departamento de ensaios clínicos da PHAGECON, juntamente com uma equipa internacional, validou e customizou um software de gestão de ensaios clínicos e com o qual tive oportunidade de contactar. Este software é composto pelo *Clinical Trial Management System* (CTMS), *Interactive Web Response System* (IWRS), *electronic Trial Master File* (eTMF), *Master Data Management* (MDM) e futuramente terá o *Electronic Data Capture* (EDC).

O CTMS é uma aplicação do software que contém as ferramentas essenciais para o planeamento, gestão e acesso atualizado à informação do estudo, nomeadamente os centros de investigação, equipas de investigação, orçamento disponível, visitas de monitorização, aferição de *compliance*, rastreamento do *Investigational Product* (IP) via IWRS, entre outros. Esta plataforma permite que seja feita eficazmente a monitorização e análise das tarefas relativas ao estudo em tempo real, com o objetivo de minimizar erros e assim obter dados de excelência e de qualidade⁶.

O eTMF é um arquivo em formato digital que tem o objetivo de organizar e armazenar centenas de documentos, imagens ou outros conteúdos importantes para os ensaios clínicos, de acordo com Boas Práticas de Documentação. Neste arquivo encontram-se por exemplo, os *delegation log*, um documento que descreve quem são os elementos da equipa e as funções desempenhadas, o *curriculum vitae* do investigador principal ou certificados dos treinos de GCP. Ainda é possível visualizar qual o estado dos documentos no arquivo, uma vez que podem estar pendentes para revisão, aprovação ou publicação⁷.

O MDM é uma base de dados que permite introdução de dados relativos aos centros, equipas, países e outras informações sobre os ensaios clínicos. Esta base de dados tem como principal objetivo aumentar a produtividade e eficiência no processo dos ensaios clínicos⁸.

O EDC também designado por eCRF, *Electronic Case Report Form*, é uma plataforma na qual se encontra os dados dos participantes do estudo, nomeadamente o registo dos eventos adversos, medicação concomitante, histórico médico e os resultados de exames e análises feitas, de acordo com os requisitos defendidos no protocolo de investigação⁹.

No EDC, os participantes estão identificados através de um código, que de forma geral é em formato numérico. Por outro lado, no dossier do investigador existe um documento denominado *Subject Identification Log* onde se associa o número do processo clínico ao número do doente. Em qualquer lugar onde o promotor tenha acesso aos dados do doente, estes têm de ser sempre em formato pseudorandomizado, ou seja, o doente nunca pode ser identificado através do nome. Este sistema também permite que as equipas do promotor ou CRO, possam remotamente colocar questões aos centros de investigação. Estas discrepâncias ou pedidos de esclarecimentos são designadas *queries*, as quais tem de ser respondidas em tempo previamente definido por protocolo, sob pena de não cumprimento de métricas de desempenho⁹.

Dada a complexidade destas plataformas de gestão de ensaios clínicos, é importante que as equipas que com elas contactam tenham treinos específicos e exigentes de forma a que possam proporcionar dados de qualidade em tempo real. Para isso o seu acesso é definido por utilizador e as credências apenas são providenciadas após o comprovativo de treino.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Departamento em desenvolvimento

Apesar de a PHAGECON ser uma empresa criada em 2006, o departamento de *Clinical Trials* apenas foi criado em julho de 2021. A implementação de um departamento de ensaios clínicos é seguramente desafiante e complexa dada a exigência de processos e procedimentos

por parte de entidades regulamentares, pois estamos a lidar com o que é mais precioso, a vida dos doentes. Devido a várias situações internas e atrasos não previstos, o departamento de ensaios clínicos iniciou recentemente a procura exaustiva de parceiros de negócio. Desta forma, considero ser um ponto fraco não ter participado num projeto de CRO o que me poderia ter permitido ganhar outros conhecimentos. Por outro lado, pude participar e ajudar na delimitação de estratégias de um departamento em início de funções.

Apesar de ter acompanhado a realização de processos da qualidade, tais como as SOPs (*Standard Operating Procedure*), ter adquirido uma visão estratégica de negócio ter adquirido visão estratégica de negócio, formação específica na área dos ensaios, por vezes havia alguma desmotivação devido à falta de tarefas. Por isso, considero que o estágio teria tido um impacto muito mais positivo se tivesse tido a possibilidade de assistir a qual é o grande papel de um *Clinical Research Associate (CRA)*.

2.2.2. Duração do período de estágio

O período de estágio foi de apenas três meses, pelo que quando o departamento começou a avançar consideravelmente com a existência de centros disponíveis para a investigação clínica, e assim a possibilidade de estudos, o período do meu estágio curricular já se encontrava na fase final, não permitindo que pudesse acompanhar por exemplo, a gestão operacional de centros de investigação clínica, uma outra vertente de negócio do departamento de *Clinical Trials*. Dado a situação do departamento em desenvolvimento, considero que a duração do meu estágio curricular foi um ponto fraco, pois apenas consegui ficar familiarizada de forma muito geral sobre as atividades de uma CRO.

Por isso, considero que seria vantajoso haver um maior contacto das indústrias farmacêuticas com os estudantes ao longo do seu percurso académico, nomeadamente com sessões de formações nas diferentes áreas em que o farmacêutico pode colaborar profissionalmente, certamente que permitia fazer uma escolha muito mais consciente e informada sobre o futuro profissional.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Investigação Clínica – uma área em ascensão e repleta de oportunidades

Um ensaio clínico é definido como toda a investigação desenvolvida no ser humano, sendo este saudável ou com a patologia associada, com o foco de descobrir, verificar e identificar quais os efeitos clínicos, farmacológicos, farmacodinâmicos, farmacocinética ou adversos, proporcionando o melhor cuidado e tratamento aos doentes¹⁰.

A aquisição de conhecimentos sobre a investigação clínica foi sem dúvida uma grande oportunidade, visto que é uma área em constante ascensão e desenvolvimento. A implementação de ensaios clínicos tem vindo a crescer exponencialmente a nível mundial. Nos últimos anos em Portugal a investigação clínica estabilizou e houve períodos em que diminuiu, o que está relacionado com vários fatores como a dimensão da população, prevalência e incidência de patologias, complexidade administrativa, falta de literacia na área, centros de investigação com baixo desempenho, entre outros.

No entanto, há um esforço por parte das entidades, promotores e equipas de investigação em mudar este paradigma, pois somos um país com enorme potencial. Assim, é notória a importância de apostar nesta área, uma vez que os ensaios e estudos já realizados denotaram nitidamente as vantagens da investigação clínica. Estas vantagens traduzem-se não só, em novas soluções com qualidade, segurança e eficácia para o doente, mas também permite que o país e os profissionais de saúde entrem no radar do conhecimento científico e da inovação global, traduzindo-se em investimentos economicamente positivos por parte de *stakeholders* internacionais e nacionais.

A investigação clínica oferece diversas funções onde as valências como farmacêutico podem fazer a diferença tanto a nível do promotor, como numa CRO ou como *Clinical Research Coordinator* (CRC) num centro de investigação clínica. Assim, dando maior ênfase ao papel de um CRA, o mesmo é delegado pelo promotor ou pela CRO. O CRA irá ser a ponte de ligação entre o promotor/CRO e o centro de investigação clínica. Das tarefas alocadas a um CRA destacam-se a gestão e acompanhamento de um estudo clínico nos centros, por forma aferir a *compliance* dos centros e das equipas de investigação, em relação ao protocolo do estudo. Numa fase inicial, o CRA pode ser responsável pela avaliação de uma visita de exequibilidade, isto é, verificar qual a viabilidade do estudo e seleção dos centros mais adequados para a realização do mesmo.

Após o centro de investigação clínica ser selecionado para a condução do ensaio é feita a *Site Initiation Visit* (SIV), na qual é fornecida à equipa de investigação a formação e treino específico sobre os procedimentos e protocolos do estudo e do IP, com o objetivo de que durante a condução do estudo clínico tudo esteja de acordo com a regulamentação, GCP e a legislação aplicável. Durante o estudo e até ao final do mesmo, o CRA fará visitas de monitorização de modo a avaliar se a equipa de investigação têm sido *compliant*, por exemplo se o consentimento informado foi obtido de acordo com as GCP, se os dados inseridos no eCRF se encontram em conformidade com o descrito nos documentos originais que se encontram arquivados nos centros e se são inseridos no tempo acordado. Verifica também se

a documentação arquivada nos dossiers dos doentes e dossier do investigador está de acordo com os princípios ALCOA++. Após cada visita de monitorização, remota ou presencial, o CRA é responsável por fornecer ao promotor/CRO um relatório das atividades efetuadas durante a visita num período pré-estabelecido nas SOPs do promotor/CRO.

Em suma, considero que se trata de uma vertente profissional na investigação clínica com enorme potencial para um farmacêutico, visto que se traduz num notável avanço do desenvolvimento e fornecimento de opções de tratamento inovadoras ao ser humano, tendo por base os seus direitos e bem-estar. Infelizmente, as oportunidades de estagiar com profissionais da área da investigação clínica são bastante escassas, neste sentido considero que o meu estágio curricular nesta área será um fator diferenciador e determinante na altura da entrada no mercado de trabalho.

2.3.2. In Rotation Program

Nas últimas duas semanas do estágio curricular na PHAGECON tive a oportunidade de acompanhar as tarefas desempenhadas por parte das outras equipas que trabalham na empresa, nomeadamente o departamento de Farmacovigilância, Assuntos Regulamentares e Garantia de Qualidade.

Primeiramente, no departamento de Farmacovigilância participei numa formação com o objetivo de compreender qual a importância desta área na segurança dos doentes e quais as funções desempenhadas por cada elemento da equipa, tais como a execução do Dossiê Principal do Sistema de Farmacovigilância, Relatórios Periódicos de Segurança, Planos de Gestão de Risco e deteção de sinais de segurança. Noutro momento tive o privilégio de acompanhar de perto a revisão da literatura científica, uma atividade que ocupa a grande parte da equipa, uma vez que é realizada todas as semanas tanto a nível nacional como internacional, através de revistas científicas ou de bases de dados. Neste caso, acompanhei a pesquisa na plataforma *PubMed* em que de uma forma geral o objetivo é avaliar os *abstracts* dos artigos científicos, os quais contemplam o nome da substância ativa em análise. Assim, foi-me permitido pôr em prática os conhecimentos adquiridos na unidade curricular de farmacovigilância do MICEF, visto que muitos dos conceitos não me eram desconhecidos, o que me permitiu acompanhar e aproveitar melhor esta experiência.

O departamento de Assuntos Regulamentares foi o primeiro departamento da empresa, o que permitiu à PHAGECON impulsionar o seu crescimento e a ser considerada uma referência no setor farmacêutico. Nesta equipa acompanhei a inserção no folheto informativo e no resumo das características do medicamento as recomendações provenientes do Comité

da Avaliação do Risco em Farmacovigilância, que emite mensalmente um resumo relativo aos sinais de segurança. E ainda assisti ao preenchimento de um formulário para a submissão de uma alteração aos termos da Autorização da Introdução no Mercado ao INFARMED, I.P.

No departamento de Garantia de Qualidade tive possibilidade de acompanhar a realização de uma Revisão da Qualidade do Produto relativa a uma formulação farmacêutica em xarope. Este documento tem como base a revisão da qualidade do produto em causa, através da verificação dos fabricantes e produtores das respetivas substâncias ativas, excipientes e embalagem, e ainda a avaliação das ações corretivas e preventivas implementadas durante o processo do produto.

Por fim, ter acompanhado diretamente o trabalho e ter desempenhado algumas tarefas nas outras equipas da empresa foi sem dúvida uma enorme oportunidade, deste modo foi possível o estágio curricular oferecer-me outras experiências e uma visão para além das atividades relacionadas com a investigação clínica. Portanto, a possibilidade de contactar com os diferentes profissionais nas diferentes áreas onde as valências do farmacêutico desempenham um papel importante na indústria foi sem dúvida uma grande vantagem no meu percurso durante o estágio.

2.4. Ameaças

2.4.1. Aplicação limitada de conhecimentos adquiridos no MICF

A ameaça que senti durante o meu período de estágio curricular prende-se com o facto de o plano curricular do MICF não estar diretamente direcionado para os ensaios clínicos, o que no início se traduziu numa grande dificuldade em conseguir compreender e acompanhar as atividades realizadas no departamento, nomeadamente a utilização de termos e siglas que não me encontrava minimamente familiarizada.

No entanto, o conhecimento teórico adquirido durante o meu percurso académico sobre forma de como é desenvolvido e organizado um ensaio clínico foi sem dúvida uma mais valia, visto que me facilitou a maneira como adquiri e compreendi as formações iniciais. Deste modo, consegui perceber o valor e o papel do farmacêutico na área da investigação.

3. Conclusão

A realização do estágio curricular no departamento de *Clinical Trials* foi sem dúvida uma experiência desafiante e enriquecedora, e por isso após três meses considero que é um privilégio a FFUC possibilitar esta oportunidade aos estudantes. Sendo assim, afirmo que completei o objetivo da realização do meu estágio curricular, ao aprofundar os conhecimentos e competências adquiridas através da formação de excelência dada durante o meu percurso académico, e ainda alcançar uma visão de qual é o papel do farmacêutico fora da farmácia comunitária, neste caso em investigação clínica.

Toda a experiência pelos seus pontos fortes e oportunidades oferecidas, e igualmente pelos pontos fracos e ameaças sentidas foi bastante positiva e inesquecível, visto que fez com que contactasse e compreendesse todo o ambiente profissional do que é ser um especialista do medicamento a realizar as atividades e tarefas em ensaios clínicos.

Contactar diariamente com a área de investigação clínica foi bastante gratificante, e por isso não posso deixar de agradecer a toda a equipa do departamento de *Clinical Trials* por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade e carinho demonstrado para comigo durante estes três meses, que certamente nunca irei esquecer.

Indubitavelmente, concluo esta experiência como uma pessoa mais enriquecida tanto a nível pessoal como profissional, uma vez que estes três meses se traduziram numa mais valia através do conhecimento adquirido sobre como conseguimos oferecer aos doentes uma melhor qualidade de vida assegurando sempre o seu bem-estar e os seus direitos. E, por isso, tudo o que aprendi tanto relacionado com as atividades propostas, como com o trabalho e dinâmica em equipa, vai ser seguramente bastante benéfico para o meu futuro como profissional.

Bibliografia

1. PHAGECON - PHARMACEUTICAL SERVICES AND CONSULTING - **Manual da qualidade**. (2022). 15. ed: 1–24.
2. TEOLI, Dac; SANVICTORES, Terrence; AN, Jason - **SWOT Analysis** [Consult. a 18 de fevereiro de 2023]. Treasure Island, Florida : StatPearls Publishing, 2022 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537302/>>.
3. PHAGECON - PHARMACEUTICAL SERVICES AND CONSULTING - **Our Mission and Company Values** [Consult. a 18 de fevereiro de 2023] Disponível em: <https://phagecon.pt/missao.php>>.
4. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH) - **Integrated Addendum to ICH E6(R1): Guidline for Good Clinical Practice E6(R2)**. ICH HARMONISED GUIDELINE. [Consult. a 26 de março de 2023] (2016). 4: 1–60. Disponível em: https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf>.
5. NIH – GRANTS & FUNDING - **Good Clinical Practice Training** [Consult. a 26 de março de 2023] Disponível em: <https://grants.nih.gov/policy/clinical-trials/good-clinical-training.htm>>.
6. PHAGECON - PHARMACEUTICAL SERVICES AND CONSULTING - **Clinical Trial Management System**. (2022). 2:5 1–310.
7. PHAGECON - PHARMACEUTICAL SERVICES AND CONSULTING - **Electronic Trial Master File**. (2022). 3:7 1–193.
8. PHAGECON - PHARMACEUTICAL SERVICES AND CONSULTING - **Master Data Management**. (2022). 1:1 1–78.
9. PHAGECON - PHARMACEUTICAL SERVICES AND CONSULTING - **Electronic Data Capture**. (2022). 1:1 1–58.
10. ASSEMBLEIA DA REPÚBLICA - **Lei n.º 21/2014, de 16 de abril**. Diário da República. 75:1 (2014) 2450–2465.

Parte II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Soure

Sob orientação da Dra. Nádia Ramos



Lista de Abreviaturas

FC	Farmácia Comunitária
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
MICF	Mestrado Integrado em Ciência Farmacêuticas
MNSRM	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
MSRM	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
PIC	Preço Inscrito na Cartonagem
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>

I. Introdução

O plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) permite aos estudantes terem a oportunidade de entrarem em contacto com a realidade profissional, através da unidade curricular Estágio Curricular. Os principais objetivos do estágio curricular em Farmácia Comunitária (FC) passam por consolidar e aprofundar as competências e conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico, bem como compreender a verdadeira missão do farmacêutico comunitário.

A realização de um estágio curricular em FC revela-se de extrema importância, visto que permite complementar a formação teórica obtida durante o percurso académico e aplicar os conhecimentos anteriormente adquiridos. Nesse sentido, realizei o meu estágio na Farmácia Soure, entre o dia 3 de abril e 28 de julho, em Soure, sob a orientação da Dra. Nádía Ramos.

O farmacêutico comunitário é o profissional de saúde e especialista em medicamentos responsável pelo último contacto com o utente antes do início de qualquer medicação. A sua principal missão é garantir a promoção do uso responsável do medicamento, tendo sempre em consideração a saúde e o bem-estar da população.

A FC desempenha um papel crucial na população, sendo uma das principais fontes de cuidados de saúde primários. Para além das farmácias serem o local destinado à obtenção de medicação e outros produtos de saúde e bem-estar, são principalmente o local onde os utentes recebem aconselhamento personalizado de acordo com as suas necessidades e onde podem esclarecer as suas dúvidas sobre a terapêutica.

O presente relatório tem como objetivo descrever e fundamentar as competências adquiridas, as tarefas desempenhadas, bem como a minha experiência na Farmácia Soure.

2. Análise SWOT

A ferramenta estratégica utilizada para avaliar e analisar o estágio curricular é designada de análise SWOT, acrónimo das palavras *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities*, *Threats*, que se traduzem em Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças. Este procedimento permite obter uma avaliação interna, através dos pontos fortes e pontos fracos, e uma avaliação externa através das oportunidades e ameaças¹. Estes quatro parâmetros afetaram tanto de forma positiva como negativa o desempenho do meu estágio curricular.

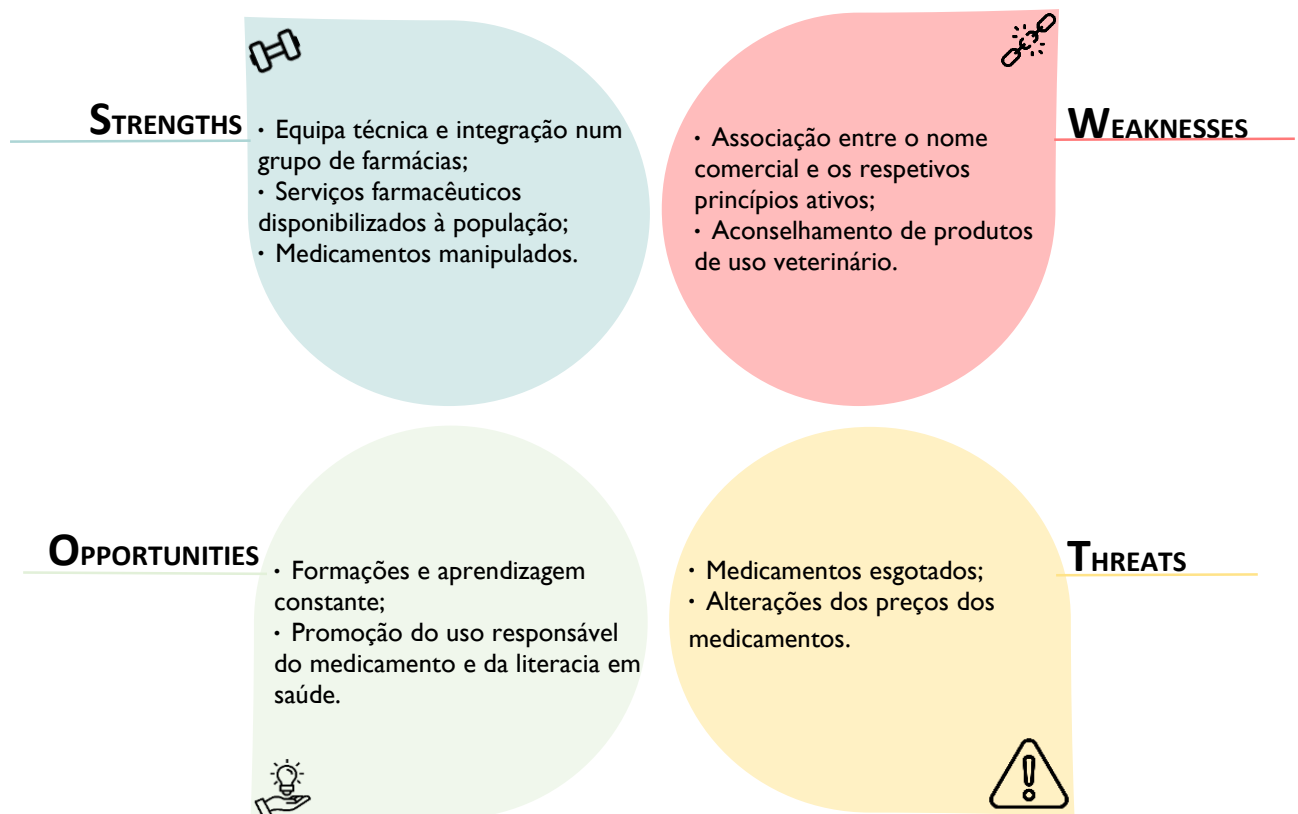


Figura I: Análise SWOT relativa ao estágio na Farmácia Soure.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Equipa técnica e integração num grupo de farmácias

A Farmácia Soure está situada no centro da vila de Soure, numa localização privilegiada, uma vez que corresponde à zona mais movimentada e onde se concentram os principais estabelecimentos comerciais. Esta localização é de extrema importância para a população característica da região, composta por utentes com mobilidade reduzida e de idade avançada. Assim, as instalações e a equipa técnica proporcionam diariamente aos utentes um espaço confortável e agradável, permitindo uma maior proximidade e um serviço de excelência a todos os utentes.

A equipa técnica da Farmácia Soure é composta por farmacêuticos e técnicos de farmácia, o que garante um elevado nível de profissionalismo e um espírito de equipa inigualável. Isto possibilitou a minha integração e um acompanhamento próximo em todas as etapas do meu estágio. Destaco, sobretudo, todo o conhecimento e competências transmitidas ao longo do período de estágio, bem como a disponibilidade no auxílio e na resposta às adversidades encontradas diariamente, aspetos cruciais para a minha evolução e desenvolvimento profissional nesta fase final do meu percurso académico.

A Farmácia Soure integra um grupo de 9 farmácias localizadas em diferentes pontos da zona centro. Em situações de medicamentos esgotados ou de produtos indisponíveis na própria farmácia, existe a possibilidade de troca de produtos entre as diferentes farmácias, assegurando assim a continuidade de um serviço de excelência. No que toca à gestão de *stocks*, é possível trocar produtos com baixa rotatividade de uma farmácia para outra onde esse mesmo produto tem maior saída, evitando possíveis quebras. Para além do descrito, existe um armazém pertencente a este grupo de farmácias que possibilita a aquisição de um maior número de produtos e por sua vez uma maior rentabilidade para a farmácia. Tal situação não seria possível por parte de uma farmácia com um volume de negócios reduzido. O facto de a farmácia pertencer a um grupo de farmácias bem estruturado permitiu-me contactar com uma dinâmica diferente e adquirir noções importantes sobre a gestão adequada de *stocks*.

A possibilidade de ter feito parte desta equipa foi, sem dúvida, um ponto forte para o sucesso do meu estágio curricular. Assistir de perto à forma como é possível posicionar o utente em primeiro lugar, oferecendo um aconselhamento personalizado e adequado às suas necessidades e expectativas, foi extremamente enriquecedor. Desta forma, foi possível construir uma relação de confiança sólida com os utentes, contribuindo para a sua fidelização.

2.1.2. Serviços farmacêuticos disponibilizados à população

Os serviços farmacêuticos disponibilizados pela farmácia têm como principal objetivo a promoção da saúde e bem-estar dos utentes. Dado o contexto em que a Farmácia Soure se insere, onde os seus utentes apresentam dificuldades em deslocar-se para consultas e exames e, na sua maioria, encontram-se sem médico de família, torna-se de extrema importância o desenvolvimento deste tipo de serviços. Posto isto, o papel do farmacêutico nestas situações é emergente, através da medição e avaliação dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos da população.

Na Farmácia Soure, vários parâmetros são medidos diariamente, como a glicemia, a pressão arterial e o colesterol total. Além disso, dispõe de um serviço de administração de medicamentos injetáveis e vacinas, preparação individualizada da medicação, consultas de podologia e rastreios auditivos, de doença venosa e dermocosmética. A intervenção farmacêutica prestada através destes serviços, para além de permitir a fidelização dos utentes à farmácia, possibilita um acompanhamento próximo capaz de detetar sintomatologias e fatores de risco associados a determinadas patologias. Caso seja necessário, é realizado o encaminhamento adequado para o médico.

Recentemente, a Farmácia Soure implementou um novo serviço de medição de pressão arterial, denominado de *Automated Office Blood Pressure*. Este serviço consiste numa medição durante dez minutos do valor real da pressão arterial do utente. Os primeiros cinco minutos destinam-se a deixar o utente relaxado e calmo, e nos cinco minutos seguintes são realizadas três medições separadas. O valor final consiste na média destas três medições. Este serviço surge em resposta às alterações que ocorriam devido ao efeito da bata branca e aos resultados obtidos apenas a partir de uma única medição, que podem causar viés na interpretação do valor final da pressão arterial². Destaco especialmente este serviço como um ponto forte do meu percurso, uma vez que me proporcionou adquirir novos conhecimentos relevantes na prática da monitorização da pressão arterial.

Além do objetivo principal de prevenção e controlo de determinadas doenças, o farmacêutico ao providenciar este tipo de serviços permite uma redução dos encargos para o Sistema Nacional de Saúde e liberta os cuidados de saúde primários e de urgência para situações que efetivamente requerem avaliação e cuidados especializados. Deste modo, o acompanhamento dos serviços farmacêuticos disponibilizados à população permitiu-me a criação de um elo de ligação com os utentes e analisar se a terapêutica previamente instituída estava de acordo com os seus parâmetros.

2.1.3. Medicamentos manipulados

Um medicamento manipulado consiste numa formulação preparada segundo uma receita médica ou de acordo com a farmacopeia ou formulário, em que o farmacêutico tem a responsabilidade de garantir a sua segurança e qualidade através do cumprimento das Boas Práticas de Preparação de Medicamentos Manipulados³.

A preparação deste tipo de medicamentos surge em consequência da falta de alternativas na indústria farmacêutica que colmatem uma determinada necessidade do utente, garantindo-lhe uma terapêutica personalizada. Através dos recentes avanços científicos e evolução na tecnologia farmacêutica, tem existido uma diminuição da necessidade de realizar este tipo de preparações. Porém, na Farmácia Soure tive o privilégio de acompanhar a preparação de manipulados e, deste modo, aplicar as competências galénicas adquiridas durante o percurso académico.

Neste sentido, para além da preparação propriamente dita do medicamento manipulado, houve a possibilidade de contactar com o preenchimento da ficha de preparação do medicamento manipulado, onde é necessário colocar as respetivas quantidades, prazo de validade, características organoléticas, cálculo do preço e condições de armazenamento. Posto isto, considero como ponto forte o contacto com a preparação de medicamentos manipulados, visto que me permitiu a aquisição de experiência na área da farmácia galénica, uma vertente na qual o farmacêutico exerce um papel diferenciado em relação a outros profissionais de saúde.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Associação entre o nome comercial e os respetivos princípios ativos

A dificuldade na associação entre os princípios ativos e os nomes comerciais foi, sem dúvida, um ponto fraco na fase inicial do meu estágio curricular em FC, sendo este um aspeto transversal a todos os estagiários. No entanto, é importante salientar que, a par da familiarização com alguns dos nomes comerciais durante o percurso académico, o contacto inicial com as embalagens com o nome comercial e respetivos princípios ativos durante a fase de entrada e armazenamento de *stock* terão sido pontos-chave para que esta dificuldade fosse gradualmente ultrapassada.

2.2.2. Aconselhamento de produtos de uso veterinário

Os produtos de uso veterinário têm uma elevada expressão de vendas na Farmácia Soure, uma vez que esta se localiza numa zona rural onde muitos utentes possuem diversas espécies

de animais. Neste sentido, existe uma procura recorrente pelo aconselhamento e aquisição de produtos da área de veterinária, nomeadamente desparasitantes internos e externos, suplementos alimentares, entre outros.

Sem dúvida que o aconselhamento de produtos de uso veterinário foi um ponto fraco relevante durante o meu estágio curricular em FC. Contudo, com a recorrência de situações similares, com toda a ajuda da equipa técnica da Farmácia Soure e com as formações realizadas sobre esta área, foi possível ultrapassar este aspeto e assim aconselhar de forma correta qual seria a solução mais indicada perante as situações apresentadas.

A existência de uma Linha Saúde Animal 24, disponível para qualquer pessoa, é seguramente uma vantagem. Do outro lado podemos encontrar profissionais especializados na área prontos a esclarecer todas as situações, desde as menores às mais complicadas. Deste modo, durante o meu estágio curricular tive a oportunidade de contactar com esta linha para o auxílio em vários casos. Assim, foi possível garantir a segurança do animal através de um aconselhamento direcionado.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações e aprendizagem constante

A área da saúde encontra-se em constante evolução, surgindo diariamente novos produtos ou abordagens diferentes a ter em conta durante o atendimento ao utente. As indústrias farmacêuticas providenciam aos farmacêuticos comunitários sessões de formações, de modo a apresentar os seus lançamentos e rever os produtos já existentes no mercado.

Naturalmente, com o avançar dos anos a população portuguesa aprimorou a sua literacia em saúde, igualmente influenciada pela comunicação social. Assim, o utente recorre à farmácia apenas para aquisição de um dado produto, não necessitando de qualquer aconselhamento farmacêutico. No entanto nestes casos, cabe ao farmacêutico prestar o devido aconselhamento, uma vez que é isso que nos diferencia.

A Farmácia Soure serve uma população com uma idade avançada e com baixo poder em literacia em saúde, pelo que na maioria das situações procuram o aconselhamento farmacêutico para adquirir a solução mais adequada para si perante as vastas opções existentes no mercado. As formações e a necessidade de procura pelo conhecimento são cruciais para que o farmacêutico seja capaz de oferecer esta resposta, em concordância com as necessidades e expectativas do utente durante o atendimento.

Durante o meu estágio na Farmácia Soure, tive o privilégio de assistir a várias formações nas diferentes áreas onde o farmacêutico se pode inserir. Porém, saliento uma formação direcionada para a área da oftalmologia, uma temática que nunca foi abordada ao longo do percurso académico. Através da informação providenciada nesta formação, adquiri os conhecimentos e a confiança necessários para aconselhar corretamente os produtos desta área.

Para além dos aspetos descritos, é importante salientar que as formações surgem em complemento ao conhecimento de excelência adquirido durante o percurso académico. As noções e consciencialização pelos diferentes princípios ativos e ingredientes são algo bastante marcado e positivo neste percurso. No entanto, existe uma lacuna na associação dos mesmos a um dado produto no mercado, algo que as formações conseguem colmatar. Porém, a formação académica ainda é capaz de promover nos estudantes uma atitude crítica perante as diversas informações retirada das formações, visto que na maioria dos casos, o foco são as vantagens de um dado produto em detrimento de outro existente no mercado.

2.3.2. Promoção do uso responsável do medicamento e da literacia em saúde

O farmacêutico tem como principal função a promoção da saúde pública e o uso racional dos medicamentos, uma vez que é o agente de saúde com o dever de garantir a segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos e outros produtos de saúde na população. Além disto, o farmacêutico comunitário, ao ser o último contacto com a população antes do início de qualquer terapêutica ou produto de saúde, deve garantir a adequada adesão à terapêutica, prevenir os riscos relacionados com a automedicação e evitar os erros de medicação.

No meu estágio curricular, perante o público-alvo, era essencial que a transmissão da informação sobre o uso responsável dos medicamentos fosse feita de forma clara e concisa. Só deste modo, a informação pode ser corretamente compreendida e assim assegurada a sua segurança. Perante a inserção num meio rural, é evidente a menor literacia em saúde, pelo que o farmacêutico desempenha um papel pragmático e preponderante na resposta ativa às questões apresentadas e na desmitificação de qualquer informação errada.

O facto de haver uma grande lacuna no acesso aos cuidados médicos, sobretudo de Medicina Geral e Familiar, traduz-se num acréscimo de utentes que recorrem à farmácia para a cedência de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) sem qualquer prescrição médica. Neste sentido, o farmacêutico tem a missão de alertar e informar sobre a responsabilidade associada à dispensa e utilização indevida deste tipo de medicação.

Na minha opinião, o papel do farmacêutico comunitário é por vezes desvalorizado pela maneira como o aconselhamento e cedência de medicamentos MSRM e Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) tem sido feito ao longo do tempo. Neste sentido, é urgente contrariar a situação, através da educação e promoção da literacia em saúde da população, bem como através da promoção do uso responsável dos medicamentos, tanto no momento do atendimento como em ações de sensibilização junto da população.

Em suma, considero que foi uma oportunidade durante o atendimento o facto de poder contribuir para o esclarecimento e fornecimento das informações necessárias ao uso de medicamentos, tais como posologia, modo de administração, efeitos secundários ou contraindicações. Destaco sobretudo, a possibilidade de consciencializar a população sobre a resistência aos antibióticos. Durante o meu estágio, surgiram vários utentes que afirmavam durante a cedência de antibióticos que nunca cumpriam o tratamento até à duração estipulada. Este tem-se tornado uma grande problemática de saúde pública e cabe também ao farmacêutico desmistificar este assunto.

2.4. Ameaças

2.4.1. Medicamentos esgotados

A existência de medicamentos em rutura de *stock* é um problema que se tem vindo a agravar ao longo do tempo. Tal situação advém de diversos fatores, nomeadamente a elevada exportação para outros países da União Europeia ou a falha na produção por parte dos fabricantes. Na maioria dos casos, não existe qualquer alternativa para os medicamentos esgotados, pelo que o utente se vê privado da toma habitual da sua medicação e, conseqüentemente, sujeito a agudização da sua situação clínica.

Durante o meu período de estágio, confrontei-me diversas vezes com esta situação, pelo que considero tratar-se de um grave problema para a saúde pública. A escassez de medicamentos leva a que o farmacêutico seja incapaz de exercer a sua principal missão na população, a garantia de bem-estar e saúde. Neste sentido, é necessário analisar a situação e implementar medidas que permitam às farmácias darem resposta a esta questão.

2.4.2. Alterações dos preços dos medicamentos

No início do ano de 2023, o Ministério da Saúde anunciou medidas para alteração do preço dos medicamentos. Neste sentido, os medicamentos de valor inferior a 15 euros viram os seus preços aumentar, enquanto os medicamentos acima de 15 euros e acima da média dos países europeus de referência tiveram uma redução do seu valor. Estas medidas têm como

principal objetivo a redução da exportação dos medicamentos, uma das causas da rutura e escassez de *stock* de medicamentos⁴. Este fenómeno, denominado de *parallel trade*, consiste na compra de um dado medicamento em Portugal que apresenta um valor mais reduzido, sendo posteriormente revendido noutro país da União Europeia a um preço mais elevado.

Assim, perante esta medida, muitos medicamentos sofreram alterações no Preço Inscrito na Cartonagem (PIC). Para além da atenção redobrada durante o atendimento por parte do farmacêutico na confirmação do PIC, surgiram várias questões por parte dos utentes ao observarem um aumento nas suas despesas mensais na farmácia. Neste sentido, a alteração de preços tornou-se uma ameaça durante o atendimento perante a população-alvo da Farmácia Soure, pelo que é importante consciencializar os utentes para o facto de que estas medidas não terem sido implementadas pela própria farmácia. A errada perceção do motivo do aumento dos preços poderia levar à diminuição da satisfação e fidelização dos utentes à farmácia.

3. Casos Práticos

3.1. Caso I - Cólicas no bebé

Uma senhora com aproximadamente 30 anos dirigiu-se à farmácia a pedir ajuda para o seu bebé de 2 meses. A utente referiu que o seu bebé estava a ter dificuldade em adormecer e não parava de chorar, devido a cólicas frequentes. Questionei se a utente estava a amamentar ou a usar fórmulas infantis. A mesma respondeu que estava a amamentar e que uma amiga a aconselhou a optar por parar o aleitamento materno e comprar uma fórmula infantil adaptada para as cólicas. No entanto, a utente queria saber se haveria outras soluções, visto que era o seu primeiro filho e não queria interromper a amamentação tão cedo.

Perante a situação, tranquilizei-a ao explicar que não era necessário parar a amamentação e que a primeira opção para resolver o problema não seria a utilização de fórmulas adaptadas, uma vez que as mesmas, com exceção das fórmulas adaptadas hipoalergénicas, devem ser usadas apenas num curto espaço de tempo e se não houver outra alternativa. Expliquei que a abordagem inicial para tratar as cólicas do bebé seria recorrer à administração de um antiflatulento e um probiótico. No entanto, se isso não resolvesse o problema, teria de considerar a adição de lactase. Se as cólicas diminuíssem com a administração de lactase, poderia continuar a amamentar juntamente com a sua administração ou optar por uma fórmula infantil sem lactose⁵.

Nesse sentido, aconselhei a administração de 5 a 10 gotas, 3 a 4 vezes ao dia de Aero-OM® Emulsão Oral, que contém simeticone indicado para o alívio do desconforto abdominal, juntamente com a administração de 5 gotas, 1 vez ao dia de BioGaia® que é constituído por *Lactobacillus Reuteri Protectis* indicado para a manutenção da motilidade intestinal e normalização da flora intestinal. Alertei que o tratamento não deveria exceder 10 dias e, se os sintomas não melhorassem neste período, deveria dirigir-se novamente à farmácia^{6,7}.

Passados os 10 dias, a senhora retornou à farmácia e afirmou que o tratamento aliviou consideravelmente o bebé, mas que havia alturas em que o bebé piorava. Expliquei que apenas a partir dos 3 ou 4 meses o bebé começa a produzir a quantidade necessária de enzima para degradar a lactose do leite materno. Sugeri a administração de 8 gotas de ColiPrev® por refeição, composto pela enzima lactase responsável pela melhoria do desconforto abdominal e manutenção do pH ácido do estômago. Sugeri igualmente que se continua-se a amamentar, deveria fazer uma redução gradual da dose de ColiPrev®, a partir dos 3 ou 4 meses. Expliquei que deveria fazer para se verificar se o bebé já produz a quantidade suficiente de lactase ou se existe a possibilidade de ser intolerante à lactose. Se for esse o caso, então deveria optar por uma fórmula infantil sem lactose⁸.

3.2. Caso 2 - Ansiedade e perturbações *minor* do sono

Uma jovem de 18 anos recorreu à farmácia queixando-se que tem estado mais ansiosa e stressada há cerca de uma semana. Consequentemente, não consegue dormir à noite e por isso solicitou um ansiolítico. Durante a conversa, questionei sobre quais os sintomas sentidos e qual seria a principal causa. A jovem respondeu que tem sentido preocupação constante e uma sensação de medo perante a aproximação dos exames. Desta forma, é possível pressupor que se trata de um episódio ligeiro de curta duração de ansiedade.

Antes de qualquer cedência de terapêutica farmacológica, sugeri que praticasse algum tipo de atividade física, pois seria importante para se distrair e para não se focar constantemente no problema. Sugeri que devia evitar ingerir uma grande quantidade de alimentos ou líquidos antes da hora de deitar. Alertei, ainda, que devia tentar deitar-se cedo e dormir as oito horas, o que seria essencial para evitar sentir-se cansada durante o dia e para consequentemente melhorar a sua concentração e produtividade.⁹

Em seguida, expliquei que os ansiolíticos são MSRM, pelo que é necessária uma avaliação por parte de um médico e se necessário a sua prescrição. Assim, recomendei o Advancis® Passival Relax, um suplemento alimentar composto por extrato de *Valeriana officinalis*, *Passiflora*

incarnata, nêveda, *Humulus lupulus* e a laranjeira. Estas substâncias funcionam de forma sinérgica como tranquilizantes naturais, melhorando a qualidade do sono e reduzindo a ansiedade¹⁰.

Por fim, expliquei que a toma seria dois comprimidos à noite, preferencialmente 30 minutos antes de deitar, juntamente com dois comprimidos ao pequeno-almoço. Expliquei também que o tratamento não causava qualquer tipo de habituação e que, caso não houvesse melhoria após duas semanas, seria aconselhável consultar um médico.

3.3. Caso 3 - Acne no adulto

Uma senhora de 23 anos dirigiu-se à farmácia solicitando uma solução para a sua pele, que se encontrava com crises de acne na zona do queixo. A própria referiu que a interrupção do seu método contraceptivo hormonal terá espoletado a situação. Questionei-a se já estava a utilizar algum tipo de produto para a situação, ao que respondeu que não.

Alertei-a para o facto do tratamento da acne se basear na limpeza, hidratação e fotoproteção adequada, e que seria necessária uma rotina de cuidados de pele consistente para observar os resultados pretendidos. Nesse sentido, recomendei a limpeza diária de manhã e à noite com o gel purificante em mousse da linha EFFACLAR da La Roche Posay, composto por zinco, capaz de purificar a pele e reduzir o sebo. Em conjunto, sugeri o cuidado corretor de imperfeições EFFACLAR DUO(+), um creme em gel capaz de hidratar e matificar a pele, para aplicar de manhã e à noite^{11,12}.

Sugeri, ainda, que experimentasse o sérum ultra concentrado da mesma linha, composto por três ácidos: ácido salicílico, ácido glicólico e ácido capriloil salicílico. Estes compostos são capazes de limpar em profundidade os poros, ativar a renovação da pele e promover uma microexfoliação da pele. No entanto, ressaltai que este produto apenas deve ser utilizado na rotina de cuidados de pele da noite¹³.

Por fim, salientei a importância de não manipular as lesões na pele, bem como evitar a utilização de maquilhagem ou outros produtos comedogénicos. E, acima de tudo, enfatizei a necessidade de ser paciente, visto que os resultados só serão visíveis após algumas semanas¹⁴.

3.4. Caso 4 - Suspensão pressurizada para inalação

Um senhor na casa dos 70 anos dirigiu-se à farmácia com uma prescrição médica da suspensão pressurizada para inalação Symbicort[®] que contém o corticosteroide budesonida e o broncodilatador formoterol. Questionei se seria a primeira vez ou se já fazia parte da sua medicação habitual. Em resposta à minha pergunta, o utente referiu que nos últimos tempos

sentiu alguns sintomas de falta de ar e sensação de aperto na zona do tórax e, por isso, achou melhor dirigir-se ao médico. Acrescentou ainda, que o médico o encaminhou de imediato para a realização de testes de função respiratória através de espirometria, com o objetivo de avaliar o seu desempenho pulmonar. Perante os valores apresentados nos exames, o senhor foi diagnosticado com doença pulmonar obstrutiva crónica e por isso, para o tratamento e controlo da sintomatologia, era necessário fazer duas inalações duas vezes por dia com o inalador prescrito.

O meu cuidado perante a cedência da suspensão pressurizada para inalação foi explicar como se prepara o inalador para a sua utilização e como deve ser administrado. Primeiramente, após agitar o inalador por breves segundos, deve-se remover a tampa junto do bocal e mantê-lo numa posição vertical. Em seguida, apertar na parte superior do inalador para libertar a suspensão no ar e agitar novamente. Este processo deve ser repetido pelo menos mais duas vezes caso seja a primeira vez que o está a ser usado, se não tiver sido utilizado por mais de sete dias ou se não estiver guardado numa posição horizontal. Após garantir que o inalador está apto a ser utilizado, este deve ser novamente agitado e a sua tampa removida. Reiterei que o utente deve expirar durante 2 segundos, colocar o inalador na boca e começar a inspirar lentamente e profundamente pela boca. Nesse momento, deve pressionar na parte superior do inalador e inspirar lentamente até encher completamente os pulmões. De seguida, deve reter a inspiração por pelo menos 10 segundos e, em seguida, deixar de pressionar o inalador. Por fim, expirar lentamente e aguardar 1 minuto para realizar a segunda inalação¹⁵.

Em suma, alertei para o facto de ser importante guardar o inalador na posição vertical e, após a sua administração, bochechar com água para evitar algum problema de candidíase orofaríngea.

3.5. Caso 5 - Peladas

Um utente com cerca de 30 anos deslocou-se à farmácia, queixando-se que o seu gato tem vindo a perder pelo com maior frequência do que o habitual nos últimos tempos, apresentando já algumas peladas na zona da cabeça. Por essa razão, tranquilizei-o explicando que é comum que os animais percam mais pelo nas alturas de calor e de frio, como parte da estratégia do organismo para regular a temperatura corporal. Assim, sugeri que deveria reforçar a higiene e a escovagem do pelo, optar por uma ração adaptada, assegurar a ingestão adequada de água e realizar a desparasitação interna e externa de forma regular.

Para tratar a zona das peladas, aconselhei a aplicação tópica do creme Omnimatrix, que contém óxido de zinco e extratos de plantas com propriedades cicatrizantes, antioxidantes e anti-inflamatórias, promovendo a regeneração do pelo no local. Salientei que, antes da aplicação do creme, é importante limpar a área afetada e a zona envolvente. O creme deve ser aplicado numa camada fina, pelo menos duas vezes por dia. Alertei para o facto de não haver um tempo definido para a aplicação contínua do creme, pelo que poderia ser aplicado até à situação normalizar¹⁶. Contudo, reforcei que caso a situação piorasse deveria dirigir-se ao veterinário.

4. Conclusão

O estágio realizado na Farmácia Soure foi uma experiência enriquecedora e valiosa que me proporcionou uma visão aprofundada do papel fundamental do farmacêutico comunitário. Ao longo deste período, pude enfrentar desafios e superar algumas das minhas limitações. Adicionalmente, desenvolvi habilidades essenciais no aconselhamento individualizado, nomeadamente na comunicação, o que permitiu criar um elo de confiança com o utente.

Durante este período, também percebi a importância do farmacêutico acompanhar as constantes mudanças e evoluções do mercado farmacêutico. Só deste modo, é possível garantir que os utentes têm acesso aos seus tratamentos, sem comprometer a sua saúde e bem-estar. O contacto direto e diário com os utentes permitiu-me compreender as suas necessidades e preocupações, possibilitando-me assim ter um papel crucial na sua saúde, através de um atendimento personalizado.

A equipa da Farmácia Soure desempenhou um papel fundamental no meu crescimento profissional, fornecendo o apoio, a orientação e o conhecimento essencial para a minha formação como farmacêutica. A sua dedicação e profissionalismo foram inspiradores e mostraram-me o verdadeiro significado do cuidado focado no utente.

Em suma, o estágio na Farmácia Soure foi uma experiência inigualável que me preparou para enfrentar quaisquer desafios futuros. Desta forma, resta-me agradecer a todos os elementos da equipa técnica pelas oportunidades que me foram concedidas.

Bibliografia

1. TEOLI, Dac; SANVICTORES, Terrence; AN, Jason - **SWOT Analysis** [Consult. a 18 de fevereiro de 2023]. Treasure Island, Florida : StatPearls Publishing, 2022 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537302/>>.
2. MYERS, Martin G. - **Automated Office Blood Pressure Measurement**. Korean Circulation Journal. ISSN 1738-5520. 48:4 (2018) 241–250. doi: 10.4070/kcj.2018.0066.
3. INFARMED – AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I. P. - **Medicamentos Manipulados** [Consult. a 1 de junho de 2023] Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>>.
4. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Medicamentos mais baratos aumentam de preço para diminuir ruturas** [Consult. a 1 de junho de 2023], atual. 2023. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/medicamentos-mais-baratos-aumentam-de-preco-para-diminuir-ruturas/>>.
5. ZEEVENHOOVEN, Judith *et al.* - **Infant colic: mechanisms and management**. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology. ISSN 1759-5053. 15:8 (2018) 479–496. doi: 10.1038/s41575-018-0008-7.
6. INFARMED – AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I. P. - **Resumo das Características do Medicamento - Aero-OM®, 105 mg/ml, emulsão oral**, atual. 2023.
7. JABA RECORDATI S.A - **BioGaia®** [Consult. a 1 de junho de 2023] Disponível em: <https://www.jaba-recordati.pt/pt/produtos-farmaceuticos/suplementos-alimentares/biogaia>>.
8. FARMÁCIAS PORTUGUESAS - **ColiPrev®** [Consult. a 1 de junho de 2023] Disponível em: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/coliprev-gotas-orais-frasco-conta-gotas-15ml-7364752.html>>.
9. INSTITUTO PHARMCARE - **Protocolo de Indicação Farmacêutica na Ansiedade e perturbações minor do sono**. Farmácia Distribuição. (2018). 306.
10. ADVANCIS PHARMA - **Advancis® Passival Relax** [Consult. a 1 de junho de 2023] Disponível em: <https://www.advancispharma.com/pt/sono-ansiedade-stress/passival-relax/>>.
11. ROCHE POSAY, LA - **EFFACLAR Gel Purificante** [Consult. a 1 de junho de 2023] Disponível em: <https://www.laroche-posay.pt/effaclar/effaclar-gel-mousse-purificante>>.

12. ROCHE POSAY, LA - **EFFACLAR DUO (+)** [Consult. a 1 de junho de 2023] Disponível em: <https://www.laroche-posay.pt/effaclar/effaclar-duo-plus>>.
13. ROCHE POSAY, LA - **EFFACLAR Sérúm** [Consult. a 1 de junho de 2023] Disponível em: <https://www.laroche-posay.pt/effaclar/effaclar-ultra-concentrated-serum>>.
14. INSTITUTO PHARMCARE - **Protocolo de Indicação Farmacêutica no Acne.** Farmácia Distribuição. (2018). 312.
15. INFARMED – AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I. P. - **Resumo das Características do Medicamento - Symbicort 160 microgramas/dose + 4,5 microgramas/dose suspensão pressurizada para inalação,** atual. 2016.
16. HIFARMAX - **Omnimatrix** [Consult. a 1 de junho de 2023] Disponível em: <https://www.hifarmax.com/pt/ac/produtos/omnimatrix>>.

Parte III
Monografia

“Isoeugenol, a skin allergen with therapeutic potential in Diabetes
mellitus”

Sob orientação da Professora Doutora Sónia Silva Santos

Abstract

Uncontrolled hyperglycaemia induces an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), molecules that cause oxidative damage to cells and trigger the activation of various inflammatory pathways. Isoeugenol has demonstrated remarkable potential in reducing oxidative stress and inflammation associated with diabetes mellitus (DM). The exact mechanism of action is not yet fully elucidated, but it involves the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), leading to an upregulation of several antioxidant enzymes. Additionally, isoeugenol inhibits the translocation of nuclear factor κ B (NF- κ B), resulting in a reduction in the expression of pro-inflammatory cytokines. Despite promising results obtained in animal studies, further investigations are required to establish the efficacy and safety of isoeugenol in humans. Well-designed clinical trials are essential to better understand the role of isoeugenol as an adjunctive therapy in the treatment of DM-associated complications, including diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy. This document aims to explore and elucidate the antioxidant and anti-inflammatory role of isoeugenol, paving the way for future advancements in DM management.

Keywords: isoeugenol, diabetes mellitus, oxidative stress, inflammation, reactive oxygen species, Nrf2, NF- κ B.

Resumo

A hiperglicemia não controlada induz o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas estas que causam dano oxidativo às células e desencadeiam a ativação de várias vias inflamatórias. O isoeugenol tem demonstrado um notável potencial na redução do *stress* oxidativo e inflamação associados à diabetes *mellitus* (DM). O mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, no entanto envolve a ativação do *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), o que resulta no aumento de diversas enzimas antioxidantes. Além disso, o isoeugenol inibe a translocação do *nuclear factor κB* (NF-κB), que por sua vez permite uma redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Apesar dos resultados promissores obtidos em estudos com modelos animais, são necessárias investigações adicionais para estabelecer a eficácia e segurança do isoeugenol em seres humanos. Ensaios clínicos bem desenhados são essenciais para compreender melhor o papel do isoeugenol como terapia coadjuvante no tratamento de complicações associadas à DM, incluindo a neuropatia diabética, retinopatia e nefropatia. O presente documento tem como objetivo explorar e esclarecer o papel antioxidante e anti-inflamatório do isoeugenol, abrindo caminho para os avanços futuros no cuidado da DM.

Palavras-chave: isoeugenol, diabetes *mellitus*, *stress* oxidativo, inflamação, espécies reativas de oxigênio, Nrf2, NF-κB.

List of abbreviations

ACR	Acrylamide
ADMET	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity
AGEs	Advanced Glycation End Products
ARE	Antioxidant Response Element
ATP	Adenosine Triphosphate
CAT	Catalase
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAG	Diacylglycerol
DM	Diabetes Mellitus
DMF	Dimethyl Fumarate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
GABA	Gamma-aminobutyric Acid
GAD 65	Glutamic Acid Decarboxylase 65
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GDM	Gestational Diabetes Mellitus
GLUT-2	Glucose Transporter Type 2
GLUT-4	Glucose Transporter Type 4
GPX	Glutathione Peroxidase
GSH	Reduced Glutathione
GSSG	Oxidized Glutathione
HLA	Human Leukocyte Antigen
HO-1	Heme Oxygenase-1
IL	Interleukin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IRS	Insulin Receptor Substrates
KEAPI	Kelch-like ECH-associated Protein 1
MG	Methylglyoxal
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
NAD⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NQO1	NADPH quinone oxidoreductase 1

NF-κB	Nuclear Factor κB
NO	Nitric Oxide
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2
PAI-I	Plasminogen Activator Inhibitor I
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PKC	Protein Kinase C
RAGE	Receptors for Advanced Glycation End Products
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxide Dismutase
STZ	Streptozotocin
T1DM	Type 1 Diabetes Mellitus
T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TGF-β	Transforming Growth Factor
TGF-β1	Transforming Growth Factor 1
TNF-α	Tumour Necrosis Factor α
TRP	Transient Receptor Potential
UDP-GlcNac	Uridine Diphosphate-N-Acetylglucosamine
ZnT8	Zinc Transporter 8

I. Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease characterised by high blood glucose levels, a condition called hyperglycaemia, that occurs when the pancreas cannot produce enough insulin or when peripheral tissues cannot use properly the insulin produced, being considered a serious public health problem^{1,2}.

According to the International Diabetes Federation, in Europe, 1 in every 11 adults between 20-79 years old has DM, and 1 in 3 live with undiagnosed DM. It is expected that between 2021 and 2045 there will be a 13% increase in the number of people with DM. Portugal is the second country in Europe with the highest prevalence of DM in adults between 20-79 years old, with a value of 13% in 2021, and still, approximately 433 thousand adults between 20-79 years old have undiagnosed diabetes².

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) corresponds to 5-10% of the cases, with a higher incidence in childhood and adolescence. On the other hand, Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) represents about 90% of cases, being the most frequent form of DM³. The prevalence and incidence of this pathology has increased over time worldwide, as there is an increase in cases of obesity, increasingly sedentary lifestyles and an aging population⁴.

When we have chronically high levels of glucose, there is consequently long-term damage and dysfunction of various organs, such as the cerebral vasculature, vessels of the eye, coronary arteries, kidney arteries, and peripheral nervous system, precisely with non-insulin dependent tissues that do not need insulin for glucose to enter. These are where most of the complications associated with DM occur⁵.

The significant role of oxidative stress in the pathogenesis of complications associated with DM has been firmly established. This hypothesis is propelling ongoing research efforts and guiding the strategic development of innovative therapeutic options. Therapeutic approaches based on substances with recognized antioxidant and anti-inflammatory activities have been suggested, as is the case of skin allergens⁶. Despite their immune-stimulating effects, these compounds demonstrate valuable antioxidant effects by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), leading to the expression of anti-inflammatory and antioxidant enzymes. Thus, skin allergens exhibit significant potential in the therapeutic management of metabolic and neurodegenerative diseases⁷.

Given the relevance of this subject, a review of the literature was made on the therapeutic potential of the skin allergen isoeugenol, in the context of DM.

2. Glucose homeostasis

The pancreas has an exocrine and an endocrine part. The endocrine pancreas consists of the islets of Langerhans, which contain α -cells that secrete glucagon, β -cells that release insulin, and finally δ -cells that produce somatostatin that exerts a paracrine action on the former ones¹.

Glucose homeostasis is achieved through the action of insulin and glucagon on glucose metabolism and uptake. Glucose uptake and utilization by peripheral tissues through glycolysis is driven by insulin⁸.

When food is ingested, blood glucose levels increase, and in response insulin levels increase. If there is excess glucose it will be taken up at the liver, and in its turn insulin promotes glycogenesis, which means glucose storage in the form of glycogen. Insulin will also promote glucose uptake and lipogenesis in adipose tissue, and protein synthesis in skeletal muscle^{1,9}.

Being insulin an anabolic hormone, in cases of DM, the absence or ineffectiveness of insulin leads to situations of catabolism of the skeletal muscle and adipose tissue with excessive production of ketone bodies by the liver from fatty acids, a situation called ketoacidosis.

Besides the degradation of adipose tissue through lipolysis there is also proteolysis at the skeletal muscle with subsequent synthesis of glucose by the liver through gluconeogenesis. These catabolic processes are also seen in a fasting situation, where the low levels of glucose in the blood will increase the secretion of glucagon and will decrease the secretion of insulin^{1,8}.

In the post prandial situation the increased blood glucose levels lead to glucose uptake into pancreatic β -cells by the glucose transporter type 2 (GLUT-2), a non-insulin dependent glucose transporter constitutively present. Once inside the cell, glucose will be metabolized in the mitochondria through the Krebs Cycle generating energy in the form of adenosine triphosphate (ATP), and in turn the K^+ /ATP dependent channel present in the plasma membrane of the cell will open. Consequently, with the output of intracellular K^+ , there is a depolarization of the membrane and voltage-dependent Ca^{2+} channels will open, leading to Ca^{2+} influx. The increase in Ca^{2+} at the intracellular level allows for the mobilization of insulin-containing granules to the membrane, and thus the exocytosis of insulin into the bloodstream⁸.

3. Insulin signalling pathways

Glucose-dependent insulin secretion is stimulated through three distinct pathways: direct pancreatic β -cells stimulation; the parasympathetic nervous system stimulation; and digestive hormones called incretins stimulation¹.

Insulin performs its metabolic effects through its binding to its receptor on target cells, in a tyrosine kinase receptor that is composed of two extracellular α -subunits and two intracellular β -subunits, that function as allosteric enzymes. The β -subunit has tyrosine kinase activity, which means that when insulin binds to the α -subunit, there will be tyrosine kinase activation, which in turn triggers autophosphorylation of the β subunit and catalyses the phosphorylation of cellular proteins, in particular the insulin receptor substrates (IRS). These proteins will then interact with the molecules responsible for signalling, including the activation of phosphoinositide 3-kinase. The activation of these pathways will mediate insulin-dependent activities, such as regulation of glucose transporter type 4 (GLUT4) vesicle traffic, gene transcription, cell growth, differentiation, and synthesis of proteins, lipids, and glycogen^{8,9}.

4. Diabetes Mellitus – Classification and pathophysiology

Hyperglycaemia represents the fundamental hallmark underlying all manifestations of DM, making its classification complex and extensively debated over the years. The two main types of DM, T1DM and T2DM, are considered based on distinct aetiology and genetic predispositions. Understanding the diverse nature of these types of diabetes is crucial for the effective diagnosis, treatment, and overall management of the disease. However, the progression of scientific knowledge has revealed new pathological presentations of DM, leading to the categorization in other specific types of diabetes^{2,3,10}.

4.1. Type I Diabetes Mellitus

In general, T1DM is characterised by the absence of insulin production as a result of pancreatic β -cells destruction. It was always thought that T1DM only developed in childhood and progressed with age, however, it is now known that the disease can develop at any age, as well as in adulthood⁸.

In most cases, this destruction is due to an autoimmune mechanism called immunomediated T1DM, that is, for some reason the body stops recognising pancreatic β -cells producing antibodies against endogenous antigens of these same cells. This autoimmune

attack leads to an inflammatory lesion in the islets of Langerhans, a process called insulinitis, which in turn leads to pancreatic β -cell apoptosis^{3,11,12}.

This form of DM can be detected by autoimmune markers such as circulating islet autoantibodies. These autoantibodies act against the tyrosine phosphatases IA-2 and IA-2 β , responsible for cell signalling in the islets of Langerhans; against glutamic acid decarboxylase 65 (GAD 65), responsible for the synthesis of the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) which plays a role in the functional regulation of β -cells; and against insulin and zinc transporter 8 (ZnT8), a protein with a role in insulin secretion¹¹. In addition, there may be a genetic predisposition related to the human leukocyte antigen (HLA) gene of the major histocompatibility complex (MHC) at the DR3/DR4 locus. Finally, it may also be related to environmental factors, although its influence has not yet been concretely understood⁸.

In immune-mediated T1DM the rate of pancreatic β -cell destruction may vary according being faster in children than in adults¹¹.

On the other hand, in some cases there is no immune marker, in other words, no antibodies are produced against pancreatic β -cell, so it is called idiopathic T1DM³.

The diagnosis of T1DM is made through the symptoms, which appear suddenly over 2 to 3 weeks in these patients. These are frequent urination (polyuria) as a consequence of the presence of glucose in the urine (glycosuria), excessive thirst (polydipsia), constant hunger (polyphagia), tiredness and lack of energy, blurred vision, infections, ketoacidosis and sudden weight loss².

The pathophysiology of T1DM is not associated with obesity, therefore the majority of patients are not overweight, that is because the organism confronted with a state of absence of insulin will use skeletal muscle and adipose tissue as an alternative source of energy. In the skeletal muscle, there will occur the release of amino acids by degradation of proteins, these are then used in the liver for the conversion to glucose through a process called hepatic gluconeogenesis as mentioned before. In the adipose tissue, there is lipolysis with degradation of the triglycerides in fatty acids, which are in turn used by the liver in the synthesis of ketone bodies, as an alternative source of energy, causing a decrease in the plasma pH, resulting in a situation of diabetic ketoacidosis⁵.

4.2. Type 2 Diabetes Mellitus

T2DM is the most frequent form of the disease and its aetiology is associated with the involvement of environmental, genetic factors and a pro-inflammatory state, with no autoimmune destruction of pancreatic β -cells^{8,11}.

The development of T2DM involves two metabolic defects: insulin resistance, in which there is a decreased insulin-dependent tissue response to insulin leading to increased blood glucose levels; and pancreatic β -cell dysfunction, resulting from an initial insulin hypersecretion in order to compensate for the hyperglycaemia and culminating in a dysfunction for not being able to maintain this state of sustained hypersecretion^{8,13}.

Insulin resistance is characterised by impaired glucose uptake and a failure of insulin response in insulin-dependent tissues, namely in skeletal muscle, adipose tissue, and liver. As a compensatory mechanism, the liver produces glucose from its glycogen stores, resulting in hyperglycaemia, while pancreatic β -cells increase insulin production to restore normal glucose levels¹³.

Over time, it has been recognized that inflammation plays a significant role in the pathophysiology of T2DM. This is attributed to the adipose tissue macrophage infiltration, which triggers the activation of the inflammasome, a multiprotein cytoplasmic complex involved in innate immunity. Consequently, an inflammatory environment is established, mediated by pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and IL-1 β . These cytokines are serine/threonine-specific protein kinases and disrupt the insulin signalling pathway by phosphorylating IRS on serine/threonine amino acid residues instead of tyrosine amino acid ones. This disruption compromises the translocation of GLUT4 to the plasma membranes^{8,14}.

In addition to the decreased glucose uptake in insulin-dependent tissues, there is a failure to inhibit endogenous glucose production by the liver, a failure in glycogen synthesis in skeletal muscle and an activation of lipases in adipose tissue, leading to excessive degradation of triglycerides in adipocytes and increased levels of free fatty acids in circulation. All these failures will lead to a sharp increase in blood glucose levels, which is highly harmful to the body, causing complications associated with DM⁸. Figure 1 describes the general mechanism of inflammation's role in insulin resistance.

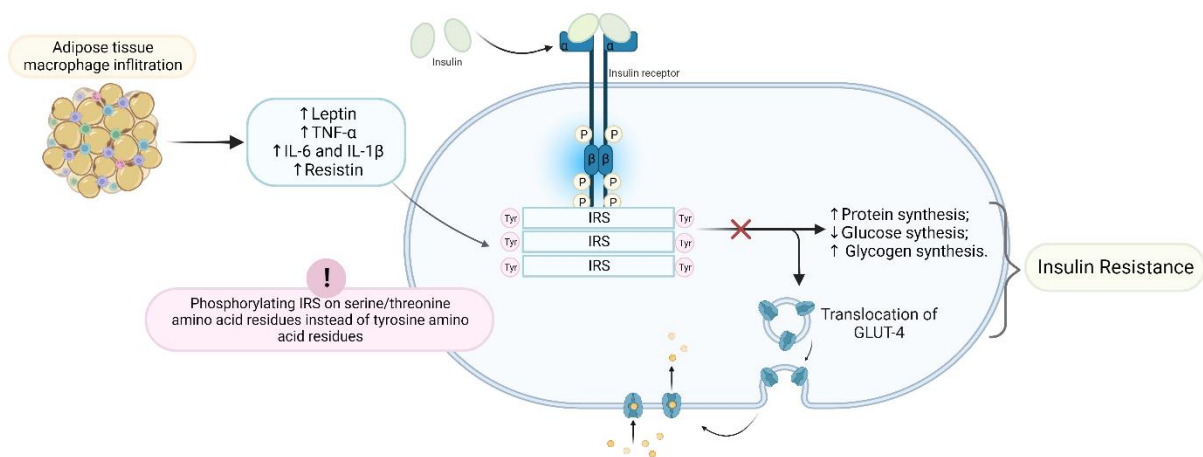


Figure 1. The general mechanism of inflammation's role in insulin resistance. The infiltration of macrophages into adipose tissue prompts the expression of a range of factors. The cytokines interface with the insulin signaling pathway through the phosphorylation of IRS at serine/threonine amino acid residues, instead of tyrosine amino acid residues. Consequently, this results in a reduction of glucose uptake due to the inhibition of GLUT-4 receptor translocation. Additionally, there is a failure in glucose production in the skeletal muscle, liver, and adipose tissue. These situations culminate in insulin resistance in the cells of insulin-dependent tissues. Abbreviations: GLUT-4, Glucose Transporter Type 4; IL, Interleukin; IRS, Insulin Receptor Substrates; TNF- α , Tumour Necrosis Factor α ; Tyr, Tyrosine; \uparrow , increased; \downarrow , decreased. The figure was created using BioRender.com.

Over time pancreatic β -cells exhaust their compensatory capacity for insulin resistance, and the state of hyperinsulinemia gives rise to a state of hypoinsulinemia, in other words, there is a decrease in blood insulin levels⁸.

However, it is known that there are some individuals with a genetic predisposition for an insulin secretion deficit, which only becomes evident when the individual becomes insulin-resistant, through sedentarism and the increase of adipose tissue¹⁵.

T2DM is often associated with obesity, dyslipidaemia and hypertension. It is evident that the great majority of individuals with T2DM are overweight³. Obesity is the predominant environmental factor that most affects susceptibility to T2DM, especially visceral obesity, which contributes to insulin resistance and the consequent metabolic abnormalities. Indeed, with a well-balanced diet and regular physical exercise, there is an improvement in glucose tolerance and increased insulin sensitivity. This beneficial effect is particularly attributed to the enhanced translocation of GLUT4 to the plasma membrane of skeletal muscle cells and adipose tissue, resulting in a discernible reduction in insulin resistance⁸. While T2DM has traditionally been considered an adulthood-onset condition, the rising prevalence of obesity in children and adolescents has led to an increase in prevalence of T2DM in these age groups^{2,8}.

Generally, this healthier lifestyle is the first line non-pharmacological approach in patients with T2DM. The combination of overweight, increased blood glucose levels, hypertension, increased serum cholesterol and triglycerides is called metabolic syndrome⁸.

In general, the symptoms of T2DM are much less marked compared to those of T1DM, being clinically silent in the majority of cases, because its installation is insidious and it does not present any symptoms at this stage, making the diagnosis in this type of patient difficult^{2,3}. Often the diagnosis is only made after the appearance of complications associated with the condition, such as poorly healing lower limb ulcers, retinopathy, heart disease, or stroke².

Before the stage of T2DM, we usually find patients in a phase called prediabetes, which consists of an individual who has alterations in fasting blood glucose or abnormal oral glucose tolerance, which are not in accordance with DM criteria, but they already have an abnormal glucose metabolism. So, an individual with prediabetes might have simultaneously hyperglycaemia and hyperinsulinemia. Prediabetes is considered to be a risk factor for the progression of cardiovascular disease and DM, which is why we should focus on non-pharmacological intervention, by reducing caloric intake and increasing physical activity, and early pharmacological intervention. This individual still has functional pancreatic β -cells, and our goal is to preserve their functional mass as much as possible so that the disease does not progress¹¹.

4.3. Other specific types of diabetes

In addition to T1DM and T2DM, there are several other distinct types of diabetes that have been identified and classified based on their unique characteristics and underlying causes. These include monogenic defects in insulin action and β -cell function, other genetic syndromes occasionally associated with diabetes, pathologies affecting the exocrine pancreas, endocrinopathies causing increased release of hormones that antagonize insulin, diabetes associated with viral infections leading to β -cells destruction, drug- or chemical-induced diabetes that inhibits insulin secretion and action, and unusual specific forms of immune-mediated diabetes^{2,10}.

Pregnancy is characterised by a predominant hormonal environment, which in turn promotes insulin resistance and thus an increase in blood glucose levels⁸. Hyperglycaemia in pregnancy can be classified as pre-gestational diabetes, gestational diabetes mellitus (GDM) or hyperglycaemia in pregnancy².

The case of pre-gestational diabetes consists of women who before becoming pregnant had already one of the other forms of DM, such as T1DM, T2DM, or other specific forms of diabetes². GDM corresponds to any alteration in glucose metabolism for the first time during pregnancy³. Finally, hyperglycaemia in pregnancy applies when pregnant women have been diagnosed with GDM and after the gestation period, they remain with DM².

GDM represents a high risk for the newborn baby causing short and long-term consequences especially if diabetes is not controlled during pregnancy. These babies are born with a birth weight of over 4 kilograms (macrosomia), a risk of hypoglycaemia which can contribute to brain damage, a risk of stillbirth, and are usually born by caesarean section or even premature birth. In the long term, these babies are at increased risk of developing glucose intolerance, cardiovascular disease, metabolic diseases, obesity, and T2DM^{8,16}. In addition, there are also consequences for the mother, including prenatal depression, pre-eclampsia, risk in a future pregnancy developing GDM again, and an increased risk of developing T2DM and cardiovascular disease after pregnancy¹⁶.

The scientific evidence has demonstrated a robust biomolecular link between neurodegenerative diseases, particularly Alzheimer's disease, and T2DM; in other words, there is an association between alterations in cognitive functions and hyperglycaemia¹⁷. Alzheimer's disease and T2DM share several molecular mechanisms that contribute to pathological dysfunctions in humans. These mechanisms include downregulation of glucose transporters, decreased insulin signalling pathways, neuroinflammation, and mitochondria dysfunction¹⁸⁻²⁰. These converging mechanisms establish a correlation between the two conditions, often referred to as brain-specific type 2 diabetes or type 3 diabetes²¹.

5. Diabetes Mellitus therapeutics

Type I diabetics due to the total absence of insulin, requires daily insulin injections in order to maintain normal blood glucose levels². There are different types of insulins on the market according to their pharmacokinetic profile, thus providing a therapeutic scheme adapted to each patient with T1DM²². Therefore, this treatment in complement with regular blood glycaemia monitoring, healthy eating, physical activity, support and education, allows patients to have a healthy life and delay or prevent the complications associated with DM².

In the case of type 2 diabetics, the promotion of a healthy lifestyle is crucial in addition to any pharmacological therapy with first line drugs. If this is not enough to control blood glucose levels, the combination of several non-insulin antidiabetics are initiated².

However, considering the adverse effects caused by the current non-insulin antidiabetic therapy, there is an increasing search for innovative options where the benefits are always above the risks caused by the therapeutic classes available for the treatment of DM, shown in Annex I²²⁻²⁴.

6. Complications associated with Diabetes Mellitus

High blood glucose levels resulting from insulin secretion deficiency or impaired insulin response are responsible for the complications associated with DM. They are paradoxically visible in the tissues that cannot control the entrance of glucose into their cells, the non-insulin dependent tissues. This is because they have glucose transporters constitutively present in their membranes, promoting glucose to enter according to the concentration gradient between plasma and cytoplasm, leading to a situation called glucotoxicity. These tissues include the Schwann cells which are responsible for the myelination of neurons, the renal medulla, the crystalline lens, the endothelial cells of small and large blood vessels, smooth muscle, connective tissue, and neurons⁸.

The complications associated with DM can be classified as chronic or acute. They occur mainly in patients with a delayed diagnosis of the disease or uncontrolled hyperglycaemia. Acute complications result from sudden oscillations of blood glucose in the body, which include hypoglycaemia, hyperglycaemia, diabetic ketoacidosis, and hyperosmolar non-ketotic coma. Chronic complications may involve small and large blood vessels, or be non-vascular⁸.

Diabetic ketoacidosis is the most common complication of T1DM and is characterised by hyperglycaemia, ketosis, and acidosis. Insulin deficiency characteristic of T1DM lead to a decrease in peripheral glucose uptake, resulting in a state of sudden chronic hyperglycaemia. Once the renal reabsorption capacity of glucose is exceeded, it will lead to glycosuria, and subsequently osmotic diuresis, that leads to dehydration of the organism. On the other hand, insulin deficiency stimulate lipase which will promote an increase in free fatty acids, that in the liver will be esterified and oxidized, giving rise to ketone bodies. The metabolic acidosis that occurs as a result of the excessive production of ketone bodies will contribute to the induction of vomiting, a situation that contributes to dehydration. Dehydration thus leads to hypovolaemic shock with hypotension installed which will stimulate the sympathetic nervous system, promoting the release of catecholamines, cortisol by the adrenal glands, and in turn the release of adrenaline by the adrenal medulla. A vicious circle is installed in which acidosis, hyperglycaemia, and dehydration get worse and may lead to death⁸.

In patients with T2DM, because there is not a lack of insulin burnt instead a reduction in insulin production or a deficiency in the use of glucose by peripheral tissues, we do not have the production of ketone bodies and the installation of metabolic acidosis. However, when hyperglycaemia is not controlled due to a lack of pharmacological intervention and non-pharmacological measures, glycosuria, intense dehydration, and hyperosmolarity may occur,

which in turn may lead to the most common acute complication of T2DM, non-ketonic hyperosmolar coma⁸.

The chronic complications involving smaller calibre vessels, called microvascular complications, refer to changes in small vessels, such as in the retina, Malpighian glomerulus, and peripheral nerves, causing problems such as retinopathy, nephropathy, and neuropathy. On the other hand, macrovascular complications affect mainly the arteries that supply the brain, the heart, and the lower extremities, resulting in a higher risk of stroke, acute myocardial infarction, and diabetic foot that can lead to limb amputation^{8,25}. Complications in the microvasculature are a consequence of intracellular hyperglycaemia, as opposed to complications in the macrovasculature that are a result of insulin resistance, which in turn leads to increased oxidation of fatty acids²⁶.

Indeed, in the case of DM patients with situations of uncontrolled chronic hyperglycaemia, initially the cells of non-insulin dependent tissues will try to metabolize glucose via the glycolytic pathway. However, with the increase of intracellular glucose, there will be an excessive production of reactive oxygen species (ROS), particularly superoxide anion by the mitochondrial electron transfer chain²⁵.

ROS will induce damage in the cell's nuclear material chain, the deoxyribonucleic acid (DNA). A poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) that resides in the nucleus in its inactive form, and only activated when the DNA is damaged, along with GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), which is found in the cytoplasm and translocated to the nucleus, will be crucial in DNA repair²⁵.

GAPDH is an enzyme that is involved in the glycolytic pathway and is normally present in the cytoplasm, but with its transfer to the nucleus to assist DNA repair, the cytoplasm becomes deficient in GAPDH, a fundamental enzyme for dehydrogenation of glyceraldehyde-3-phosphate. In this situation, the glycolytic pathway is blocked leading to an increase in the products of anaerobic glucose metabolism, in particular fructose-6-phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate, and glucose itself. There is no continuation of the glycolytic pathway with the formation of pyruvate and entry into the Krebs Cycle²⁵.

These events give rise to alternative pathways of glucose metabolism, which are the polyols pathway, the hexosamine pathway, the protein kinase C (PKC) activation pathway, and the advanced glycation end products (AGEs) pathway^{25,26}. Figure 2 describes the general mechanism of complications associated with DM.

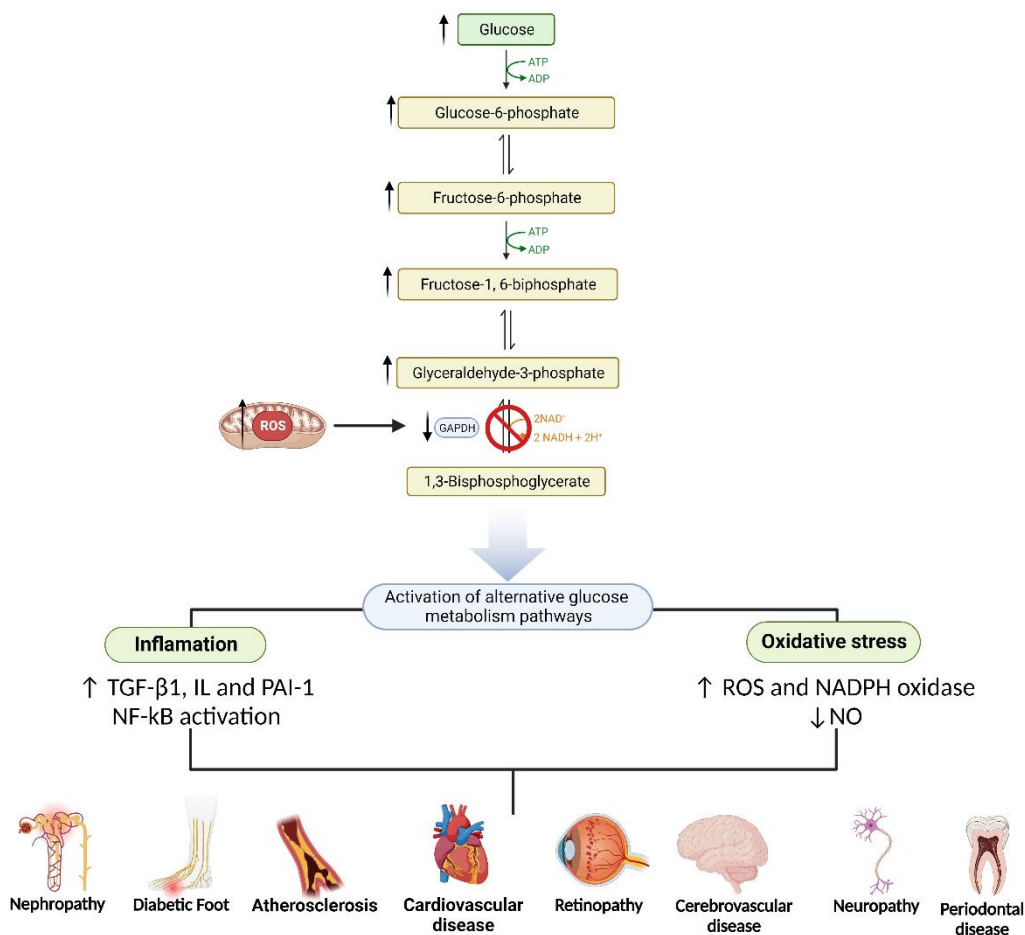


Figure 2. General mechanism of complications associated with DM. Uncontrolled hyperglycaemia is the primary cause of increased ROS levels in the mitochondrial electron transfer chain. Consequently, ROS induce DNA damage, leading to the translocation of cytoplasmic GAPDH to the nucleus for DNA repair. Reduced cytoplasmic levels of GAPDH result in a blocked glycolytic pathway, leading to an accumulation of products of anaerobic glucose metabolism. This situation activates alternative glucose metabolic pathways, triggering the formation of inflammatory and oxidative stress components. As a result of these combined effects, chronic complications arising from hyperglycaemia are developed. Abbreviations: ADP, Adenosine diphosphate; ATP, Adenosine Triphosphate; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase; H^+ , Hydrogen; IL, Interleukin; NAD^+ , Nicotinamide Adenine Dinucleotide; NADH, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen; NADPH, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate; NF- κ B, Nuclear Factor κ B; PAI-1, Plasminogen Activator Inhibitor-1; ROS, Reactive Oxygen Species; TGF- β 1, Transforming Growth Factor; \uparrow , increased; \downarrow , decreased. The figure was created using BioRender.com.

6.1. The polyol pathway

Aldose reductase is an enzyme expressed in non-insulin dependent tissues, such as in the glomerulus, retina, nerves, lens, and vascular cells. This enzyme plays a crucial role in the regulation of glucose metabolism and the maintenance of cellular osmotic balance^{25,26}.

In situations of hyperglycaemia, the aldose reductase converts the excess of glucose into sorbitol, using the cofactor nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). NADPH, in turn, is essential for the regeneration of reduced glutathione (GSH), an important intracellular antioxidant. This alternative glucose metabolic pathway will lead to a lower concentration of GSH and an increased cellular susceptibility to ROS, causing intracellular oxidative stress. Furthermore, the enzyme sorbitol dehydrogenase will oxidize sorbitol to

fructose by reducing NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) to NADH (nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen)^{8,25}.

The increased flux of the polyols pathway induced by hyperglycaemia will have other consequences for the cell, such as the fact that sorbitol being osmotically active will cause osmotic stress, promoting the influx of water into the cells, causing damage²⁵.

All these damaging effects in Schwann cells, for instance, will lead to changes in the action potential conduction velocity in the peripheral neurons, in other words, the increased flow of the polyol pathway is at the core of diabetic neuropathy²⁵.

6.2. The hexosamine pathway

When we have chronic hyperglycaemia, the cell is no longer able to metabolize all glucose by the glycolytic pathway, so the product of anaerobic glucose metabolism, fructose-6-phosphate is switched to a signalling pathway where it is converted into glucosamine-6-phosphate by the enzyme glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase, and subsequently into uridine diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNac)²⁵.

UDP-GlcNac can covalently bind to serine and threonine residues present in transcription factors, so consequently there will be alterations in gene expression, such as, increased expression of transforming growth factor I (TGF-β1) and plasminogen activator inhibitor I (PAI-I) that underlie vascular complications resulting in increased inflammatory response, thrombosis, and fibrosis²⁵.

6.3. The Protein Kinase C pathway

The excess glucose present inside the cells will also stimulate the synthesis of diacylglycerol (DAG), from the intermediary of the glycolytic pathway, glyceraldehyde-3-phosphate. This increase in DAG promotes Ca²⁺-dependent activation of PKC, which in turn causes effects on signal transduction²⁵.

PKC activation culminates in numerous events which include an imbalance between vasodilator and vasoconstrictor factors. The increased production of vascular endothelial growth factor translates into vascular permeability and angiogenesis. The excessive production of collagen and fibronectin, via the increased expression of transforming growth factor (TGF-β), causes capillary occlusion. The decreased expression of the endothelial isoform of nitric oxide synthase and increased expression of endothelin-I result in abnormalities in blood flow. The increased PAI-I leads to decreased fibrinolysis, which in turn causes vascular occlusion and thrombus formation. Finally, the activation of the transcription nuclear factor κB (NF-κB)

promotes the gene expression of pro-inflammatory cytokines. All these events lead to emergent renal and ocular microvascular complications^{8,25}.

6.4. The Advanced Glycation End products pathway

The non-enzymatic reactions between the amino groups of lipids, proteins, and nucleic acids with glucose-derived metabolites give rise to AGEs via the Maillard reaction. This, also known as glycation, consists of the formation of a Schiff base, which then rearranges into a more stable product, the Amadori product. However, the products obtained have reactive carbonyl groups, which will diffuse outside the cell and subsequently interact with the primary amine groups of the extracellular matrix and circulating proteins, giving rise to AGEs²⁷.

Under normal physiological conditions, there is a spontaneous and moderate production of AGEs, which may take up to weeks, because there is no involvement of enzymatic catalysts. However, when there is a higher and persistent availability of glucose in the body, the rate formation of AGEs is increased and ends up accumulating in the bloodstream^{27,28}.

Therefore, proteins modified by AGEs precursors will interact with receptors for advanced glycation end products (RAGE), which are responsible for signal transduction. Consequently, there is an activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade and NF- κ B, which promote the production of growth factors such TGF- β and pro-inflammatory cytokines^{8,28}. Cells that express RAGE include endothelial, inflammatory, and glomerular mesangial cells, so we can conclude that AGEs are present in the genesis of vascular complications, namely diabetic nephropathy²⁵.

The formation of AGEs normally occurs via the Maillard reaction. The major AGE precursor, the highly reactive bicarbonyl methylglyoxal (MG) also derives spontaneously from dihydroxyacetone phosphate produced during glycolysis or from glucose auto-oxidation. During normal physiological conditions, there is moderate MG production that is mostly degraded by the glyoxalase enzyme system, but it is markedly accelerated under the persistent hyperglycaemic conditions observed in diabetes²⁷. There are other ways in which the formation of these products occurs, such as the polyols pathway. This is because the fact that fructose formed can accumulate and be transformed into compounds used in the non-enzymatic glycation reaction, such as 3-deoxyglucose and fructose-3-phosphate²⁸.

7. The antioxidant and anti-inflammatory therapeutic potential of skin allergens

Dimethyl fumarate (DMF) is synthesized through the esterification of fumaric acid found in *Fumaria officinalis* L.^{7,29}. DMF was the first skin allergen to be explored in the context of

diseases. Currently, DMF is registered and on the Portuguese market with an indication for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis³⁰. Furthermore, two therapeutics indicated for the treatment of psoriasis have already been approved in some European Union countries, but Portugal has not obtained the regulatory approval^{31,32}.

The active metabolite of DMF induces the dissociation of kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAPI) from the complex KEAPI/Nrf2, releasing of the transcription factor Nrf2 into the cytoplasm. Nrf2 is translocated to the nucleus, where it binds to the antioxidant response element (ARE), that in turn leads to the production of anti-inflammatory and antioxidant enzymes. On the other hand, the active metabolite of DMF inhibits the translocation of NF- κ B, so there is an inhibition of the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β , TNF- α . Therefore, DMF demonstrates the capability to reduce inflammation states, modulates immune system activity, and confers cellular protection against damage induced by oxidative stress^{30,33,34}.

As diseases have evolved and research into their aetiology has advanced, the significant role of inflammation underlying these conditions has become more understood and clear. Thus, the role of skin allergens, as inducers of the transcription factor Nrf2, have been explored in other diseases where inflammation and oxidative stress needs to be suppressed, particularly in DM.

8. Skin Allergen: Isoeugenol

Isoeugenol (2-methoxy-4-propenyl-phenol) is a phenolic component extracted from the essential oils of various spices, including clove and cinnamon oil^{35,36}. This lipophilic compound has enormous applicability in food, pharmaceutical, and cosmetics industries because of its extensive spectrum of bioactivity, in particular its antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, antigenotoxic, and antibacterial activities^{6,36}. Despite isoeugenol being an agent capable of inducing an allergic reaction in the skin and being associated with contact dermatitis, it has positive anticholinergic and antidiabetic effects. Therefore, the potential activity of isoeugenol has raised interest in the treatment of T2DM^{35,36}.

Over the years, the pharmaceutical industry has consistently focused its investments towards therapies that do not involve phytochemicals. This strategy is motivated by the inherent instability, slow onset of action and low economic viability of phytochemical molecules. This situation, along with the absence of any phytochemical-based antidiabetic drug that has successfully completed the clinical trials phase, led Martiz *et al.* (2022) to employ computational tools, specifically virtual screening using molecular docking and absorption,

distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) profiling to discover the phytochemical most likely to exhibit optimal effects in the management of DM. Therefore, isoeugenol emerged as the phytochemical with the most promising antihyperglycaemic effects and the potential to attenuate the severity of disease symptoms through a multitarget inhibitor³⁷.

In another *in silico* investigation carried out by Martiz *et al.* (2022), it was demonstrated that isoeugenol exhibits significant potential as an inhibitor of GAPDH. This conclusion was based on notable binding affinity results, as well as the ability of isoeugenol to form a stable complex with GAPDH. These findings were obtained through the utilization of advanced techniques such as molecular dynamics simulation, binding free energy calculations, and molecular docking simulation. The GAPDH, as the principal intracellular precursor of AGEs, promotes the activation of crucial pathways such as the AGEs pathway, the PKC pathway, and the hexosamine pathway. Additionally, this enzyme plays a crucial role in the progression of diabetic retinopathy by upregulating the levels of mitochondrial superoxide in the retinal tissue. The potential of isoeugenol, identified as an inhibitor of GAPDH through computational tools, paves the way for further *in vitro* and *in vivo* investigations targeting GAPDH inhibition¹⁷.

Therefore, isoeugenol is undoubtedly a potential candidate for the discovery of a new therapeutic approach for DM and associated complications also by demonstrating positive effects on stimulating insulin secretion, reducing blood glucose levels, and delaying postprandial glucose absorption through the inhibition of digestive enzymes responsible by chemical digestion of carbohydrates such as α -glucosidase and α -amylase^{36,38}.

8.1. The antioxidant and anti-inflammatory role of isoeugenol in complications associated with Diabetes Mellitus

The ROS are beneficial in cellular and immune regulation when created through the normal functioning of the body's metabolism. However, when there is an imbalance between its production and elimination, due to uncontrolled hyperglycaemia, they become highly unstable and react with the body's cells, eventually causing damage and cell death³³.

The imbalance between antioxidant defence and oxidative damage in the body is conferred by the negative regulation of antioxidant enzymes and by the overexpression of ROS and pro-inflammatory mediators. This is because the increased blood glucose levels can activate NF- κ B and inhibit Nrf2, triggering inflammation, redox imbalance, and disease progression through complications caused in non-insulin dependent tissues^{39,40}.

The transcription factor Nrf2 is essential for the regulation and maintenance of homeostasis in the body. However, its activity is reduced in DM leading to the development and evolution of the pathological situation, as there is a reduction in the transcription of cytoprotective and antioxidant genes. In this way, we are dealing with a situation of redox imbalance, inflammation, insulin resistance, pancreatic and mitochondrial cell dysfunction, cell apoptosis, altered metabolism and nervous system functions⁴⁰.

Skin allergens by having the ability to activate Nrf2, and inhibit NF- κ B, promote the activation of detoxification pathways and increase antioxidant and anti-inflammatory gene transcription, which may play a beneficial role in pathological conditions based on inflammation and oxidative stress. In this case, there may be an improvement of non-insulin dependent tissues in patients with DM. Figure 3 describes the different molecular mechanisms and downregulation targets mediated by isoeugenol.

Isoeugenol, like DMF, can activate the Nrf2/ARE complex, providing the body with greater availability of detoxifying enzymes, including NADPH quinone oxidoreductase I (NQO1), heme oxygenase-I (HO-1), glutathione-S-transferase, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase and glutathione peroxidase (GPX). In general, these enzymes are essential for converting harmful free radicals into harmless species in their reduced forms, allowing cells to survive^{6,34}. The activation of the Nrf2/ARE complex promotes a reduction in the expression of genes related to hepatic gluconeogenesis and increases the expression of genes in the skeletal muscle related to energy consumption^{41,42}.

Isoeugenol, on the other hand, is capable of modulating the activity of glutathione, a molecule responsible for protection against oxidative damage. The thiol groups of cysteine in this endogenous antioxidant are the responsible for its activity. In this sense, isoeugenol, being an electrophilic molecule, can conjugate with the thiol groups, impacting the beneficial activity of glutathione within the cells. This depletion of functional glutathione levels promotes the production of HO-1 which, in turn, contributes to an anti-inflammatory and immunosuppressive response^{34,42}.

Focusing on the role of HO-1, it can convert heme, a pro-oxidant that is formed in response to periods of metabolic stress, into three bioactive substances with antioxidant and anti-inflammatory properties, which are free iron, carbon monoxide, and biliverdin. Afterward, through biliverdin reductase, biliverdin is converted into bilirubin, which also has an antioxidant role³³.

NF- κ B is a transcription factor that when activated is responsible for the over-expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS)^{43,44}. This factor is over-expressed in complications associated with DM, particularly when the PKC pathway is activated. Isoeugenol demonstrates the capacity to prevent the nuclear translocation of NF- κ B, consequently resulting in the suppression of iNOS expression and the production of nitric oxide (NO) and COX-2. The down-regulation of NF- κ B enables the inhibition of cellular damage induced by inflammation^{43,45}.

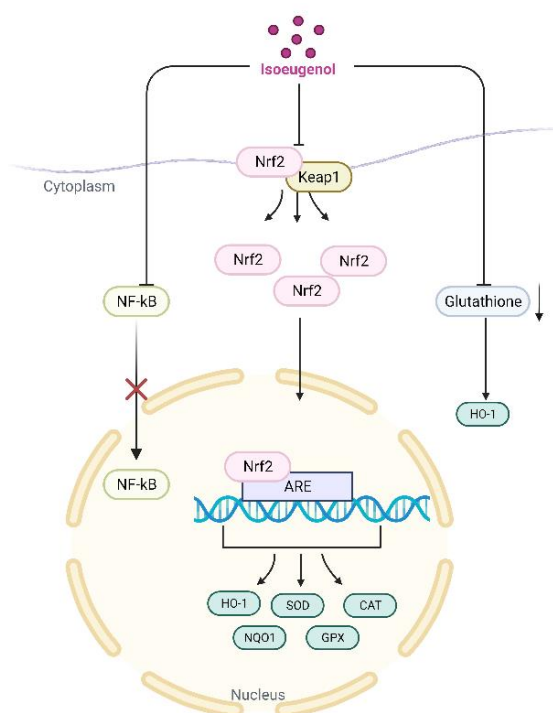


Figure 3. Isoeugenol exhibits the capacity to modulate diverse antioxidant and anti-inflammatory pathways. Isoeugenol binds to the cysteine residues of the KEAP1/Nrf2 complex, facilitating the cytoplasmic release of Nrf2. Subsequently, after the nuclear translocation of Nrf2, it forms a complex with ARE. The activation of Nrf2/ARE complex leads to the expression of antioxidant genes and the synthesis of detoxifying enzymes. These enzymes play a critical role in cellular protection by efficiently scavenging oxidants and reducing peroxides. Among these, isoeugenol effectively inhibits the nuclear translocation of NF- κ B, resulting in the downregulation of pro-inflammatory cytokines. Moreover, through the formation of an isoeugenol-glutathione conjugate, isoeugenol depletes glutathione levels, consequently inducing the production of HO-1. Abbreviations: CAT, Catalase; GPX, Glutathione Peroxidase; HO-1, Heme Oxygenase-1; KEAP1, Kelch-like ECH-associated Protein 1; NF- κ B, Nuclear Factor K β ; NQO1, NADPH quinone oxidoreductase 1; Nrf2, Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2; SOD, Superoxide Dismutase. The figure was created using BioRender.com.

Eugenol and its structural isomer, isoeugenol, are the two active components present in cloves. Eugenol is, so far, the active ingredient with most studies and with the highest proposal for new therapies. However, after the discovery of the great potential of isoeugenol, it became clear that because of its conjugated double bond, it allows higher stability and thus a greater antioxidant activity. This is observed in its efficacy in preventing the formation of superoxide

anion by inhibiting the enzyme xanthine oxidoreductase, while eugenol is not effective against this enzyme³⁹.

Isoeugenol has exhibited notable efficacy in eliminating free radicals present in the organism, inhibiting lipid peroxidation, and influencing the enzymes responsible for antioxidant defence. In order to evaluate the role of isoeugenol as an activator of Nrf2, a comprehensive literature review was conducted to assess its antioxidant and anti-inflammatory properties by modulating the enzymes responsible for the endogenous cellular detoxification.

In the studies conducted by Rauscher *et al.* (2001) and Alharthy *et al.* (2023), a model of diabetes, chemically induced by streptozotocin (STZ) in the Sprague Dawley rats, was employed. STZ is an antibiotic used in experimental animal models with the aim of obtaining a model of DM, because of its cytotoxic effects on pancreatic β -cells leading to their destruction⁴⁶. In addition, to complete β -cell necrosis, STZ can activate the immune system *per se*, causing monocyte and macrophage infiltration and the production of pro-inflammatory cytokines³⁹.

The choice of Sprague Dawley rats is attributed to the increased sensitivity of this strain to the effects of STZ, enabling them to manifest complications associated with DM through the four alternative routes of glucose metabolism^{6,39}. Therefore, it was considered an excellent experimental animal model to analyse the potential therapeutic effects of isoeugenol.

The research of Rauscher *et al.* (2001) has focused on the effects of isoeugenol on glutathione balance and the activity of SOD, CAT, GPX, and glutathione reductase in the liver, heart, brain, and kidney. The study aimed to evaluate the potential of isoeugenol therapy in reversing diabetic oxidative damage. In the referred study, male Sprague Dawley rats were allocated randomly into four distinct groups: control rats without isoeugenol, control rats with isoeugenol, STZ-induced diabetic rats without isoeugenol, and STZ-induced diabetic rats with isoeugenol. The two treatment groups were subjected to a daily intraperitoneal injection of isoeugenol 10 mg/kg/day for 14 days⁶. The results, as shown in Annex 2, led to the conclusion that isoeugenol therapy did not have a general reversal effect on diabetic oxidative damage. While various outcomes were observed with isoeugenol treatment, only the reduction of brain oxidized glutathione (GSSG) and the decrease in hepatic GPX were dependent on isoeugenol⁶.

Additionally, Rauscher *et al.* (2001) observed that with the administration of isoeugenol, there was a greater and more effective inhibition of hepatic and cardiac lipid peroxidation compared to other studies conducted so far with the administration of eugenol. This

phenomenon confirms the hypothesis that the presence of a conjugated double bond in isoeugenol confers higher stability⁶.

In a study conducted by Prasad *et al.* (2012) in male *Drosophila melanogaster*, the exposure to acrylamide (ACR), a well-documented substance recognized for its carcinogenic, genotoxic, and neurotoxic properties, resulted in the induction of oxidative stress and neuronal damage, evidenced by elevated levels of ROS and hydroperoxides. This animal model has been extensively used in the field of neurobiology to comprehend the molecular events occurring in the brain⁴⁷. The primary objective of this study was to investigate the potential reduction in lipid peroxidation and the reestablishment of enzymatic antioxidant activity through the exposure to isoeugenol and eugenol. In this way, the flies were divided into six distinct groups: control flies without treatment, flies submitted to ACR without treatment, flies treated with isoeugenol, flies submitted to ACR treated with isoeugenol, flies treated with eugenol and flies submitted to ACR treated with eugenol. The treated flies were fed with a diet containing isoeugenol and another diet containing eugenol, at a concentration of 25 μM ⁴⁷. Through the data summarized in Annex 2, Prasad *et al.* (2012) concluded that in ACR-flies treated with isoeugenol, this led to a notable reduction in ROS and hydroperoxide levels. However, in this group, there were no significant changes, compared to the ACR-flies without treatment, in CAT, SOD, and protein carbonyl levels. On the other hand, there was a significant increase in GSH levels, as anticipated⁴⁷.

In another study of Prasad *et al.* (2013), this time conducted on male albino rats, the ACR was used to induce lipid peroxidation, reduction of GSH levels, and promote the overexpression of COX-2, NO, and ROS, contributing to the establishment of an inflammatory environment, leading to cellular destruction and apoptosis, the perfect environment for the development of neuropathy⁴⁸. For this study, male albino rats were randomly allocated into four distinct groups: control rats without treatment, ACR-rats without treatment, ACR-rats treated with isoeugenol, and ACR-rats treated with eugenol. The two treatment groups received intravenous injections of 10 mg/kg body weight per day of each phytochemical, three times a week for 5 weeks. This concentration was carefully evaluated alongside two additional doses to comprehend the potential toxicity in the animal model⁴⁸. In ACR-rats treated with isoeugenol, there was a reduction in oxidative stress and relief of neuropathy symptoms. Isoeugenol has shown detoxifying properties and the ability to eliminate ROS, NO, malondialdehyde, and hydrogen peroxide in the sciatic nerve and brain regions. Therefore, isoeugenol has showed favourable results in tests performed to assess neuronal damage and dysfunction, characteristic of neuropathy⁴⁸.

In this study, the activity of the antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase was determined in the sciatic nerve, cortex, and cerebellum. Through the results described in Annex 2, Prasad *et al.* (2013) found that they were not linear depending on the tissue, so the authors concluded that each organ may have different degrees of susceptibility to the antioxidant effects of isoeugenol⁴⁸.

The induction of an oxidative stress environment, prompted by elevated levels of hydrogen peroxide, triggers the activation of the transient receptor potential (TRP) subfamily. As voltage-independent Ca^{2+} channels, this TRP activation promotes the influx of Ca^{2+} , subsequently leading to cellular damage and apoptosis in the brain. An alteration in Ca^{2+} homeostasis leads to the activation of the PKC pathway, elevated levels of ROS, and an amplified inflammatory response mediated by NO synthase. However, Prasad *et al.* (2013) has demonstrated in the referred animal model that isoeugenol had the capability to reverse this scenario and maintain Ca^{2+} homeostasis⁴⁸.

Diabetic neuropathy is characterised by an increase in lipid peroxidation, which consequently promotes damage to cell membranes, affecting their functions, particularly synaptic conduction and neurotransmission. In conclusion, this study focusing on diabetic neuropathy reveals that this skin allergen, through multiple mechanisms and neuroprotective effects, may improve and delay the signs and symptoms of this complication associated with DM⁴⁸.

The aim of the study conducted by Endo *et al.* (2020) was to assess the Nrf2-dependent antioxidant activity of ten different phytochemicals. The antioxidant potential of Nrf2 pathway-activating compounds, including isoeugenol, was evaluated based on the survival rate of zebrafish cell line with a mutation in Nrf2. In each well of a plate, eight larvae from the Nrf2-mutant zebrafish line were exposed to a specific phytochemical for 12 hours, followed by a 48-hour induction of oxidative stress using hydrogen peroxide and arsenite compounds⁴⁹.

Between the two compounds that induce oxidative stress, arsenite exerts a more potent role. This is attributed to its ability to activate NADPH oxidase and inhibit cysteine residues in antioxidant proteins, leading to the generation of ROS and hydrogen peroxide⁴⁹.

In this study, a preliminary evaluation of the optimal concentration for each phytochemical was conducted to determine the therapeutic window between the minimum effective concentration and the maximum toxic concentration. In this regard, isoeugenol was tested at concentrations of 1, 5, 25 and 125 μM . During this assessment, Endo *et al.* (2020) observed that the concentration of 125 μM was excessively toxic for the animal model, resulting in non-

survival⁴⁹. The rest of results, as presented in Annex 2, led to the conclusion that isoeugenol demonstrated slight protective effects against hydrogen peroxide-induced toxicity at a concentration of 5 μ M. In contrast, isoeugenol at a concentration of 25 μ M exhibited protective effects, that were dependent on the Nrf2 pathway, in the case of arsenite-induced toxicity. This suggests that the primary mechanism through which isoeugenol confers its antioxidant activity involves the activation of Nrf2. However, isoeugenol also exhibited Nrf2-independent activity against arsenite-induced toxicity at other concentrations⁴⁹.

In the same study, among the ten phytochemicals investigated, eugenol was one of the constituents studied. Consequently, it was observed that isoeugenol has demonstrated to be a more potent antioxidant with Nrf2 activation properties compared to its analog⁴⁹.

In the study conducted by Alharthy *et al.* (2023), the effects of isoeugenol and eugenol and its combination were evaluated on weight changes, blood glucose levels, food and water consumption, antioxidant parameters, TNF- α levels, nerve growth factor, histology of sciatic nerve, hyperalgesia, and allodynia. All these parameters had the objective of evaluating the inflammatory and oxidative effects that happen in situations of diabetic neuropathy³⁹.

For the present study, female Sprague Dawley rats were divided into six distinct groups: control rats without treatment, STZ-induced diabetic rats without treatment, STZ-induced diabetic rats with isoeugenol, STZ-induced diabetic rats with eugenol, STZ-induced diabetic rats with isoeugenol and eugenol, STZ-induced diabetic rats with pregabalin, and STZ-induced diabetic rats with anti- nerve growth factor. The treatment groups were subjected to single injection³⁹.

Diabetic neuropathy is the most common complication among patients with DM and results from the Schwann cell anomaly, which in turn promotes segmental demyelination, and thus a reduction in the speed of nerve impulse conduction is noticed. This microangiopathy occurs because of the activation of the polyol pathway, in which the increase in sorbitol leads to an increase in osmolarity and an electrochemical imbalance, resulting in damage to sensorimotor and autonomic neurons. Therefore, by observing that hyperglycaemia induces the progression of diabetic neuropathy and its aggravation to neuropathic pain, isoeugenol may present itself as a potential approach against the harmful neuronal and oxidative effects induced by the pathological condition^{8,25}.

Through the data summarized in Annex 2, Alharthy *et al.* (2023) concluded that the protection against oxidative stress in peripheral nerve cells was conferred with greater efficacy in the combined treatment of isoeugenol and eugenol. The authors also observed a significant

decrease in lipid peroxidation, measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and an increase of SOD, CAT, and GSH. This conclusion is in line with the fact that hyperglycaemia promotes non-enzymatic glycation, resulting in elevated TBARS levels and GSH concentrations³⁹.

Alharthy *et al.* also documented alterations in the number of macrophages and the levels of pro-inflammatory cytokines, specifically TNF- α , in the group submitted to treatment. Furthermore, isoeugenol and eugenol increased nerve growth factor levels, which play a crucial role in the positive regulation of the sympathetic and sensory nervous system. These changes are attributed to the anti-inflammatory properties and the ability of these phytochemicals to alleviate oxidative stress³⁹.

In conclusion, the synergistic effect of these active ingredients provides essential neuroprotection against diabetic neuropathy by reducing the oxidative stress and inflammation caused by hyperglycaemia on the cells of the peripheral nerves³⁹.

8.2. Limitations of scientific research on isoeugenol in Diabetes Mellitus: A critical analysis

The potential of isoeugenol in mitigating inflammation and oxidative stress related to DM was notably identified through an exhaustive review of the existing scientific literature on isoeugenol as an adjunctive therapy in DM management. Nonetheless, it is imperative to acknowledge the presence of certain limitations and anticipate future considerations.

The majority of published findings have predominantly relied on *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies, with a notable absence of ongoing or recruiting clinical trials in human subjects. Therefore, further investigation through well-designed clinical trials is necessary to establish the efficacy and safety profile of isoeugenol in human patients, preceded by toxicological pre-clinical studies. Conducting robust human studies is critical, because the animal models used so far may not fully represent the human model of DM.

Prior to conducting any clinical trials in humans, it is imperative to evaluate the cytotoxicity of isoeugenol. Its potential to induce harm may be linked to higher dosages or the cellular selectivity of isoeugenol, whereby it could cause damage solely to specific cell types. This aspect is often not thoroughly examined in studies that primarily focus on relevant target cells for DM. Some investigations have already suggested that its cytotoxicity is associated with the generation of benzyl radicals, information that requires further investigation and in-depth evaluation through additional studies and results^{50,51}.

The heterogeneity observed in the studies represents another limitation, as it is evident that there is variability in term of dosages, treatment duration, therapeutic interval, and experimental conditions. As a consequence, conducting a comprehensive critical analysis of the results becomes challenging, given the lack of methodological uniformity. Therefore, it is essential to establish standardized protocols and methodologies to ensure comparability across studies.

The studies were conducted within a limited timeframe, so the long-term safety and efficacy of isoeugenol have not been adequately evaluated. The comprehensive identification of any potential adverse effects necessitates extended and prolonged investigations. Hence, an extensive and prolonged research endeavour becomes crucial in understanding the true impact of isoeugenol in the context of safety and effectiveness.

In addition to these pertinent aspects of the studies conducted so far, the precise mechanism of action of isoeugenol remains incompletely understood. While certain studies have explored its effects on antioxidant pathways and inflammatory markers, the precise cellular and molecular mechanisms have yet to be comprehensively elucidated, particularly regarding potential dose-dependent antioxidant and anti-inflammatory activities.

9. Future perspectives

DM stands as one of the most financially burdensome pathologies, not only for the Portuguese National Health System but also on a global scale, contributing to escalated healthcare costs. For this reason, extensive research and studies have been undertaken to attain a more economically viable treatment option with minimized adverse effects for the patients^{2,52}.

Regenerative medicine presents itself as a promising option to enhance the quality of life for patients with DM. Its feasibility is under investigation, considering the possibility of its realization involving three-dimensional printing of an artificial pancreas, restoration of the normal function and mass of islets of Langerhans, and the utilization of somatic cells reprogrammed into pluripotent cells, which are subsequently differentiated into insulin-secreting cells⁵³⁻⁵⁵.

The oral administration of insulin has emerged as a potential therapeutic option and has been extensively discussed due to the need for frequent subcutaneous insulin injections in patients with T1DM. The repetitive injections can lead to skin reactions at the injection site and impose a significant psychological burden on these individuals. However, formulating an

effective oral insulin delivery system has proven challenging, because of the complex pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of insulin. Nevertheless, recent advancements in nanotechnology have shown promise in overcoming these obstacles. Nanosystems offer high adaptability and may hold the key to achieving the desired oral bioavailability of insulin. These nanotechnology-based approaches have brought the prospect of oral insulin delivery closer to reality, providing hope for improved diabetes management and enhanced patient comfort⁵⁶.

The management of complications associated with DM involves addressing oxidative stress and inflammation. Therefore, interventions involving isoeugenol and other phenolic compounds hold promising potential as co-adjuvants in mitigating the detrimental effects induced by uncontrolled hyperglycaemia⁵⁷. The incorporation of these phytochemicals into the diet promotes the induction of various antioxidant proteins, primarily through the Nrf2 pathway. Among these Nrf2 activators, sulforaphane found in broccoli and other cruciferous vegetables stands out. Sulforaphane is a promising agent currently undergoing preclinical evaluation in numerous disease prevention models⁴⁹. Furthermore, the favourable effects of curcumin in improving T2DM patients' condition serve as an illustrative example of the pivotal role that phytochemicals can play in this context, emphasizing their potential for further advancement into clinical trials⁵⁸.

10. Conclusion

DM is a chronic metabolic condition that can affect millions of individuals of diverse age groups worldwide, characterized primarily by elevated blood glucose levels. Uncontrolled hyperglycaemia leads to oxidative changes and tissue damage, including neuropathy, nephropathy, retinopathy, atherosclerosis, and cardiovascular diseases, thereby resulting in severe complications associated with DM. Consequently, extensive research and the discovery of novel therapeutic approaches that demonstrate efficacy in addressing these challenges are imperative.

In recent years, there has been a significant increase in research focused on phytochemical compounds derived from plants for the treatment of various pathologies. The identification of the skin allergen DMF has paved the way for the discovery and investigation of active agents capable of modulating the activity of key transcription factors involved in cellular responses. Notably, Nrf2, a transcription factor crucial for the antioxidant response, and NF- κ B, a transcription factor associated with inflammation, have become the focus of interest.

Among the identified phytochemicals, isoeugenol has emerged as a promising candidate. As a phenolic compound, isoeugenol exhibits significant antioxidant and anti-inflammatory properties that hold relevance for the complications associated with DM. Isoeugenol's ability to enhance the production of endogenous antioxidant enzymes provides a crucial defence against the oxidative stress commonly observed in DM. Additionally, it effectively mitigates the overexpression of pro-inflammatory cytokines and cell adhesion molecules, thereby exerting a protective effect against inflammatory processes. Given its multifaceted mechanism of action, isoeugenol holds potential as a therapeutic agent for managing DM-related complications. However, further research is essential to fully elucidate its molecular pathways and to establish its clinical efficacy and safety profile. The exploration of isoeugenol's pharmacological properties represents a promising avenue in the quest for innovative treatments for DM and its associated complications.

In the studies conducted to date with isoeugenol, compelling evidence has demonstrated its distinctive antioxidant and anti-inflammatory properties. The research primarily focused on diabetic neuropathy, a complication characterized by impaired motor reflexes and altered sensitivity. Isoeugenol has exhibited the potential to provide desired neuroprotection and enhance the conduction speed of action potentials in demyelinated neurons through its modulation of oxidative stress and inflammation within these tissues.

Beyond its role in addressing complications, this phytochemical may also exert positive effects on reducing blood glucose levels, augmenting insulin sensitivity, and enhancing tissue glucose uptake. Nevertheless, its most notable and promising outcomes lie in its capacity to act as a modulator of cell proliferation, counteracting oxidative damage, and mitigating inflammatory processes.

In conclusion, a comprehensive understanding of the mechanisms of action of isoeugenol is crucial for its potential therapeutic application. Furthermore, future research should address the highlighted limitations to improve the viability of isoeugenol application. Investigating its role as an NF- κ B inhibitor and Nrf2 activator, alongside conducting toxicological pre-clinical studies, is essential before progressing to clinical trials. These efforts to position isoeugenol as a promising complementary therapy for managing complications associated with DM.

References

1. VANPUTTE, Cinnamon; REGAN, Jenifer; RUSSO, Andrew - **Seeley'S Essentials of Anatomy & Physiology, Tenth Edition**. 10th. ed. New York : McGraw-Hill Education, 2019. ISBN 978-1-260-09286-8.
2. INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - **IDF Diabetes Atlas**. 10th. ed. Brussels : International Diabetes Federation, 2021. ISBN 9782930229980.
3. DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE - **Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus**. Norma da Direção Geral da Saúde. (2011) 1–13.
4. ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DA INDUSTRIA FARMACÊUTICA - **O Valor do diagnóstico para o Sistema de Saúde e para o cidadão: o caso da Diabetes**. (2020) 20.
5. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**. *Diabetes Care*. ISSN 0149-5992. 37:Supplement_1 (2014) S81–S90. doi: 10.2337/dc14-S081.
6. RAUSCHER, Frederick M.; SANDERS, Ruth A.; WATKINS, John B. - **Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats**. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. ISSN 1095-6670. 15:3 (2001) 159–164. doi: 10.1002/jbt.13.
7. MAJKUTEWICZ, Irena *et al.* - **Age-dependent effects of dimethyl fumarate on cognitive and neuropathological features in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease**. *Brain Research*. ISSN 00068993. 1686:2018) 19–33. doi: 10.1016/j.brainres.2018.02.016.
8. KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. - **Robbins & Cotran Pathologic Basis of Diseases**. 10th. ed. Philadelphia : Elsevier, 2020. ISBN 9780323353175.
9. SALTIEL, Alan R.; KAHN, C. Ronald - **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism**. *Nature*. ISSN 0028-0836. 414:6865 (2001) 799–806. doi: 10.1038/414799a.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Classification of diabetes mellitus**. World Health Organization. (2019) 36.
11. ELSAYED, Nuha A. *et al.* - **2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards**

of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*. ISSN 0149-5992. 46:Supplement_1 (2023) S19–S40. doi: 10.2337/dc23-S002.

12. PUGLIESE, Alberto - **Insulitis in the pathogenesis of type 1 diabetes**. *Pediatric Diabetes*. ISSN 13995448. 17:Suppl 22 (2016) 31–36. doi: 10.1111/vedi.12388.

13. CERF, Marlon E. - **Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance**. *Frontiers in Endocrinology*. ISSN 1664-2392. 4:2013) 37. doi: 10.3389/fendo.2013.00037.

14. BASTARD, Jean-Philippe *et al.* - **Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance**. *European cytokine network*. ISSN 1148-5493. 17:1 (2006) 4–12.

15. CHIASSON, J. L.; RABASA-LHORET, Rémi - **Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function**. *Diabetes*. ISSN 0012-1797. 53:Supplement 3 (2004) S34–S38. doi: https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s34.

16. PLOWS, Jasmine *et al.* - **The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus**. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 1422-0067. 19:11 (2018) 3342. doi: 10.3390/ijms19113342.

17. MARTIZ, Reshma Mary *et al.* - **Defining the Role of Isoeugenol from *Ocimum tenuiflorum* against Diabetes Mellitus-Linked Alzheimer's Disease through Network Pharmacology and Computational Methods**. *Molecules (Basel, Switzerland)*. ISSN 1420-3049. 27:8 (2022) 2398. doi: 10.3390/molecules27082398.

18. ROJAS, Milagros *et al.* - **Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: Pathophysiologic and pharmacotherapeutics links**. *World Journal of Diabetes*. ISSN 1948-9358. 12:6 (2021) 745–766. doi: 10.4239/wjd.v12.i6.745.

19. MICHAİLIDIS, Michalis *et al.* - **Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes**. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 14220067. 23:5 (2022) 2687. doi: 10.3390/ijms23052687.

20. TUMMINIA, Andrea *et al.* - **Type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: Role of insulin signalling and therapeutic implications**. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 14220067. 19:11 (2018) 3306. doi: 10.3390/ijms19113306.

21. CUNHA, S. *et al.* - **O Potencial Terapêutico dos Agonistas do GLP-1R na Doença de Alzheimer**. *Acta Farmacêutica Portuguesa*. 9:1 (2020).

22. DAVIES, Melanie J. *et al.* - **Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)**. *Diabetes Care*. ISSN 0149-5992. 41:12 (2018) 2669–2701. doi: 10.2337/dci18-0033.
23. DUARTE, Rui *et al.* - **Recomendações Nacionais da SPD para o Tratamento da Hiperglicemia na Diabetes Tipo 2-Atualização 2018/19 com Base na Posição Conjunta ADA/EASD* SPD National Recommendations for the Treatment of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes-Update Based in the ADA/EASD**. *Revista Portuguesa de Diabetes*. 13:4 (2018) 154–180.
24. INFARMED – AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I. P. - **Infomed - Base de dados de medicamentos de uso humano** [Consult. a 23 de abril de 2023] Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/index.xhtml>>.
25. BROWNLEE, Michael - **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications**. *Nature*. ISSN 0028-0836. 414:2001) 813–820. doi: 10.1038/414813a.
26. GIACCO, Ferdinando; BROWNLEE, Michael - **Oxidative Stress and Diabetic Complications**. *Circulation Research*. ISSN 0009-7330. 107:9 (2010) 1058–1070. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
27. KHALID, Mariyam; PETROIANU, Georg; ADEM, Abdu - **Advanced Glycation End Products and Diabetes Mellitus: Mechanisms and Perspectives**. *Biomolecules*. ISSN 2218-273X. 12:2022) 542. doi: 10.3390/biom12040542.
28. MENGSTIE, Misganaw Asmamaw *et al.* - **Endogenous advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic diabetic complications**. *Frontiers in Molecular Biosciences*. ISSN 2296-889X. 9:1002710 (2022). doi: 10.3389/fmolb.2022.1002710.
29. PAPADOPOULOU, Athina *et al.* - **Dimethyl fumarate for multiple sclerosis**. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. ISSN 1354-3784. 19:12 (2010) 1603–1612. doi: 10.1517/13543784.2010.534778.
30. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Tecfidera (fumarato de dimetilo)** [Consult. a 14 de maio de 2023] Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/tecfidera-epar-medicine-overview_pt.pdf>.
31. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Skilarence (fumarato de dimetilo)** [Consult.

a 31 de agosto de 2023] Disponível em:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/skilarence-epar-summary-public_pt.pdf>.

32. WALKER, F. *et al.* - **Fumaderm® in daily practice for psoriasis: dosing, efficacy and quality of life.** *The British journal of dermatology*. ISSN 1365-2133. 171:5 (2014) 1197–205. doi: 10.1111/bjd.13098.

33. SHARKUS, Robert *et al.* - **Dimethyl Fumarate as Potential Treatment for Alzheimer’s Disease: Rationale and Clinical Trial Design.** *Biomedicines*. ISSN 2227-9059. 11:5 (2023) 1387. doi: 10.3390/biomedicines11051387.

34. THOMAS, Shilu Deepa *et al.* - **Repurposing Dimethyl Fumarate for Cardiovascular Diseases: Pharmacological Effects, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Promise.** *Pharmaceuticals*. ISSN 1424-8247. 15:5 (2022) 497. doi: 10.3390/ph15050497.

35. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - **PubChem Compound Summary for CID 853433, Isoeugenol**, atual. 2023. [Consult. a 1 de março de 2023]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoeugenol>>.

36. TOPAL, Fevzi - **Anticholinergic and antidiabetic effects of isoeugenol from clove (*Eugenia caryophyllata*) oil.** *International Journal of Food Properties*. ISSN 1094-2912. 22:1 (2019) 583–592. doi: 10.1080/10942912.2019.1597882.

37. MARTIZ, Reshma Mary *et al.* - **Phyto-Computational Intervention of Diabetes Mellitus at Multiple Stages Using Isoeugenol from *Ocimum tenuiflorum*: A Combination of Pharmacokinetics and Molecular Modelling Approaches.** *Molecules*. ISSN 1420-3049. 27:19 (2022) 6222. doi: 10.3390/molecules27196222.

38. GHANI, Usman - Polyphenols. Em **Alpha-Glucosidase Inhibitors: Clinically Promising Candidates for Anti-Diabetic Drug Discovery**. 1st. ed. [S.l.] : Elsevier, 2020 [Consult. a 26 de maio de 2023] Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081027790000034>>. ISBN 9780081027790. p. 61–100.

39. ALHARTHY, Khalid M. *et al.* - **Ameliorative Effects of Isoeugenol and Eugenol against Impaired Nerve Function and Inflammatory and Oxidative Mediators in Diabetic Neuropathic Rats.** *Biomedicines*. ISSN 2227-9059. 11:4 (2023) 1203. doi: 10.3390/biomedicines11041203.

40. SUBBA, Rhea *et al.* - **Targeting NRF2 in Type 2 diabetes mellitus and depression: Efficacy of natural and synthetic compounds.** *European Journal of Pharmacology.* ISSN 00142999. 925:2022) 174993. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.174993.
41. URUNO, Akira *et al.* - **The Keap1-Nrf2 System Prevents Onset of Diabetes Mellitus.** *Molecular and Cellular Biology.* ISSN 1098-5549. 33:15 (2013) 2996–3010. doi: 10.1128/MCB.00225-13.
42. TEBAY, Lauren E. *et al.* - **Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease.** *Free Radical Biology and Medicine.* ISSN 08915849. 88:0 0 (2015) 108–146. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.
43. CHOI, Chun Yeon *et al.* - **Isoeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF- κ B, ERK1/2, and p38 kinase.** *European Journal of Pharmacology.* ISSN 00142999. 576:1–3 (2007) 151–159. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.07.034.
44. LI, Weihua *et al.* - **Inhibitory action of eugenol compounds on the production of nitric oxide in RAW264.7 macrophages.** *Biomedical Research.* ISSN 0388-6107. 27:2 (2006) 69–74. doi: 10.2220/biomedres.27.69.
45. SAHA, Sarmistha *et al.* - **An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation.** *Molecules.* ISSN 1420-3049. 25:22 (2020) 5474. doi: 10.3390/molecules25225474.
46. FURMAN, Brian L. - **Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats.** *Current protocols.* ISSN 2691-1299. 1:4 (2021) e78. doi: 10.1002/cpzl.78.
47. PRASAD, Sathya N.; MURALIDHARA - **Evidence of acrylamide induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* - its amelioration with spice active enrichment: relevance to neuropathy.** *Neurotoxicology.* ISSN 1872-9711. 33:5 (2012) 1254–64. doi: 10.1016/j.neuro.2012.07.006.
48. PRASAD, Sathya N.; MURALIDHARA - **Neuroprotective Efficacy of Eugenol and Isoeugenol in Acrylamide-Induced Neuropathy in rats: Behavioral and Biochemical evidence.** *Neurochemical Research.* ISSN 0364-3190. 38:2 (2013) 330–345. doi: 10.1007/s11064-012-0924-9.
49. ENDO, Yuka *et al.* - **Evaluation of Antioxidant Activity of Spice-Derived**

Phytochemicals Using Zebrafish. International journal of molecular sciences. ISSN 1422-0067. 21:3 (2020) 1109. doi: 10.3390/ijms21031109.

50. FUJISAWA, Seiichiro *et al.* - **Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds.** Anticancer research. ISSN 0250-7005. 24:2B (2004) 563–9.

51. ATSUMI, T.; FUJISAWA, S.; TONOSAKI, K. - **A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions.** Toxicology in Vitro. ISSN 08872333. 19:8 (2005) 1025–1033. doi: 10.1016/j.tiv.2005.04.012.

52. NETFARMA - **Despesa do SNS com medicamentos teve a maior subida dos últimos nove anos em 2022** [Consult. a 4 de junho de 2023], atual. 2023. Disponível em: <https://www.netfarma.pt/despesa-do-sns-com-medicamentos-teve-a-maior-subida-dos-ultimos-nove-anos-em-2022/>.

53. SOETEDJO, Andreas Alvin Purnomo *et al.* - **Tissue engineering and 3D printing of bioartificial pancreas for regenerative medicine in diabetes.** Trends in Endocrinology & Metabolism. ISSN 10432760. 32:8 (2021) 609–622. doi: 10.1016/j.tem.2021.05.007.

54. KRENTZ, Nicole A. J. *et al.* - **Restoring normal islet mass and function in type I diabetes through regenerative medicine and tissue engineering.** The Lancet Diabetes & Endocrinology. ISSN 22138587. 9:10 (2021) 708–724. doi: 10.1016/S2213-8587(21)00170-4.

55. PÄTH, Günter *et al.* - **Stem cells in the treatment of diabetes mellitus - Focus on mesenchymal stem cells.** Metabolism: clinical and experimental. ISSN 1532-8600. 90:2019) 1–15. doi: 10.1016/j.metabol.2018.10.005.

56. WANG, Mengjie *et al.* - **Versatile Oral Insulin Delivery Nanosystems: From Materials to Nanostructures.** International journal of molecular sciences. ISSN 1422-0067. 23:6 (2022) 3362. doi: 10.3390/ijms23063362.

57. SHARMA, Preeti *et al.* - **Complementary and alternative medicine for the treatment of diabetes and associated complications: A review on therapeutic role of polyphenols.** Phytomedicine Plus. ISSN 26670313. 2:1 (2022) 100188. doi: 10.1016/j.phyplu.2021.100188.

58. OLIVEIRA, Sara *et al.* - **Curcumin derivatives for Type 2 Diabetes management and prevention of complications**. Archives of Pharmacal Research. ISSN 0253-6269. 43:6 (2020) 567–581. doi: 10.1007/s12272-020-01240-3.

Annexes

Annex I. Available therapies for the treatment of T2DM.

Therapeutic class	Drug	Mechanism of action	Actions	Adverse effects
Sulfonylureas	Glibenclamide Glipizide Gliclazide Glimepiride	Binding to ATP-dependent K ⁺ channels present in the membrane of pancreatic β-cells promoting their closure, which in turn leads to depolarization of the cell, promoting Ca ²⁺ influx and exocytosis of insulin.	Act directly on the pancreas by increasing insulin secretion.	Hypoglycaemia, weight gain and GI effects (diarrhoea, vomiting, nausea).
	Meglitinides	Nateglinide Repaglinide		
DPP-4 inhibitors	Alogliptin Linagliptin Saxagliptin Sitagliptin Vildagliptin	Inhibition of DPP-4, the enzyme responsible for hydrolysis of the enteroendocrine hormones GLP-1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide. Thus, as there is no degradation of these natural incretins, there is an increase in their blood concentration which in turn will increase the release of insulin from pancreatic β-cells mediated by the activation of GLP-1 receptors there present. GLP-1 also decrease secretion of glucagon from α-cells.	Stimulation of insulin release and decreased secretion of glucagon by the pancreas.	Upper respiratory tract infections, pancreatitis, thyroid cancer and diabetic ketoacidosis.
	GLP-1 receptor agonists	Liraglutide Semaglutide Dulaglutide Exenatide Lixisenatide	As analogues of GLP-1 they mimic its actions by actively and selectively binding to its receptor. Thus, by stimulating insulin release, reducing glucagon secretion, delaying gastric emptying in the initial postprandial phase and promoting satiety, blood glucose is reduced.	Stimulation of insulin release, decreased secretion of glucagon by the pancreas, delayed gastric emptying, and promotion of satiety.
α-Glucosidase inhibitors	Acarbose Miglitol	Inhibition of intestinal α-glucosidases enzymes which are involved in the degradation of disaccharides, oligosaccharides and polysaccharides, so there is a dose-dependent delay in glucose absorption at intestinal level. This leads to a reduction in postprandial insulin concentration and attenuates the rise in blood glucose.	Reduce the absorption of glucose in the GI tract.	GI effects (abdominal tension, flatulence, and constipation).
SGLT-2 inhibitors	Canagliflozin Dapagliflozin Empagliflozin Ertugliflozin	Inhibition of the SGLT-2 concomitantly reduces the reabsorption of sodium and glucose from the glomerular filtrate in the proximal renal tubule of the nephron, thus promoting an increase in the excretion of glucose and water in the urine. Together with osmotic diuresis, there is a reduction in fluid overload, blood pressure, and pre- and post-load, resulting in beneficial effects on cardiac remodelling and diastolic function, and preservation of renal function.	Decreases glucose reabsorption in the proximal tubule of the nephron, increasing glycosuria.	Genitourinary tract infections, hypoglycaemia, hyponatremia, hypotension, volume depletion, micturition disorders, weight loss.
	Thiazolidinediones	Pioglitazone	Acts on insulin-dependent tissues through agonism of the PPARγ which allows remodelling of a adipose tissue by apoptosis of mature adipocytes and induction of <i>de novo</i> preadipocyte differentiation, essential for redistribution of body fat from the visceral compartment to the subcutaneous compartment, promoting a decrease in insulin resistance. It also reduces hepatic production of glucose and increases glucose uptake via GLUT-4, through an improvement in post-receptor insulin signalling. Thus, a reduction in insulin resistance and a decrease in blood sugar levels is observed.	Increase tissue sensitization to insulin, decreasing insulin resistance.

Biguanides	Metformin	Inhibition of hepatic neoglucogenesis, which means there is a decrease in hepatic glucose output, leading to a reduction in fasting blood glucose. Inhibition of SGLT-1 in the intestine, so there is a decrease in GI absorption of glucose, promoting a reduction in postprandial blood glucose. Improves glucose uptake by peripheral tissues through the availability of insulin-dependent GLUT-4 transporters. Inhibits lipolysis with a consequent reduction in circulating free fatty acids.	Inhibit hepatic glucose production, decrease GI glucose absorption, and improve tissue glucose uptake.	Vitamin B ₁₂ deficiency and GI effects (diarrhoea, vomiting, flatulence, loss of appetite), lactic acidosis in renal failure.
------------	-----------	---	--	--

Abbreviations: ATP, Adenosine Triphosphate; Ca²⁺, Calcium ion; DPP-4, Dipeptidyl Peptidase 4; GI, Gastrointestinal; GLP-1: Glucagon-like Peptide-1; GLUT-4, Glucose Transporter Type 4; K⁺, Potassium ion; PPAR γ , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ; SGLT-1, Sodium-Glucose Co-Transporter Type 1; SGLT-2, Sodium-Glucose Co-Transporter Type 2; \uparrow , increased; \downarrow , decreased.

Annex 2. Anti-inflammatory and antioxidant effects of isoeugenol.

Reference	Experimental disease model	Administration route , dose and duration	Study objective	Main conclusions
6	Diabetic model induced by STZ in male Sprague Dawley rats.	Intraperitoneal injection of 10 mg/kg/day of isoeugenol for 14 days.	Evaluate the antioxidant effects in a diabetic animal model through the values of detoxification enzymes.	<p>↓ GSSG in the brain and ↓ GPX in the liver represent a reversal of DM pathology;</p> <p>↓ SOD in the liver, ↓ GSH in the liver, ↓ GSSG in the liver, ↑ GSSG in the heart are results independent of DM pathology.</p>
47	Model treated with ACR in male <i>Drosophila melanogaster</i> .	<p>Diet containing isoeugenol at a concentration of 25 μM;</p> <p>Diet containing eugenol, at a concentration of 25 μM.</p>	Evaluate the potential reduction in lipid peroxidation and the reestablishment of enzymatic antioxidant activity.	<p>↓ ROS and hydroperoxide levels in the mitochondria and cytosol of cells in the head and body regions;</p> <p>↑ GSH levels in the mitochondria and cytosol of cells in the head and body regions.</p>
48	Model treated with ACR in male albino rats.	<p>Intravenous injection of 10 mg/kg body weight of isoeugenol;</p> <p>Intravenous injection of 10 mg/kg body weight of eugenol;</p> <p>The injections are 3 times a week for 5 weeks.</p>	Evaluate the neuroprotective effects in neuropathy.	<p>↓ ROS in the sciatic nerve and brain regions;</p> <p>↓ Malondialdehyde levels in the sciatic nerve;</p> <p>↓ Hydrogen peroxide levels in the cortex;</p> <p>↓ NO levels in the cerebellum and sciatic nerve;</p> <p>↓ Ca²⁺ influx in the cortex and sciatic nerve;</p> <p>↑ GSH levels in the cortex and sciatic nerve;</p> <p>↑ CAT levels in cortex and cerebellum, but ↓ in sciatic nerve;</p> <p>↓ Glutathione-S-transferase in the cortex.</p>
49	Model treated with hydrogen peroxide and arsenite in zebrafish cell line with a mutation in Nrf2.	Exposure in a well plate for 12 hours to three different concentrations of isoeugenol: 1 μ M, 5 μ M and 25 μ M.	Evaluate the Nrf2-dependent antioxidant activity.	<p>Slight protective effects against hydrogen peroxide-induced toxicity at a concentration of 5 μM;</p> <p>Notable protective effects against arsenite-induced toxicity at concentration of 25 μM, that were dependent on the Nrf2 pathway.</p>

<p>39</p>	<p>Model induced by STZ in female Sprague Drawley rats.</p>	<p>Single injection of 10 mg/kg of isoeugenol; Single injection of 10 mg/kg of eugenol; Single injection of 5 mg/kg + 5 mg/kg of isoeugenol + eugenol.</p>	<p>Evaluate the antinociceptive effects of isoeugenol and eugenol, both isolated and in combination on diabetic neuropathic pain.</p>	<p>↑ Body weight in the groups with isoeugenol and eugenol isolated and the respective combination, compared to the STZ-induced control rats; ↓ Water consumption in the group with isoeugenol alone, compared to the STZ-induced control rats; ↓ Blood glucose levels in the groups with isoeugenol and eugenol alone and the respective combination, compared to the STZ-induced control rats. The greatest reduction was seen in the combination, followed by isoeugenol alone and finally eugenol alone; ↓ TBARS in the groups with eugenol alone and the combination compared to the STZ-induced control rats; ↑ SOD, CAT and GSH in the groups with isoeugenol and eugenol alone and the respective combination, compared to the STZ-induced control rats; ↓ TNF-α levels in the groups with isoeugenol and eugenol alone and the respective combination, compared to the STZ-induced control rats; ↑ Nerve growth factor levels in the group with the combination compared to the STZ-induced control rats; In the group with the combination compared to the STZ-induced control rats, there is an improved antinociceptive effect on mechanical allodynia and hyperalgesia, cold allodynia, and thermal hyperalgesia; ↓ Oedema of neuronal vessels and the arrangement and regeneration of myelinated fibres in the combination group compared to the STZ-induced control rats.</p>
-----------	---	--	---	--

Abbreviations: ACR, Acrylamide; CAT, Catalase; Ca²⁺, Calcium ion; DM, Diabetes Mellitus; GPX, Glutathione Peroxidase; GSH, Reduced Glutathione; GSSG, Oxidized Glutathione; NO, Nitric Oxide; Nrf2, Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2; ROS, Reactive Oxygen Species; SOD, Superoxide Dismutase; STZ, Streptozotocin; TNF-α; Tumour Necrosis Factor α; ↑, increased; ↓, decreased.