

Investigação *in silico* de substâncias bioativas da espécie *Pterodon emarginatus*

Investigation *in silico* of bioactive substances found in *Pterodon emarginatus* species

Rafaella Quirino Alcântara¹

Giovanna Pereira Bertholucci¹

Geovana Oliveira de Paula¹

Leonardo Sandrini Costa¹

Jônatas Pereira Bertholucci²

Leonardo Luiz Borges³

Resumo

Este estudo teve por objetivo descrever as propriedades químico-biológicas dos marcadores químicos presentes na espécie vegetal *Pterodon emarginatus*, conhecida popularmente como “Sucupira”, por meio de técnicas *in silico*. Essa árvore é encontrada principalmente em regiões do Cerrado e em áreas de transição entre as florestas semidecíduas de São Paulo e de Minas Gerais. Trata-se de uma pesquisa observacional e experimental. Os marcadores químicos da espécie em estudo foram obtidos a partir de um levantamento bibliográfico com o propósito final de identificar aqueles que seriam mais promissores em futuros testes biológicos. Em geral, as moléculas devem apresentar atividade biológica de interesse aliada a baixa toxicidade. Para estimar isso, uma série de programas de computador foram empregados para avaliar a estrutura, o perfil farmacocinético - absorção, distribuição, metabolismo e excreção -, a classificação “druglikeness” e a compatibilidade química desses compostos. Esses modelos computacionais são capazes de reduzir drasticamente a fração de falha relacionada à farmacocinética nas fases clínicas. Também foi estimado virtualmente em quais receptores as substâncias atuariam, com modelos de interação molecular e o quão estáveis seriam esses complexos formados. Apenas 3 componentes foram selecionados: vouacapano-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol, geranilgeraniol e α -humuleno. Todos apresentaram alta probabilidade de atuarem com propriedades antineoplásicas e anti-inflamatórias, sendo o α -humuleno o mais promissor, ligando-se aos receptores ativados por proliferadores peroxissomais do tipo alfa e apresentando boa interação entre as moléculas. Dessa forma, abrem-se portas para estudos pré-clínicos, *in vitro* e posteriormente *in vivo* dessa substância, para medir a eficácia e a toxicidade de um possível fármaco antes de administrar um medicamento aos humanos.

Palavras-chave: Simulação *In silico*; Docagem Molecular; Novo Fármaco em Investigação.

¹ Graduanda (o) em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás).

² Graduando em Medicina pela Universidade Federal de Goiás (UFG).

³ Doutor em Ciências Farmacêuticas, professor da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) e da Universidade Estadual de Goiás (UEG).



Abstract

This study aimed to describe the chemical-biological properties of the chemical markers present in the plant species *Pterodon emarginatus*, popularly known as “Sucupira”, using *in silico* techniques. This tree is found mainly in Cerrado regions and in transition areas between the semi-deciduous forests of São Paulo and Minas Gerais. This is an observational and experimental research. The chemical markers of the species under study were obtained from a bibliographic survey with the final purpose of identifying those with the best chance of becoming an effective medicine for patients. In general, molecules should have high biological activity combined with low toxicity. To estimate this, a series of computer programs were used to evaluate the structure, pharmacokinetics - absorption, distribution, metabolism and excretion -, “drugLikeness” and chemical compatibility of these compounds. These computational models are capable of drastically reducing the fraction of failure related to pharmacokinetics in the clinical phases. It was also virtually estimated on which receptors the substances would act, with models of molecular interaction and how stable these formed complexes would be. Only 3 components were selected: vouacapan-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol, geranylgeraniol and α -humulene. All showed a high probability of acting with antineoplastic and anti-inflammatory properties, with α -humulene being the most promising, binding to receptors activated by alpha-type peroxisomal proliferators and showing good interaction between molecules. Thus, doors are opened for pre-clinical, *in vitro* and later *in vivo* studies of this substance, to measure the efficacy and toxicity of a possible drug before administering a drug to humans.

Keywords: *In silico* simulation; Molecular Docking; New drug under investigation.

INTRODUÇÃO

A espécie *Pterodon emarginatus* é uma árvore conhecida popularmente como “sucupira branca”, “faveiro”, “fava de sucupira”, “fava de Santo Inácio”, “sucupira verdadeira” ou “sucupira lisa”. A ocorrência é muito comum em regiões do Cerrado, especialmente nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Tocantins; além de ser encontrada em áreas de transição entre as florestas semidecíduas de São Paulo e de Minas Gerais¹.

O gênero *Pterodon* pertence à família Fabaceae (= Leguminosae) e subfamília Faboideae, estando representada por quatro espécies nativas no Brasil: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioi* Pedersoli, *P. polygalaeiflorus* Benth e *P. emarginatus* Vogel. A espécie *P. emarginatus* também é conhecida como *P. pubescens*, isso porque Benth, em 1862, classificou essa espécie como *P. pubescens*, mas depois Vogel demonstrou que *P. emarginatus* e *P. pubescens* correspondiam à mesma espécie, então tornou oficial e unificada a nomenclatura *P. emarginatus* Vogel^{2,3}.

A espécie *P. emarginatus* pode atingir até 20 m de altura e até 46 cm de diâmetro do tronco. As folhas são compostas, alternas, imparipinadas. Os frutos são secos, alados, de coloração bege quando maduro. As sementes são pequenas, duras, amarelas, fortemente protegida dentro de uma cápsula fibrosa, de madeira, que é envolvida exteriormente por uma substância amarga e oleosa. Tem o período de frutificação de julho a outubro⁴.

Os diversos componentes da árvore possuem propriedades farmacológicas já descritas na literatura como antiedematogênicas⁵⁻⁷ que podem ser utilizadas a favor do tratamento de artrite, antinociceptivas^{8,9}, antioxidantes¹⁰, antiproliferativas, quimioprolíficas no combate à infecção por



cercárias de *Schistosoma mansoni* e também ações contra o *Trypanosoma cruzi*³. Além disso, são relatadas atividades antimicrobiana nas sementes, frutos e casca¹¹, antiplaquetária¹² e angiogênica¹³.

O presente artigo objetivou descrever as propriedades químico-biológicas dos marcadores químicos presentes na espécie vegetal *Pterodon emarginatus* por meio de técnicas *in silico*. De forma mais específica, o estudo almejou prever a atividade biológica e as propriedades farmacológicas desses compostos.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo analítico e experimental, com a avaliação das propriedades dos compostos da *Pterodon emarginatus*. Os marcadores foram selecionados a partir de um levantamento bibliográfico, o qual buscou informações a respeito dos compostos já identificados para esta espécie, utilizando as bases de dados de artigos científicos: Pubmed, Scielo, ScienceDirect, Periódicos Capes e a Biblioteca Digital da Unicamp.

A base de dados PubChem¹⁴ foi utilizada para encontrar as moléculas bioativas, coletando informações sobre a estrutura química das substâncias (CANONICAL SMILES). Em seguida, com esse dado, usamos o programa Way2Drug, por meio do software PASS Online¹⁵, para estimar os perfis de atividade biológica para moléculas virtuais, a partir da predição de “Pa” e “Pi”. Pa (probabilidade de “estar ativo”) estima a chance de o composto estudado pertencer à subclasse de compostos ativos (assemelha-se às estruturas das moléculas, que são as mais comuns em um subconjunto de “ativos” no treinamento PASS conjunto); e Pi (probabilidade de “ser inativo”) estima a chance de o composto estudado pertencer à subclasse de compostos inativos (assemelha-se às estruturas das moléculas, que são as mais comuns em um subconjunto de “inativos” no treinamento PASS conjunto).

As estruturas químicas dos marcadores e de moléculas bioativas identificadas nas etapas anteriores foram então modeladas em representações 2D e 3D por meio do programa computacional SwissADME¹⁶, com avaliação da farmacocinética, da semelhança de medicamentos (“drugLikeness”) e da compatibilidade química de pequenas moléculas. Em seguida, utilizando a ferramenta online SwissTargetPrediction¹⁷, foram aplicados os SMILES das moléculas que se encaixaram na classificação de “drugLikeness” para estimar virtualmente em quais receptores essas moléculas atuam no corpo humano. Com o link “Uniprot ID” presente nesta mesma ferramenta, foi avaliada a relação dos receptores encontrados com as funções e patologias associadas.

Para as moléculas bioativas que foram consideradas classificadas nas etapas anteriores, elaboramos modelos de interação intermolecular com a estrutura macromolecular. Tais modelos

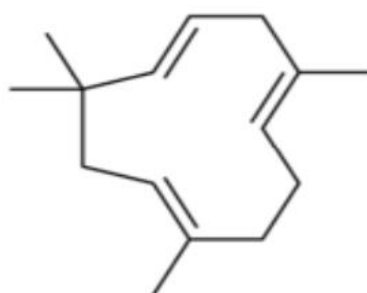


podem ser úteis na proposta de elucidar os mecanismos de interação molecular envolvidos no reconhecimento dos marcadores pelas diversas enzimas e receptores encontrados anteriormente.

Para a construção dos modelos, foi empregada a estratégia de docagem molecular, em que inúmeras conformações dos marcadores químicos foram simuladas com a estrutura do alvo biológico enzimático, com o intuito de descobrir se tais moléculas são capazes de interagir de forma eficaz no sítio ligante da biomolécula. Para a geração dos modelos, o programa SwissDock¹⁸ foi essencial, bem como modelos moleculares tridimensionais da enzima depositados no PDB (“Protein Data Bank”). Para o redocking foi utilizada a função de score CHEMPLP (Chemical Piecewise Linear Potential) no programa GOLD.

RESULTADOS

Inicialmente foi feita uma revisão de literatura a respeito da espécie vegetal *Pterodon emarginatus* e alguns de seus componentes apresentaram propriedades farmacológicas já descritas na literatura e com base nisso selecionamos 3: vouacapano-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol, geranilgeraniol e α -humuleno (Figura 1).



α -humuleno

Figura 1. Estrutura do α -humuleno.

No servidor PASS Prediction, foram avaliadas a partir dos valores de $P_a > 0,7$ (P_a corresponde a probabilidade da substância apresentar a propriedade biológica sugerida) e $P_i < 0,05$ (P_i corresponde a probabilidade da substância não apresentar a propriedade biológica sugerida) e os resultados encontrados foram os seguintes: o diterpeno apresentou 0,715 de P_a e 0,005 de P_i para a atividade inibitória da metaloproteinase do tipo 9 (*MMP-9 expression inhibitor*), que tem forte relação com o câncer devido ao seu papel na remodelação da matriz extracelular e na angiogênese. Enquanto o geranilgeraniol apresentou similaridade estrutural com substâncias com propriedade

antineoplásica de Pa 0,743 e Pi de 0,019. Por fim, o composto sesquiterpênico apresentou 0,018 de Pa e 0,003 para o *MMP9 expression inhibitor* 0,835 de Pa e 0,008 de Pi para atividade antineoplásica e 0,741 de Pa e 0,011 de Pi para atividade anti-inflamatória que também será abordada nesse estudo.

Posteriormente foi realizada a predição pelo programa SwissADME, dos marcadores químicos e moléculas bioativas, e a classificação *druglikeness* dessas moléculas, a qual avalia propriedades físico-químicas, lipofilicidade, hidrofiliicidade e farmacocinética, assim representando a possibilidade de a molécula apresentar perfil favorável à absorção intestinal.

O parâmetro adotado foi a "Regra dos Cinco de Lipinski"¹⁹, na qual a molécula deve obedecer no mínimo 3 dos 4 critérios: massa molecular <500 daltons; lipofilicidade (Log P<5); Hidrossolubilidade; número de aceptores de hidrogênio <10 e de doadores <5. O vouacapano-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol e o α -humuleno obedeceram aos 5 critérios, enquanto o geranilgeraniol deixou a desejar em 2, lipofilicidade com Log P=5,85 e moderadamente solúvel em meio aquoso. Em relação a interações com os citocromos o diterpeno não apresentou nenhuma, o α -humuleno, 1 (*CYP2C9 inhibitor*) e o geranilgeraniol, 2 (*CYP1A2 inhibitor* e *CYP2C9 inhibitor*).

Em seguida, utilizou-se a ferramenta SwissTargetPrediction para estimar os alvos moleculares mais prováveis de cada molécula. Para vouacapano-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol, o alvo que apresentou relação com atividade antineoplásica foi a Proteína quinase C tipo alfa que está envolvida na regulação positiva e negativa da proliferação celular, apoptose, diferenciação, migração e adesão, tumorigênese, angiogênese, dentre outras atividades.

Já para o geranilgeraniol, destacaram-se: Proteína quinase C tipo alfa, como no diterpeno e o tipo delta de proteína quinase C, que desempenha papéis contrastantes na morte celular e sobrevivência celular, funcionando como uma proteína pró-apoptótica durante a apoptose induzida por danos no DNA, mas atuando como apoptótica durante a morte celular.

No caso do α -humuleno a atividade neoplásica foi encontrada nos alvos: Proteína de dedo de zinco GLI2, muito expresso no câncer de mama; Proteína de dedo de zinco GLI1, que promove a migração de células cancerosas; Receptor de quimiocina CXC tipo 3, a qual sua superexpressão em células cancerosas renais promove a apoptose e Serina / treonina-proteína quinase PLK1, que tem a expressão aumentada em tecidos tumorais com mau prognóstico, sugerindo um papel nas transformações malignas e na carcinogênese.

Foi analisado também a atividade anti-inflamatória do sesquiterpênico, que apresentou vários alvos que participam da regulação negativa da resposta inflamatória, segundo os dados encontrados na base de dados UniProt, são eles: Receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR-alfa), Receptor de canabinoide 2, Potencial de receptor transitório de canal catiônico subfamília V membro 1, Receptor de adenosina A1, Receptor de adenosina A2a, 5-lipoxigenase de ácido graxo poliinsaturado e não receptor de tirosina-proteína fosfatase tipo 2.



A partir dos resultados levantados, conclui-se que o composto sesquiterpênico α -humuleno pode ser o mais promissor para atividades antineoplásicas e anti-inflamatórias e, portanto, as demais fases do processo foram seguidas apenas com essa molécula para reforçar essa hipótese.

A investigação no servidor ProTOX II webserver demonstrou como o α -humuleno (LD50: 3650/Kg) possui baixa toxicidade, pertencendo à classe 5. Outrossim, não houve nenhum alvo de toxicidade do composto.

Para a validação do modelo empregado no redocking molecular, realizou-se um *redocking* (Figura 2) para o alvo PPAR-alfa (PDB ID 2P54) com o ligante co-cristalografado 2-metil-2- (4 - {{{4-metil-2- [4- (trifluorometil) fenil] -1,3-tiazol-5-il} carbonil) amino] metil} fenoxi) ácido propanóico. Nesta análise, os valores da distância entre a molécula calculada e a molécula real (RMSD) foram inferiores a 2 *angströms* em 6 soluções, revelando o poder de confiabilidade do modelo gerado, pois acertou em mais de 3 soluções.

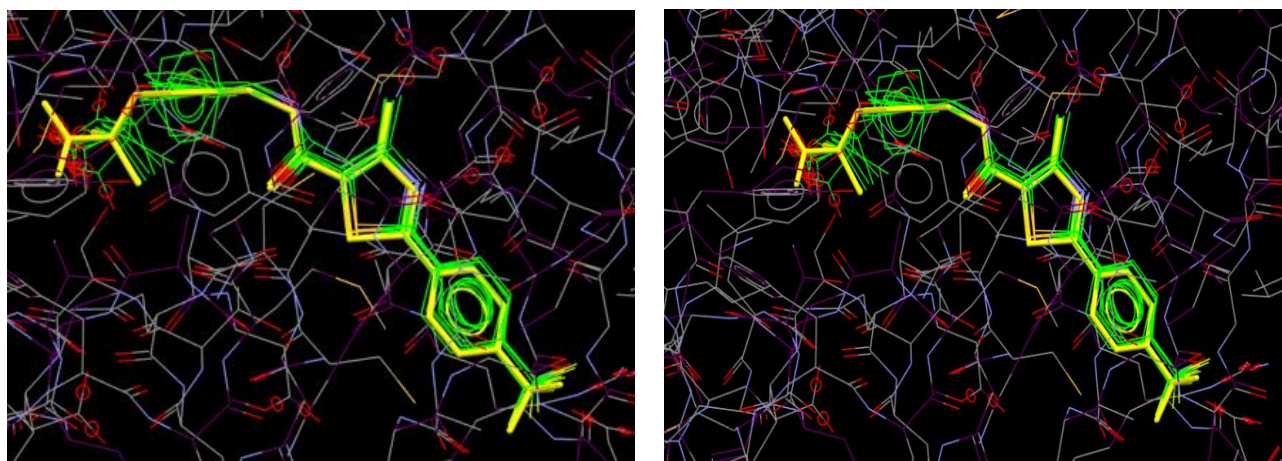


Figura 2. Imagens do Redocking do ligante co-cristalografado 2-metil-2- (4 - {{{4-metil-2- [4- (trifluorometil) fenil] -1,3-tiazol-5-il} carbonil) amino] metil} fenoxi) ácido propanóico no PPAR-alfa.

A partir das condições estabelecidas pelo redocking molecular, realizou-se a análise de ancoramento com o ligante selecionado, α -humuleno, obtendo-se a configuração apresentada na Figura 3.

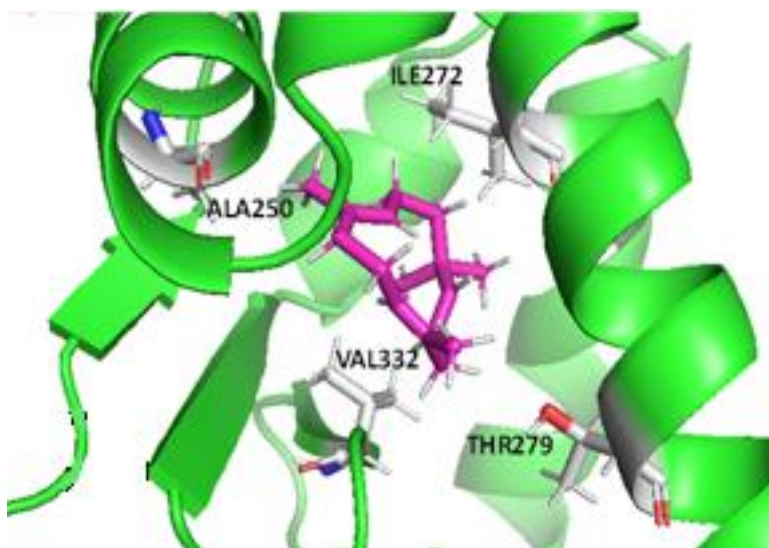


Figura 3. Docking do α -humuleno no sítio ativo do PPAR-alfa (PDB ID 2P54). Pose gerada a partir do Pymol 1.1r1 software.

Para o *docking* do α -humuleno, empregou-se as mesmas condições de modelo utilizadas para o ligante co-cristalizado do alvo PPAR-alfa (Figura 4).

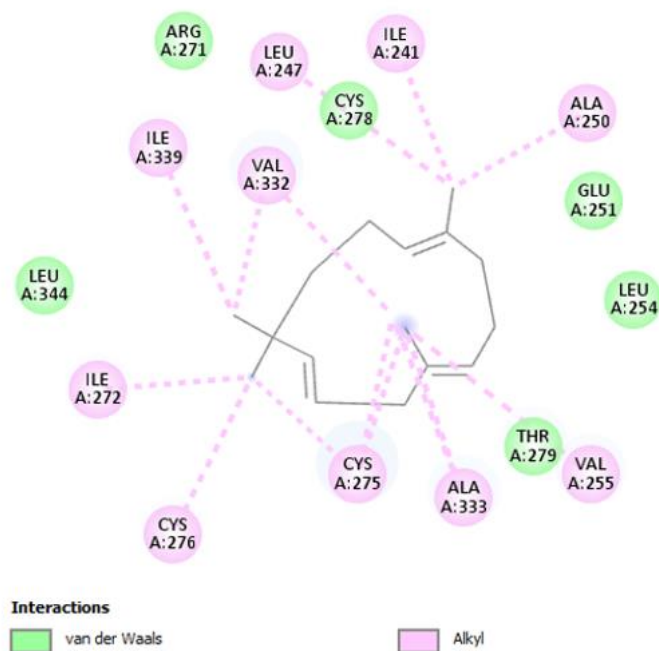


Figura 4. Diagrama da interação 2D entre o α -humuleno e o sítio ativo do PPAR-alfa (PDB ID 2P54). Pose gerada a partir do Discovery Studio 3.5 Visualizer.

DISCUSSÃO

O gênero *Pterodon* pertence à família Fabaceae (= Leguminosae) e subfamília Faboideae, estando representada por quatro espécies nativas no Brasil: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioi* Pedersoli, *P. polygalaeflorus* Benth e *P. emarginatus* Vogel. Dentre os compostos descritos na literatura dessas espécies, 3 foram abordados como o foco desse projeto: vouacapano-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol, geranilgeraniol e α -humuleno.

Dentre as propriedades farmacológicas já trabalhadas por outros autores sobre a sucupira, temos antiedematogênicas, antinocioceptivas, antiproliferativas, antioxidantes, quimioprolíficas no combate à infecção por cercárias de *Schistosoma mansoni* e ações contra o *Trypanosoma cruzi*. Além disso, são relatadas atividades antimicrobiana, antiplaquetária e angiogênica nas sementes, frutos e cascas^{3,5,7-11}.

Os resultados apontam que a molécula selecionada, α -humuleno, a *Pterodon emarginatus* apresentou um potencial para interagir com o receptor ativado por proliferador de peroxissoma PPAR-alfa (PDB ID 2P54), um fator de transcrição ativado por ligante que pertence à família dos receptores nucleares.

Os fibratos são agonistas do PPAR-alfa e têm sido usados para tratar a dislipidemia por várias décadas devido aos seus efeitos de redução dos triglicerídeos e aumento do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C). Ações anti-inflamatórias e antitrombóticas dos agonistas do PPAR-alfa também na parede do vaso, já foram abordadas na literatura, sugerindo, portanto, que esse receptor apresenta efeitos benéficos em situações de estresse inflamatório.

Além disso, o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante de sementes de *P. emarginatus* ressaltam o poder antinociceptivo e atividades anti-inflamatórias dessa planta¹⁰. Somado a isso, pesquisadores apresentaram estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram que a administração aguda de até mesmo doses extremamente altas do óleo de sementes de *P. pubescens* não são mutagênicas, não tóxicas e não citotóxicas para as células mononucleares do sangue periférico humano (PBMNCs)²⁰.

Esse fato vai ao encontro a investigação no realizada nesse estudo no servidor ProTOX II webserver, o qual demonstrou que o α -humuleno (LD50: 3650/Kg) possui baixa toxicidade, pertencendo à classe 5 (sendo a classe 1 a mais tóxica e a 6 a menos tóxica).

Os resultados aqui obtidos abrem perspectiva para a realização de estudos pré-clínicos, *in vitro* e posteriormente *in vivo*, para medir a eficácia e a toxicidade do fármaco antes de administrar um medicamento aos humanos.

Outro fator a ser considerado, é a ampla biodiversidade brasileira que coloca o país em posição estratégica no desenvolvimento e exploração racional de novos metabólitos com valor terapêutico, como α -humuleno que foi foco do nosso estudo.



CONCLUSÃO

Foi realizada a predição de atividade biológica dos compostos identificados na espécie *P. emarginatus*, vouacapano-6 α , 7 β , 14 β , 19-tetraol, geranilgeraniol e α -humuleno, e posteriormente feita a predição das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas desses compostos, sendo o α -humuleno a molécula que se apresentou mais promissora para docagem molecular. O alvo selecionado para ligar ao α -humuleno foram os receptores ativados por proliferadores peroxissomais do tipo alfa e a partir disso foi feita a docagem, a qual demonstrou uma boa interação entre as moléculas. Dessa forma, o resultado do docking molecular abre perspectivas para futuros testes *in vitro* e *in vivo* com essa substância isolada e os dados aqui apresentados sugerem que o alfa humuleno pode vir a ser futuramente um candidato promissor a fármaco.

REFERÊNCIAS

1. Cruz RAS, De Oliveira LP, Caldeira FHB, Mendonça FS, Bacha FB, Pott A, et al. Intoxicação espontânea e experimental por *Pterodon emarginatus* (Fabaceae Faboideae) em bovinos e experimental em ovinos. *Pesqui Vet Bras*. 2012;32(11):1087–94.
2. Carvalho JCT, Sertié JAA, Barbosa MVJ, Patrício KCM, Caputo LRG, Sarti SJ, et al. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. *J Ethnopharmacol*. 1999;64(2):127–33.
3. Hansen D, Haraguchi M, Alonso A. Pharmaceutical properties of “sucupira” (*Pterodon* spp). *Brazilian J Pharm Sci*. 2010;46(4):607–16.
4. den Steinen K von, den Steinen K von. Guia de identificação de espécies-chave para a restauração florestal na região de Mato Grosso. *Durch Cent*. 2012;14–20.
5. Servat L, Spindola HM, Rodrigues RAF, Sousa IMO, Ruiz ALTG, Foglio MA. *Pterodon pubescens*. 2012;23(7):1244–53.
6. Silva MCC, Gayer CRM, Lopes CS, Calixto NO, Reis PA, Passaes CPB, et al. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. *J Pharm Pharmacol*. 2010;56(1):135–41.
7. Spindola HM, Servat L, Denny C, Rodrigues RAF, Eberlin MN, Cabral E, et al. Antinociceptive effect of geranylgeraniol and isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *BMC Pharmacol*. 2010;10(1):1–10.
8. Coelho LP, Reis PA, De Castro FL, Machado Gayer CR, Da Silva Lopes C, Da Costa E Silva MC, et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. *J Ethnopharmacol*. 2005;98(1–2):109–16.
9. Luís R, Moreira H, Mendonça R, Ann M. Atividade antinociceptiva de frações obtidas da *Pterodon pubescens* Benth. *Rev Eletrônica Farmácia*. 2007;IV(2):114–5.
10. Dutra RC, Trevizani R, Pittella F, Barbosa NR. Antinociceptive activity of the essential oil and fractions of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. *Lat Am J Pharm*. 2008;27(6):865–70.



11. Bustamante KGL, Lima ADF, Soares ML, Fiuza TS, Tresvenzol LMF, Bara MTF, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. Rev Bras Plantas Med. 2010;12(3):341–5.
12. Calixto NO, E Silva MCDC, Gayer CRM, Coelho MGP, Paes MC, Todeschini AR. Antiplatelet activity of geranylgeraniol isolated from *Pterodon pubescens* fruit oil is mediated by inhibition of cyclooxygenase-1. Planta Med. 2007;73(5):480–3.
13. Araújo LA De, Assunção LA, Silva-júnior NJ. Scientia Medica. 2015;25(2).
14. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D1102–9.
15. Filimonov DA, Lagunin AA, Gloriovova TA, Rudik A V., Druzhilovskii DS, Pogodin P V., et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. Chem Heterocycl Compd. 2014;50(3):444–57.
16. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep. 2017;7(March):1–13.
17. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. Nucleic Acids Res. 2019;47(W1):W357–3664.
18. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. Nucleic Acids Res. 2011;39(SUPPL. 2):270–7.
19. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64(SUPPL.):4–17.
20. Felzenszwalb I. In vitro and in vivo toxicological study of the. Toxicol Lett. 1999;108:27–35.

Contato para correspondência:

Jônatas Pereira Bertholucci

E-mail:

jonatas.bertholucci@gmail.com

Conflito de interesse: Não

Financiamento: Recursos próprios

