

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

ATALA MELISSA ARIÑO REZENDE

PREDIÇÃO COMPUTACIONAL DA INIBIÇÃO DA COX-2 POR METABÓLITOS
BIOATIVOS DA *CALENDULA OFFICINALIS L.*

GOIÂNIA

2025

ATALA MELISSA ARIÑO REZENDE

PREDIÇÃO COMPUTACIONAL DA INIBIÇÃO DA COX-2 POR METABÓLITOS
BIOATIVOS DA *CALENDULA OFFICINALIS L.*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Escola de Ciências Médicas e da Vida da Pontifícia
Universidade Católica de Goiás por Atala Melissa
Ariño Rezende como requisito para a graduação do
curso de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Barreto da Silva

GOIÂNIA

2025

Sumário

Resumo	04
Abstract	05
1. Introdução	06
2. Metodologia.....	07
3. Resultados e Discussão.....	08
4. Conclusão	11
5. Referências	12

Resumo

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima chave envolvida no processo inflamatório, amplamente reconhecida como um alvo terapêutico relevante na busca por novos agentes anti-inflamatórios. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial inibitório de três constituintes bioativos da *Calendula officinalis* L. sobre a COX-2, visando contribuir para a prospecção de inibidores naturais dessa enzima e reforçar a relevância da *Calendula officinalis* como fonte de moléculas bioativas. Para isso, analisaram-se complexos enzimáticos disponíveis no *Protein Data Bank* para a construção de modelos farmacofóricos, seguidos de simulações de docagem molecular com escopoletina, faradiol e taraxasterol, a fim de determinar suas afinidades de ligação com a proteína-alvo. Os resultados obtidos indicam que, dentre os marcadores avaliados, a escopoletina apresenta a maior afinidade de ligação, sugerindo a formação de um complexo mais estável com a COX-2. Conclui-se, portanto, que a escopoletina representa um potencial inibidor seletivo da COX-2, caracterizando-se como um fitoconstituente promissor no desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-inflamatória.

Palavras-chave: Anti-inflamatórios não esteroidais; Modelagem molecular; Fitoquímicos.

Abstract

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is a key enzyme involved in the inflammatory process and is widely recognized as a relevant therapeutic target in the search for new anti-inflammatory agents. This study aims to evaluate the inhibitory potential of three bioactive constituents of *Calendula officinalis* L. on COX-2, striving to contribute to the search for natural inhibitors of this enzyme and reinforce the relevance of *Calendula officinalis* as a source of bioactive molecules. To achieve this, enzyme complexes available in the Protein Data Bank were analyzed to build pharmacophoric models, followed by molecular docking simulations with scopoletin, faradiol and taraxasterol, in order to determine their binding affinities with the target protein. The results obtained indicate that, among the markers evaluated, scopoletin has the highest binding affinity, suggesting the formation of a more stable complex with COX-2. It is therefore concluded that scopoletin represents a potential selective inhibitor of COX-2 and is a promising phytoconstituent for the development of new drugs with anti-inflammatory activity.

Keywords: Non-steroidal anti-inflammatory drugs; Molecular modeling; Phytochemicals.

1. Introdução

A COX-2 é uma enzima indutiva da reação inflamatória, uma vez que converte seu substrato, ácido araquidônico, em prostaglandina H_2 , produto que é, posteriormente, metabolizado e convertido em outras prostaglandinas e tromboxano A_2 , substâncias mediadoras da resposta inflamatória ^[1, 2]. Nesse contexto, a inibição dessa enzima por moléculas bioativas, sintéticas e naturais ocorre devido a sua complexação com a proteína-alvo, e o efeito anti-inflamatório resultante está diretamente ligado à relação estrutura-atividade do composto complexado.

Para analisar o processo de complexação fármaco-receptor é necessária a elucidação estrutural, tanto da molécula bioativa como do sítio de ligação, exigindo a caracterização detalhada das estruturas de ambas as entidades químicas (molécula bioativa e alvo molecular), incluindo as distâncias entre seus grupos farmacofóricos e seus ângulos de ligação e torção ^[3].

Dentre as fontes naturais de moléculas bioativas com atividade anti-inflamatória, encontra-se a espécie vegetal *Calendula officinalis*, pertencente à família Asteraceae, conhecida popularmente, no Brasil, como calêndula e, internacionalmente, como *pot-marigold*. Trata-se de uma planta ornamental que possui uma série de propriedades medicinais relevantes, sendo aplicada em diversas práticas terapêuticas, incluindo as medicinas tradicionais ayurvédica, chinesa e europeia ^[4 - 6]. A espécie também integra a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (ReniSUS) e consta nas monografias das farmacopeias brasileira, europeia, alemã e canadense ^[7].

As propriedades anti-inflamatórias desse vegetal, descritas na literatura, são, em parte, atribuídas à presença de marcadores fitoquímicos como a escopoletina ^[8], o faradiol ^[9] e o taraxasterol ^[10, 11], ainda que seus mecanismos exatos de regulação da atividade inflamatória ainda não estejam bem definidos ^[10]. Evidências sugerem a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da enzima COX-2 como possíveis mecanismos de ação desses compostos ^[8 - 11]. No entanto, a partir dos achados de Salazar sobre a escopoletina ^[12], levanta-se a hipótese de que tais metabólitos também possam inibir diretamente a atividade da COX-2, representando uma possível rota adicional de ação anti-inflamatória para a espécie.

Diante disso, este trabalho propõe a predição do encaixe molecular destes três compostos à COX-2, por meio da modelagem molecular direta (*docking*), método de ancoragem da molécula bioativa ao sítio de ligação da proteína, utilizando parâmetros estruturais de complexos previamente elucidados por cristalografia por raios-X [3], uma vez que a estrutura do receptor enzimático já é conhecida.

2. Metodologia

As coordenadas atômicas dos complexos da COX-2 com o salicilato e os ácidos flufenâmico, mefenâmico e tolfenâmico (códigos PDB: 5F1A, 5IKV, 5IKR e 5IKT, respectivamente) foram, inicialmente, extraídas do *Protein Data Bank* [13] e o mapa 2D das interações intermoleculares de cada complexo, obtido através do programa *Discovery Studio Visualizer* v21.1.0.20298 [14]. Por outro lado, as características dos modelos farmacofóricos dos fármacos supracitados foram constatadas a partir das interações intermoleculares observadas nos seus respectivos complexos com a enzima COX-2, por meio do programa *Pharmit* [15], desconsiderando as moléculas de água do sítio ligante.

Com as informações estruturais obtidas, as simulações de docagem foram realizadas por meio do programa *DockThor* [16]. Inicialmente, realizou-se a redocagem do ligante cristalográfico do complexo de código PDB 5IKV e definiu-se como parâmetro de sucesso para a reprodução do modo de ligação cristalográfico o índice $RMSD \leq 3 \text{ \AA}$. Os parâmetros do algoritmo de busca definidos para a reprodução do modo de ligação cristalográfico do ácido flufenâmico incluíram: *number of evaluations*= 1.000.000; *populations size*= 750; *initial seed*= -1.985; *number of runs*= 24; *soft docking*.

Para delimitar o local de realização dos cálculos, definiu-se como centro do *grid* a hidroxila da cadeia lateral do resíduo de tirosina nº 385, considerando as coordenadas da estrutura proteica como referência (X: 161.7430, Y: 181.5590 e Z: 195.0280). A partir do *grid-center*, projetou-se um cubo com apótema de 15 Å, cobrindo o espaço ocupado por todos os resíduos que compõem a cavidade do sítio ligante da COX-2, e o parâmetro *discretization* foi definido em 0,25.

Posteriormente, empregando os mesmos parâmetros da etapa de redocagem, realizaram-se as simulações de docagem com as moléculas bioativas da *Calendula officinalis* L. (escopoletina, faradiol e taraxasterol), cujas estruturas químicas foram

modeladas através do programa *ACD/CHemSketch Freeware Version* ^[17], em formato mol. Para cada molécula, gerou-se um arquivo de entrada dos ligantes para realização da docagem, com coordenadas 3D, preparado por meio do programa *Discovery Studio* v21.1.0.20298 ^[14]. Já o arquivo de entrada da proteína foi o mesmo empregado na etapa de redocagem. O ponto de corte do RMSD para o agrupamento de conformações foi definido em 2, obtendo-se, ao final de cada simulação, apenas uma pose para cada ligante. Por fim, as imagens referentes ao posicionamento dos confôrmeros no sítio ligante enzimático foram construídas com o programa PyMOL 1.1r1 ^[18], e os mapas 2D, descrevendo as interações intermoleculares, com o programa *Discovery Studio* v21.1.0.20298 ^[14].

3. Resultados e Discussão

A complexação ideal entre a COX-2 e os seus inibidores envolve, majoritariamente, a presença de grupos farmacofóricos hidrofóbicos e aceptores de ligações de hidrogênio nos fármacos complexados ^[12] (fig. 1). Essas características se encontram tanto no Ácido Araquidônico, substrato da enzima, quanto nos complexos fármaco-enzima disponíveis na plataforma *Protein Data Bank* (tab. 1).

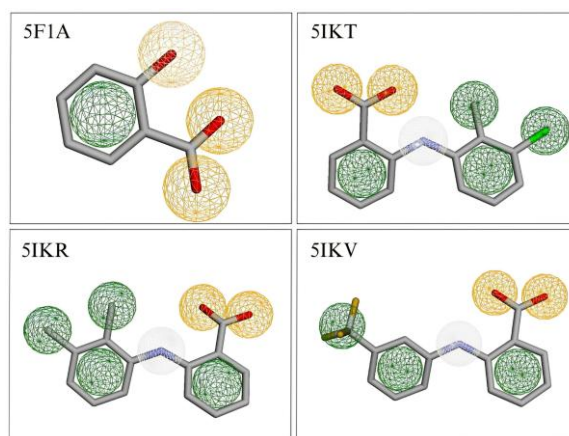


Fig. (1). Modelos farmacofóricos para ácido araquidônico, 5F1A, 5IKT, 5IKR e 5IKV, considerando características hidrofóbicas em verde e aceptores de ligações de hidrogênio em amarelo.

Código PDB	Molécula Complexada	Resolução das estruturas cristalográficas
5IKV	Ácido Flufenâmico	2.50 Å
5IKR	Ácido Mefenâmico	2.34 Å
5F1A	Ácido Salicílico	2.38 Å
5IKT	Ácido Tolfenâmico	2.45 Å

Tab. 1. Complexos entre anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e COX-2 apresentando uma resolução ≤ 2.5 Å.

O processo de reconhecimento das moléculas bioativas pelo sítio ativo da COX-2 é influenciado pelo posicionamento de aminoácidos capazes de realizar, principalmente, ligações de hidrogênio com os grupos aceptores presentes nos fármacos [3]. A disposição dos aminoácidos enzimáticos que apresentam maior interação com os fármacos mostra-se distribuída, especialmente com LEU384, VAL349 e TYR348 atuando por meio de contatos hidrofóbicos e TYR385 e SER530 através de ligações de hidrogênio [12] (fig. 2).

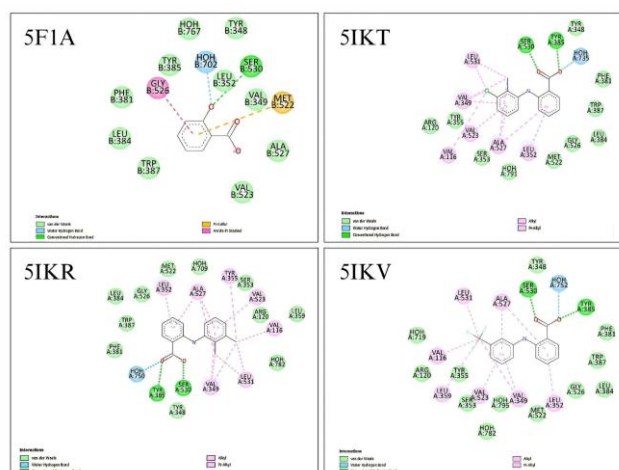


Fig. 2. Mapa 2D das interações entre COX-2 e os fármacos 5F1A, 5IKT, 5IKR e 5IKV.

Após a análise e reconhecimento das principais interações observadas pelos inibidores da COX-2, procedeu-se com a realização da docagem, que foi, inicialmente, validada por meio da reprodução do modo de ligação do ácido flufenâmico com a estrutura enzimática do complexo de código 5IKV. A conformação de menor RMSD

apresentou um desvio de 2,5 Å, ao ser comparada com sua respectiva conformação cristalográfica, demonstrando uma afinidade de ligação simulada de -9,043 kcal/mol.

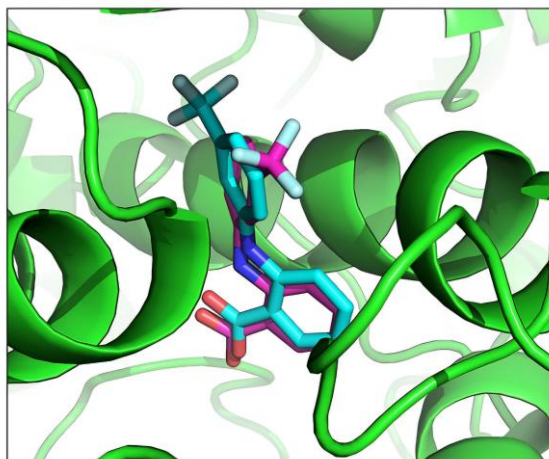


Fig. 3. Sobreposição da conformação cristalográfica do complexo 5IKV (átomos de carbono do fármaco em azul) e a pose de maior afinidade, obtida por meio de docagem (átomos de carbono do fármaco em rosa).

Posteriormente, procedeu-se com a realização das simulações de docagem com os fitoconstituintes da *Calendula officinallis* L. analisados como potenciais inibidores da COX-2 (fig. 4), cujos resultados indicaram que, dentre os três marcadores, a escopoletina (fig. 5) forma complexos mais estáveis com a enzima, apresentando um valor de afinidade simulada (-8,408 Kcal/mol) mais próximo ao obtidos para o ácido flufenâmico quando comparada ao faradiol e ao taraxasterol (Kd: -5,666 Kcal/mol e Kd: -5.814 Kcal/mol respectivamente). Assim, sugere-se que há maior espontaneidade na formação do complexo da escopoletina com a COX-2.

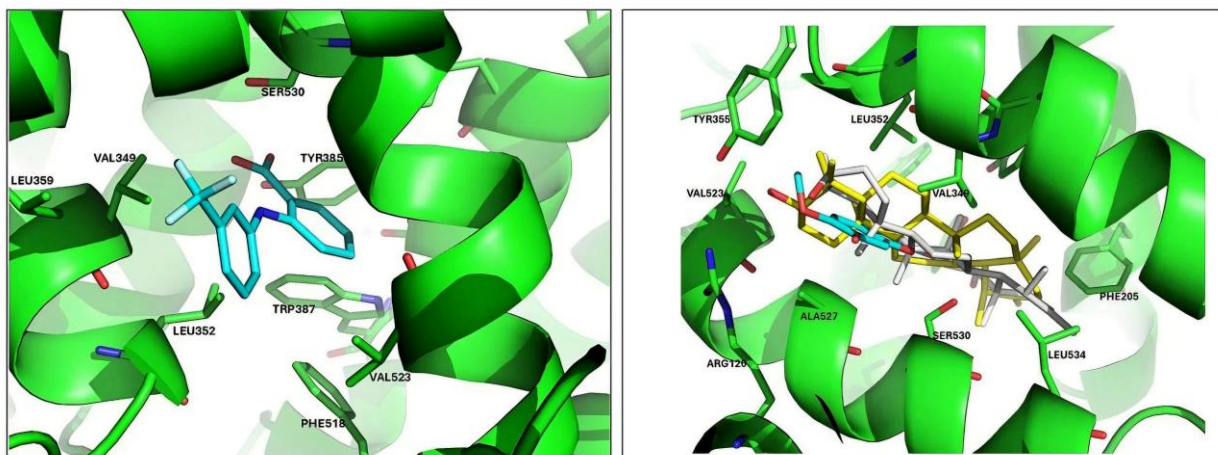


Fig. 4. Comparativo 3D entre o complexo 5IKV e a sobreposição dos modelos de ligação sugeridos para os marcadores escopoletina (carbonos em azul), faradiol (carbonos em branco), e taraxasterol (carbonos em amarelo)

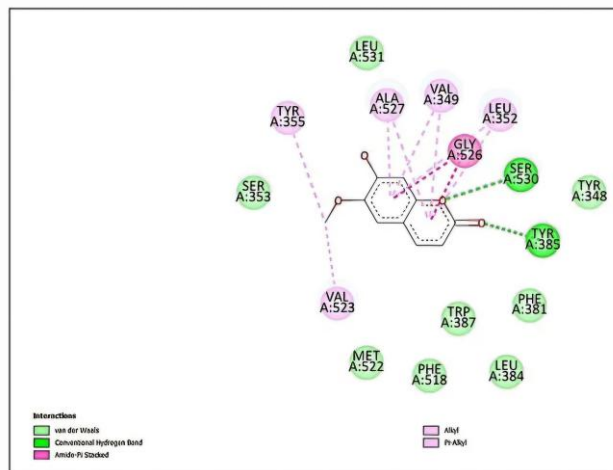


Fig. 5. Mapa 2D da interação entre COX-2 e escopoletina (Kd: - 8.408 Kcal/mol)

4. Conclusão

Os resultados obtidos nesta pesquisa reforçam o potencial anti-inflamatório da escopoletina como inibidor seletivo da COX-2, corroborando os resultados obtidos por Salazar ^[12], apontando-a como um fitoconstituente promissor para o desenvolvimento de fármacos com atividade anti-inflamatória. Embora os valores de afinidade obtidos para o faradiol e o taraxasterol sejam inferiores aos da escopoletina, tal limitação pode estar relacionada à rigidez estrutural do sítio ativo, considerada na simulação de docagem ^[16], não invalidando seus efeitos farmacológicos, previamente demonstrados ^[10, 19]. Assim, futuros estudos envolvendo simulações com receptores flexíveis, bem como análises dinâmicas e ensaios experimentais, são recomendados para elucidar, com maior precisão, o potencial de interação desses compostos com a COX-2. Portanto, este trabalho contribui para o avanço das investigações aplicadas à prospecção de inibidores naturais da COX-2, fortalecendo a relevância da *Calendula officinalis* como fonte de moléculas bioativas.

5. Referências

- [1] Oliveira MS. O papel da ciclooxygenase-2 e da prostaglandina E2 nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol. lumeufrgsbr [Internet]. 2007. Available from: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/8912>.
- [2] Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):986-1000. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207449.
- [3] Barreiro EJ, Rodrigues CR, Albuquerque MG, Sant'Anna CMR de, Alencastro RB de. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. *Quím Nova*. 1997;20(3):300-10. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000300011>
- [4] Arora R. The medicinal properties of *Calendula officinalis*. *Fitoterapia*. 2016; 114:1-11. doi: 10.1016/j.fitote.2016.02.008.
- [5] Muley BP, Khadabadi SS, Banarase NB. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Trop J Pharm Res*. 2009;8(5):455-465. Available from: <http://www.tjpr.org>
- [6] Sapkota B, Kunwar P. A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn. *Nat Prod Commun*. 2024;19(6):1934578X241259021. doi: 10.1177/1934578X241259021.
- [7] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Calendula Officinalis* L., Asteraceae (Calêndula) [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde; 2021.
- [8] Gao XY, Li XY, Zhang CY, Bai CY. Scopoletin: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity. *Front Pharmacol*. 2024; 15:1268464. doi: 10.3389/fphar.2024.1268464.

- [9] Shahane K, Kshirsagar M, Tambe S, Jain D, Rout S, Ferreira MKM, et al. An Updated Review on the Multifaceted Therapeutic Potential of *Calendula officinalis* L. *Pharmaceuticals*. 2023;16(4):611. doi: 10.3390/ph16040611.
- [10] Jiao F, Tan Z, Yu Z, Zhou B, Meng L, Shi X. The phytochemical and pharmacological profile of taraxasterol. *Front Pharmacol*. 2022; 13:927365. doi: 10.3389/fphar.2022.927365.
- [11] Xiong H, Li X, Zhang C, Yang J, Zhang Z, Xu S, Zhao X. Effects of taraxasterol on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2014;155(1):753-7. doi: 10.1016/j.jep.2014.06.023.
- [12] Salazar RE, Flores AG, Moreno MA. Análisis in silico de la escopoletina aislada de especies vegetales como agente analgésico inhibidor de Ciclooxygenasa-2. *Med Plant Commun*. 2022;12(1):1-9.
- [13] Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):235-242. doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- [14] Dassault Systèmes. Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298. Available from: <https://www.3ds.com>
- [15] Sunseri J, Koes DR. Pharmit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: W44211-W448.
- [16] Guedes I.A., Siqueira A.C., de Lima M.E., Dos Santos L.G., de Almeida R.F., de Melo M.N., et al. DockThor: a web server for docking small molecules into protein structures. *J Comput Chem*. 2024;45(2):456-465.
- [17] Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs). ChemSketch, version 2022.1. Toronto, ON, Canada. Available from: www.acdlabs.com
- [18] Schrödinger, LLC. PyMOL version 1.1r1. Available from: <https://www.pymol.org>
- [19] Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Isaac O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med*. 1994;60(6):516-20. doi: 10.1055/s-2006-959562.