

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS, FARMACÊUTICAS E BIOMÉDICAS
CURSO DE FARMÁCIA**

Busca in silico de substâncias bioativas da espécie *Commiphora mukul*

**EDUARDO DO COUTO SOARES
LARISSA SÔFFA YANO**

**GOIÂNIA – GO
2020**

Busca *in silico* de substâncias bioativas da espécie *Commiphora mukul*
Eduardo do Couto Soares, Larissa Sôffa Yano & Leonardo Luiz Borges
Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Pontifícia
Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

RESUMO:

OBJETIVOS: Avaliar os principais compostos que expliquem a atividade hipocolesterolemia da *Commiphora mukul*, conhecida popularmente como “guggul”, empregando ferramentas *in silico*.

MÉTODOS: Os metabólitos da “guggul” foram levantados bibliograficamente e a codificação das moléculas para a realização das predições foi obtida no site Pubchem. Realizou-se então triagem de bioatividade com os programas SwissADME, ProToxII, PASS e pesquisa de alvos, com os servidores SuperPred Webserver. Após a identificação do alvo, a estrutura selecionada foi obtida pelo site Protein Data Bank (PDB) para o *docking* molecular com o programa GOLD.

RESULTADOS: Os metabólitos, principalmente terpenos e compostos fenólicos, da *Commiphora mukul*, tiveram suas propriedades físico-químicas e biológicas analisadas. Os alvos para o *docking* molecular foram identificados e verificados para cada composto, com suas respectivas estruturas cristalografadas no Protein Data Bank (PDB). A molécula estigmasterol foi selecionada pois apresentou predição de interação com o receptor HMG-CoA redutase (1HWI). O *docking* revelou interação do estigmasterol com o receptor HMG-CoA redutase, o que poderia auxiliar na explicação para os efeitos hipocolesterolemiantes desta espécie vegetal.

CONCLUSÕES: O estudo *in silico* da *Commiphora mukul* abordada neste trabalho, elegeu o estigmasterol como principal metabólito ativo com possível atividade hipocolesterolemia presente na *Commiphora mukul*. O *docking* do estigmasterol mostrou ancoragem desta molécula no sítio ativo do receptor HMG-CoA redutase devido as atividades desta espécie, assim, este marcador poderia atuar como hipocolesterolemia.

PALAVRAS CHAVES: plantas medicinais, hipocolesterolemia, *in silico*, *docking* molecular.

ABSTRACT:

AIMS: To evaluate the main compounds that explain the hypocholesterolemic activity of *Commiphora mukul*, popularly known as “guggul” using *in silico* tools.

METHODS: The metabolites of the "guggul" were surveyed bibliographically and the coding of the molecules to make predictions was obtained from the Pubchem website. Bioactivity was then screened with the SwissADME, ProToxII, PASS programs and target research with the SuperPred Webserver servers. After target identification, the selected structure was obtained by the Protein Data Bank (PDB) website for molecular docking with the GOLD program.

RESULTS: The metabolites mostly terpenes and phenolic compounds of *Commiphora mukul* had their physical-chemical and biological properties analyzed. Molecular docking targets were identified and verified for each compound, with their respective crystallographic structures in the Protein Data Bank (PDB). The stigmasterol molecule was selected because it showed prediction of interaction with the HMG-CoA reductase receptor (1HWI). Docking revealed an interaction between stigmasterol and the HMG-CoA reductase receptor, which could explain the hypocholesterolemic effects of this plant species.

CONCLUSIONS: This study of *Commiphora mukul*, using *in silico* tools addressed in this work, chose stigmasterol as the main active metabolite with possible hypocholesterolemic activity present in *Commiphora mukul*. The docking of stigmasterol showed anchoring of this molecule in the active site of the HMG-CoA reductase receptor due to the activities of this species, thus, this marker could act as a hypocholesterolemic.

KEYWORDS: medicinal plants, cholesterol-lowering, *in silico*, molecular docking.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são alterações que afetam de maneira direta o sistema circulatório e estão associadas a diversos fatores de risco, como: diabetes *melittus*, dislipidemias, obesidade, tabagismo, hipercolesterolemia, hábitos alimentares, fatores genéticos, dentre outros [1].

As dislipidemias são alterações nos níveis séricos de lipídeos, que incluem colesterol total alto, colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) alto, triglicérides em níveis elevados e colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL) em níveis baixos. Existem diversos tipos de dislipidemias que são classificadas conforme o tipo de alteração dos níveis sérios de lipídeos, podendo ser: hipertrigliceridemia isolada, HDL-C baixo, hiperlipidemia mista e hipercolesterolemia isolada. As dislipidemias podem ser tratadas de forma farmacológica e não farmacológica, ou por meio de uma combinação entre essas duas abordagens. Alternativas terapêuticas, como o uso de medicamentos fitoterápicos também podem ser empregadas neste contexto [2].

Considerando que o Brasil possui uma extensa biodiversidade, as plantas medicinais constituem uma fonte de compostos bioativos, que podem ser investigados com o objetivo de obter novas moléculas com potencial terapêutico [3].

A espécie vegetal *Commiphora mukul* Hook.ex Stocks (Burseraceae) é amplamente distribuída em regiões áridas de alguns estados da Índia, entretanto também pode ser encontrada no Brasil. Estudos constataram que a resina de *Commiphora mukul*, conhecida como “goma de guggul” apresenta diversos efeitos benéficos ao organismo, sendo o mais importante a ação hipocolesterolêmica. A *Commiphora mukul*, extraída da resina através de solventes como metanol, acetato de etila e hexano, tem sido utilizada na medicina Ayurvédica há mais de 2000 anos para tratar uma variedade de doenças, como: obesidade, dislipidemia, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, entre outras. Alguns estudos mais recentes estão sendo feitos para testar a resina no manejo da cardiopatia isquêmica. Esta espécie constitui fonte promissora de compostos bioativos, apresentando atividade inibitória da

biossíntese do colesterol hepático, aumento da excreção fecal de ácidos biliares e aumento da lecitina plasmática [4].

Durante a realização de estudos com a finalidade de encontrar compostos bioativos **promissores** das principais ferramentas de investigação, consiste nas análises *in silico*. As ferramentas *in silico* são empregadas para a descoberta de novos compostos bioativos baseados em técnicas computacionais. Atualmente, no cenário farmacêutico, os modelos *in silico* apresentam destaque devido a flexibilidade, baixos custos e alto potencial na prospecção de novas moléculas, além de minimizar a utilização de ensaios com animais de laboratório [5].

O objetivo deste trabalho é descrever as propriedades químico-biológicas dos marcadores químicos presentes na espécie vegetal *Commiphora mukul* e identificar moléculas com propriedades químicas e estruturais propensas a inibir a biossíntese do colesterol hepático já descritos na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

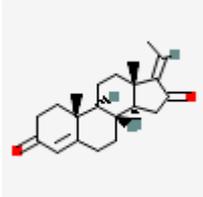
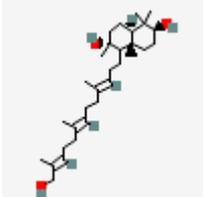
Os metabólitos ativos presentes na espécie *Commiphora mukul* foram identificados através de busca de artigos científicos em base de dados como Pubmed, Sciencedirect, Scielo sobre a espécie *Commiphora mukul*. Após a identificação dessas estruturas, a codificação das moléculas para a realização das predições foi obtida no site Pubchem para as análises posteriores [6]. A etapa de triagem de bioatividade para os marcadores químicos foi realizada com os programas SwissADME [7], ProToxII [8-10] e PASS [11-13]. Na etapa de triagem foi possível obter uma lista com possíveis atividades biológicas para cada uma das substâncias em função de suas estruturas químicas, segundo as bases metodológicas de cada programa.

A partir dos compostos selecionados, foi realizada pesquisa de possíveis alvos para a verificação do *docking* molecular utilizando o servidor SwissTargetPrediction [14], que determina alvos moleculares a partir da estrutura de ligantes.

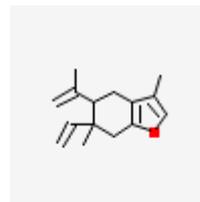
Os alvos que apresentaram relação com a atividade biológica investigada foram posteriormente obtidos no banco de dados Protein Data Bank (PDB; <https://www.rcsb.org/>) [15]. Os compostos com maiores scores a atividade hipocolesterolemiantes foram **selecionadas** para simulações de docagem molecular. O visualizador Hermes GOLD Suite 5.7.0 foi usado para preparar os receptores para o acoplamento [16]. A região de interesse usada para o docking foi definida com base na região de ancoramento do ligante co-cristalizado. Valores padrão de todos os outros parâmetros foram utilizados e as análises foram realizadas empregando algoritmos genéticos associados a função de score CHEMPLP [17]. Para a validação dos parâmetros do modelo foi realizado o *redocking* utilizando o complexo ligante (fluvastatina)-proteína cristalografada e essas condições foram reproduzidas na realização do *docking* com o marcador químico selecionado da espécie *Commiphora mukul*.

RESULTADOS

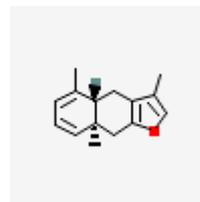
Os principais metabólitos secundários presentes na espécie *Commiphora mukul* foram: guggulsterone, myrrhanol A, curzerene, furanoedesma-1,3-diene, lindestrene, curzerenone, stigmasterol e guggulsterone-M (Figura 1).

| Molécula | Estrutura química |
|---------------|--|
| Guggulsterone |  |
| Myrranol A |  |

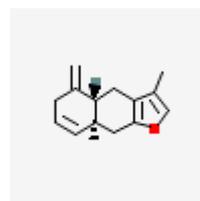
Curzerene



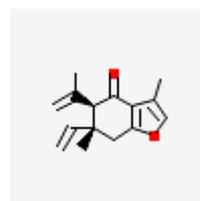
Furanoeudesma-1,3-diene



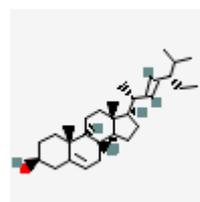
Lindestrene



Curzerenone



Stigmasterol



Guggulsterone-M

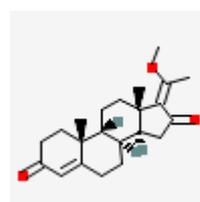


Tabela 1: Principais metabólitos ativos presentes na espécie *Commiphora mukul*, identificados através de revisão bibliográfica. Os pontos vermelhos nas figuras das moléculas representam átomos de oxigênio e os pontos cinzas representam átomos de Hidrogênio.

Cada um desses compostos foi submetido à triagem farmacocinética utilizando o programa SwissADME, contendo os parâmetros: massa molecular, nOHNH (número de doadores de ligação de hidrogênio), nON (número de aceptores de ligação de hidrogênio), TPSA (área superficial da molécula), milogP

(lipofilicidade da molécula), necessários para classificar o conjunto de moléculas semelhantes ao parâmetro farmacocinético de drogas já conhecidas. Por meio das informações obtidas utilizando o servidor SwissADME, realizou-se a classificação *druglikeness* nesses compostos de acordo com as regras de Lipinski (“regra dos cinco”)[18], que retratam suas respectivas capacidades de apresentarem comportamento semelhante a fármacos empregados por via oral e segundo tais critérios, foi observado que todos os compostos inicialmente selecionados da espécie *C. mukul* foram **classificados como *druglikeness***. [7]

A capacidade de absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE), dose letal média (DL50) e classe de toxicidade foram obtidas nos programas SwissADME e ProToxII. Já as possíveis atividades biológicas para cada metabólito ativo da *Commiphora mukul* foram obtidas com o programa PASS online. [11-13]

Por meio dos resultados gerados pelo servidor SwissTargetPrediction, na pesquisa de alvos para a realização do *docking* molecular, foram verificados os potenciais alvos de cada composto e posteriormente suas respectivas estruturas cristalografadas no PDB. Dos compostos inicialmente selecionados, a molécula de estigmasterol apresentou as maiores pontuações nos servidores utilizados e foi, portanto, a substância escolhida para avaliar a potencial interação com o provável alvo HMG-CoA redutase (beta-hidrometilglutaril coenzima A redutase), que consiste em uma das principais enzimas hepáticas responsáveis pela síntese de colesterol e que pode estar associada a dislipidemias quando existe um excesso de síntese deste lipídeo. Assim, o estigmasterol poderia estar associado a um efeito hipocolesterolemizante, pois o bloqueio da HMG-CoA redutase pode acarretar a inibição da síntese de colesterol, resultando em queda dos níveis de LDL e VLDL. A estrutura obtida pelo PDB: ID: 1HWI foi a utilizada para a realização do estudo de ancoragem molecular com o ligante selecionado [19].

O estigmasterol foi classificado como ***druglikeness*** segundo os critérios de Lipinski, sendo portanto uma substância que de acordo com as regras de Lipinski, poderia se comportar como um fármaco em potencial, sobretudo no âmbito farmacocinético; os resultados das predições farmacocinéticas, **ponta** que o estigmasterol apresenta absorção pelo trato gastrointestinal (baixa) e baixa penetração pela barreira hematoencefálica (BHE). Embora apresente uma

das menores doses letais média (DL₅₀) dentre os compostos selecionados, o valor 890mg/kg representa um parâmetro seguro dado que o composto foi classificado como classe 4 (as classes variam de 1 a 6 e quanto mais próximo de 6, mais seguro é o composto) [8-10]; além de que mostrou possível atividade em alvos relacionados ao controle dos marcadores lipídicos, segundo o programa PASS.

Realizou-se inicialmente o *redocking* (Figura 2) para a validação dos parâmetros do modelo, utilizando o ligante co-cristalizado fluvastatina e como sítio de ligação o sítio em que esta molécula se encontra ancorada no receptor HMG-CoA redutase. A Figura 2 revela os resultados do *redocking*, em que as 3 poses com maiores resultados na função de *score* utilizada apresentaram valores de RMSD menores que 1Å. Assim, o resultado obtido neste modelo de *redocking* foi extrapolado para o ligante selecionado estigmasterol. [20].

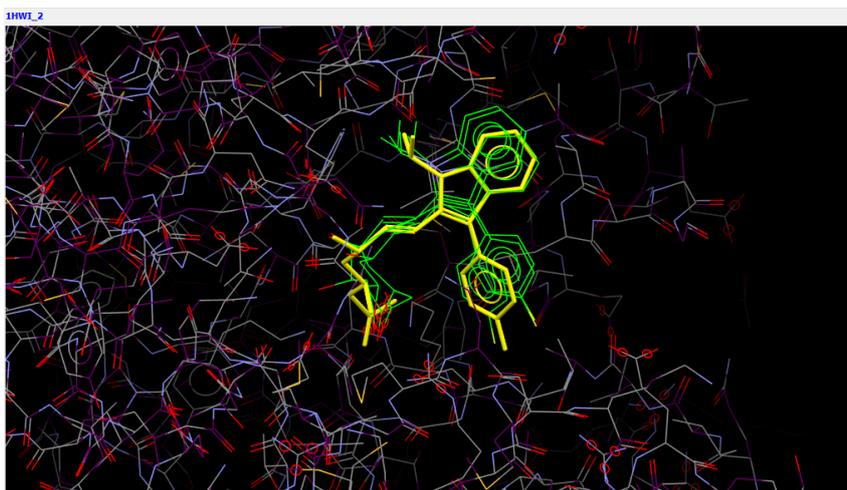


Figura 2- *Redocking* da fluvastatina (ligante co-cristalizado) no receptor HMG-CoA redutase (os valores de RMSD das 3 poses geradas foram menores que 1).

O *docking* revelou potenciais interações do estigmasterol com o receptor HMG-CoA redutase. A Figura 3-A revela que uma interação intermolecular de maior intensidade (ligação de hidrogênio) ocorre entre o estigmasterol e a alanina 751 presente na cavidade ativa do receptor HMG-CoA redutase. Outras interações provavelmente responsáveis pela estabilização do ligante no sítio ativo correspondem a interações do tipo π -alquila e alquila-alquila com os aminoácidos valina A 683, Leucina B 857, alanina B 856, Leucina B 853, Metionina A 65, Histidina B 752. A conformação tridimensional da interação do

estigmasterol com o receptor HMG-CoA redutase está representada na Figura 3-B.

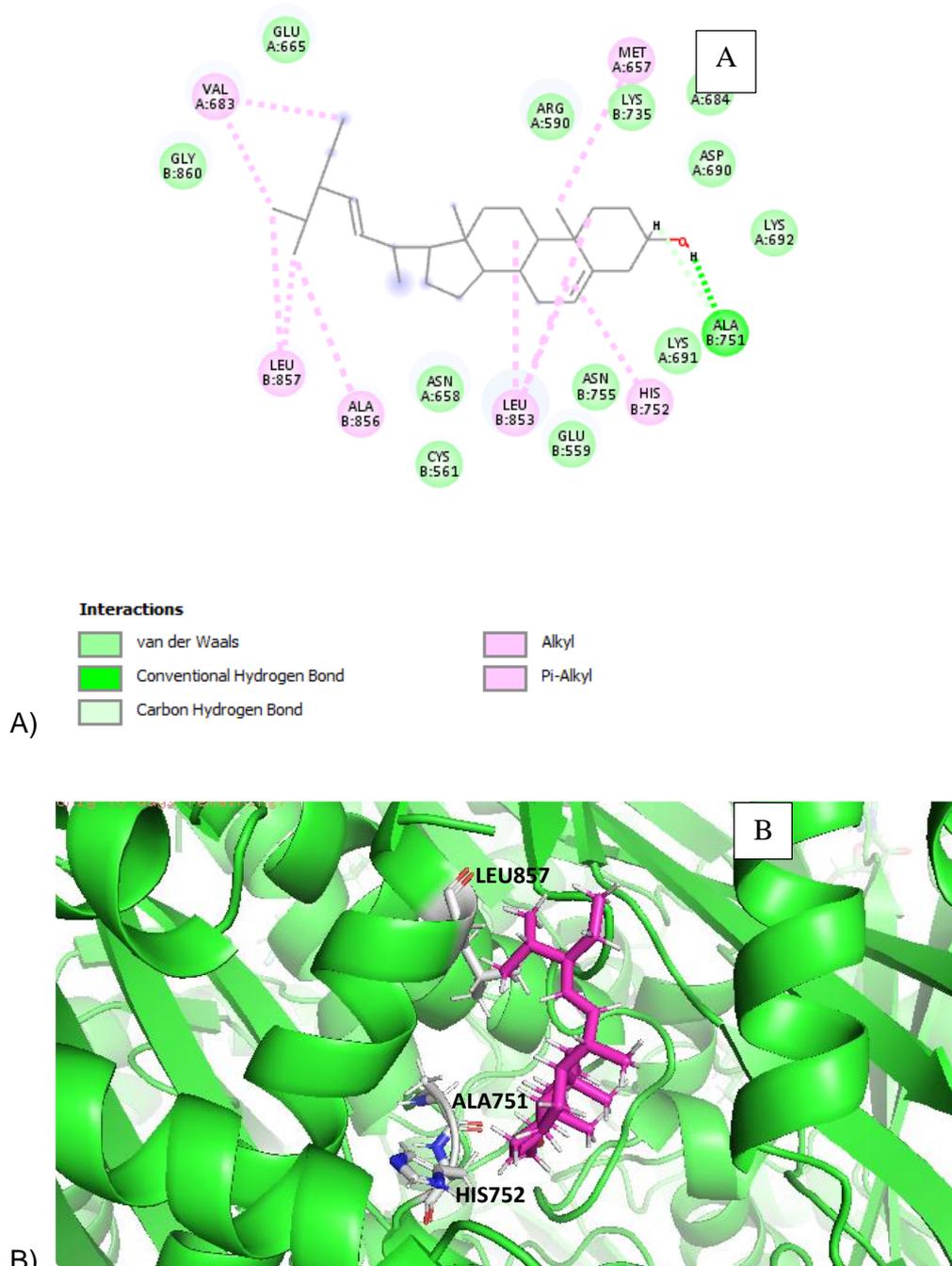


Figura 3- A) Representação bidimensional da pose 1 da ancoragem do estigmasterol dentro do sítio do receptor HMG-CoA redutase. B) Representação tridimensional.

DISCUSSÃO

O levantamento de metabólitos ativos da *Commiphora mukul*, com suas respectivas propriedades físico-químicas, classificação *druglikeness*, predição de toxicidade, predição de possível ação no sistema cardiovascular, além da análise dos alvos para realização do *docking* permitiu a escolha do estigmasterol como molécula para realização do *docking* molecular, apresentando melhor desempenho em todas essas análises, com maior potencial de interação com o receptor HMG-CoA redutase.

Todos os compostos da triagem realizada obedeceram aos parâmetros de Lipinski. Essa classificação é amplamente utilizada para determinar propriedades moleculares que são importantes para a predição farmacocinética das substâncias *in vivo*. De acordo com a regra dos cinco de Lipinski, em que se baseia essa classificação, uma molécula candidata a protótipo de fármacos é mais provável de possuir propriedades favoráveis se o peso molecular for abaixo de 500 (pequena), o coeficiente de partição octanol/água (log P) é inferior 5 (lipofílica), se não há mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio (grupos OH e NH) e se não existem 10 aceptores de ligação de hidrogênio (nomeadamente N e O) [18].

O estigmasterol se comportou neste estudo *in silico*, como um ligante na estrutura do receptor HMG-CoA redutase (1HWI), permitindo a inferência da possível ação hipocolesteremiante, de forma semelhante ao que foi demonstrado no *redocking* da fluvastatina, substância co-cristalizada com essa mesma ação.

O estigmasterol ocupou o sítio ativo da beta HMG-CoA redutase, possivelmente funcionando, portanto, como uma potencial substância capaz de inibir a síntese de colesterol e, portanto, capaz de regular os níveis de lipídeos aterogênicos do corpo (LDL e VLDL), e com base nos resultados *in silico* pode-se sugerir o aumento de HDL, sendo necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo*.

As doenças cardiovasculares têm se tornado um problema cada vez mais comum no cotidiano da população afetando milhões de pessoas e sendo responsáveis pelo alto índice de mortalidade e morbidade mundial. A dislipidemia, que se caracteriza como uma alteração metabólica lipídica e que resulta na alteração dos níveis séricos das lipoproteínas, é um importante fator

de risco cardiovascular. O tratamento da dislipidemia, atualmente, se faz de forma farmacológica e não farmacológica. Dentre as opções não farmacológicas, pode-se incluir uma dieta mais balanceada, a exclusão de ácidos graxos trans da dieta, o controle do peso corporal, a redução na ingestão de bebidas alcoólicas, a redução na ingestão de açúcares e carboidratos, a ingestão de alimentos com alto teor de ômega 3 (ricos em EPA e DHA), a prática diária de exercícios físicos e a cessação do tabagismo. Para o tratamento farmacológico, atualmente, existem algumas classes de fármacos que são bastante utilizadas, como: estatinas, ezetimiba, resinas e fibratos. Porém, em vários casos os tratamentos são descontinuados pelos pacientes devido ao alto índice de reações adversas que estes fármacos apresentam. O mais comum é a fraqueza muscular proveniente do tratamento com as estatinas [21].

Com isso, destaca-se o tratamento com os fitoterápicos, que possuem os ativos ou também chamados de compostos bioativos obtidos a partir de uma espécie vegetal conhecida. As vantagens deste tipo de tratamento é uma maior adesão do paciente, em diversos casos apresenta um melhor custo-benefício, não causa dependência ao paciente e a diminuição de efeitos adversos causados por fármacos sintéticos [22]. Por fim, é necessário destacar que a espécie *Commiphora mukul* abre novas perspectivas para o tratamento de dislipidemia, visto que a mesma se apresenta como uma espécie vegetal que oferece ao paciente bons resultados e não manifesta reações adversas quando administrada de maneira consciente e indicada pelo profissional de saúde.

CONCLUSÃO

Através dos estudos *in silico* realizados neste trabalho, conclui-se que o estigmasterol apresenta-se como uma molécula promissora pois a mesma é responsável pelo efeito hipocolesterolemiantes da espécie *Commiphora Mukul*. O *docking* do estigmasterol revelou ancoragem desta molécula no sítio ativo do receptor HMG-coA redutase e, portanto, responsável pela diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo.

REFERÊNCIAS:

- 1- Vaz D, Santos L, Vaz Carneiro A. Fatores de risco: conceitos e implicações práticas. Rev Port Cardiol. 2005; 24:121-31
- 2- BRASIL, ANVISA. ANVISA. Saúde e economia: Dislipidemia. 2011.
- 3- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R. E.; HARPER, J. L. Ecologia: de indivíduos a ecossistemas. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2007.
- 4- Bellamkonda R., Karuna R., Rao B., Haritha K., Manjunatha B., Silpa B., Saralakumari D. Beneficiary effect of Commiphora mukul ethanolic extract against high fructose diet induced abnormalities in carbohydrate and lipid metabolism in wistar rats. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 2018; 8: 203-211.
- 5- WORTH, A. et al. The Use of Computational Methods in the Toxicological Assessment of Chemicals in Food: Current Status and Future Prospects. Luxembourg: Joint Research Centre - European Union, 2011; 143.
- 6- Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. Nucleic Acid Res. 2019;47(D1):D1102-09. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 7-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(42717).
- 8-Banerjee P, Eckert AO, Schrey AK, Preissner R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. Nucleic Acid Res. 2018;46(2):W257–W263.
- 9-Banerjee P, Dehnbostel FO, Preissner R. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. Front Chem. 2018;6(362).

10-Drwal MN, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner R. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acid Res.* 2014;42W: 53-8.

11- Poroikov VV, Filimonov DA. How to acquire new biological activities in old compounds by computer prediction. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 2002;16(11):819–24.

12- Poroikov VV, Filimonov DA, Borodina YV, Lagunin AA, Kos A. Robustness of Biological Activity Spectra Predicting by Computer Program PASS for Noncongeneric Sets of Chemical Compounds. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2000;40(6):1349-55.

13- Sadyam A, Lagunin A, Filimonov D, Poroikov V. Prediction of Biological Activity Spectra via The Internet. *Journal SAR and QSAR in Environmental Research.* 2003;14(5-6):339-47.

14- Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, Daiana A, Michielin O, Zoete V, Swiss Target Prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res.* 42:32–38, 2014.

15- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res.* 2000;28(1):235-42. Available from: <https://www.rcsb.org/>

16- Cole JC, Nissink JWM, Taylor R. Protein-ligand Docking and Virtual Screening with GOLD in *Virtual Screening in Drug Discovery*; Shoichet B, Alvarez J, Eds.; Taylor & Francis CRC Press. 2005.

17- Korb O, Stützle T, Exner TE. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J Chem Inf Model.* 2009;49(1):84-96.

18- 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 Delivery Rev.* 1997;23: 4-25.

19- Istvan, E.S., Deisenhofer, J. Structural, mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 2001; 292: 1160-1164.

20- Istvan, E.S., Deisenhofer, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science.* 2001; 292: 1160-1164.

21- Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. 2. Ed, Vol 109.; 2017.

22 - Adame, A.; Jaccoud, C.V.; Cobra, E. A. Biodiversidade, biopirataria e aspectos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2005.