

Sousa GA, Martins IVO, Pimentel VD, & Sousa JA. (2020). Análise *in silico* da farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade de dois compostos isolados da *Actinidia deliciosa* para investigação do seu potencial anti-hiperlipêmico. Research, Society and Development, 9(7): 1-20, e790974679.

Análise *in silico* da farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade de dois compostos isolados da *Actinidia deliciosa* para investigação do seu potencial anti-hiperlipêmico

***In silico* analysis of the pharmacodynamics, pharmacokinetics and toxicity of two compounds isolated from *Actinidia deliciosa* for investigation of their anti-hyperlipemic potential**

Análisis *in silico* de la farmacodinámica, farmacocinética y toxicidad de dos compuestos aislados de *Actinidia deliciosa* para la investigación de su potencial anti-hiperlipémico

Recebido: 19/05/2020 | Revisado: 22/05/2020 | Aceito: 29/05/2020 | Publicado: 14/06/2020

Glaydiane Alves de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0703-0360>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: glaydiane.alves@gmail.com

Ivis Vinicius de Oliveira Martins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3172-1826>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: ivisMartins17@outlook.com

Vinicius Duarte Pimentel

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3802-5452>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: viniciusduarttee@gmail.com

Joubert Aires Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3830-4988>

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

E-mail: airesjoubert3@gmail.com

Resumo

A presente pesquisa visou avaliar *in silico* a farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade dos ácidos siríngico e ursólico isolados da *Actinidia deliciosa* e analisar o mecanismo que fundamenta a sua atuação na redução do colesterol comparando-os com o fármaco

sinvastatina. Foi utilizado o servidor online PreADME para a avaliação do perfil farmacocinético e toxicológico por meio da estrutura-atividade molecular e o software AutodockVina para o estudo da farmacodinâmica e potencial farmacológico das interações moleculares. Os dados ADME obtidos para os ácidos siríngico e ursólico foram semelhantes aos da sinvastatina, na análise do docking molecular foi evidenciado que os resultados foram aproximados entre as moléculas testadas, contudo o ácido ursólico se sobrepôs com maior estabilidade de interação com o alvo biológico quando comparado a sinvastatina. Foi possível observar a partir dos resultados que os compostos avaliados são qualificados a posteriores ensaios *in vitro* e *in vivo* para um estudo mais aprofundado de sua ação anti-hiperlipêmica.

Palavras-chave: *Actinidia deliciosa*; Docking molecular; Análise *in silico*.

Abstract

The present research aimed to evaluate *in silico* the pharmacodynamics, pharmacokinetics and toxicity of syringic and ursolic acids isolated from *Actinidia deliciosa* and to analyze the mechanism that underlies its performance in cholesterol reduction comparing them with the drug simvastatin. The PreADME online server was used to evaluate the pharmacokinetic and toxicological profile through the molecular structure-activity and the AutodockVina software to study the pharmacodynamics and pharmacological potential of molecular interactions. The ADME data obtained for the syringic and ursolic acids were similar to those for simvastatin, in the analysis of the molecular docking it was evidenced that the results were approximate between the tested molecules, however the ursolic acid overlapped with greater interaction stability with the biological target when compared to simvastatin. It was possible to observe from the results that the evaluated compounds are qualified for subsequent *in vitro* and *in vivo* tests for a more in-depth study of their anti-hyperlipemic action.

Keywords: *Actinidia deliciosa*; Molecular docking; *In silico* analysis.

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar *in silico* la farmacodinámica, farmacocinética y toxicidad de los ácidos sirínico y ursólicos aislados de *Actinidia deliciosa* y analizar el mecanismo que subyace a su rendimiento en la reducción del colesterol comparándolos con el medicamento simvastatina. El servidor en línea PreADME se utilizó para evaluar el perfil farmacocinético y toxicológico a través de la actividad de estructura molecular y el software AutodockVina para estudiar la farmacodinámica y el potencial farmacológico de las interacciones moleculares. Los datos de ADME obtenidos para los

ácidos sirínico y ursólico fueron similares a los de la simvastatina, en el análisis del acoplamiento molecular se evidenció que los resultados fueron aproximados entre las moléculas probadas, sin embargo, el ácido ursólico se superpuso con una mayor estabilidad de interacción con el objetivo biológico cuando en comparación con la simvastatina. A partir de los resultados, fue posible observar que los compuestos evaluados están calificados para posteriores pruebas *in vitro* e *in vivo* para un estudio más profundo de su acción anti-hiperlipémica.

Palabras clave: *Actinidia deliciosa*; Acoplamiento molecular; Análisis *in silico*.

1. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são ocasionadas devido a uma alteração na função do sistema cardíaco, sendo este responsável, pelo transporte de oxigênio e nutrientes para que as células realizem suas funções adequadamente. As DCV são consideradas um grande problema de saúde pública em todo mundo em especial em grandes centros urbanos. Dentre as DCV destacam-se a doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, angina, doenças hipertensivas, dentre outras (Magalhães, et al., 2014).

Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, cerca de 300 mil indivíduos sofrem infarto do miocárdio, sendo que 30% desses indivíduos vêm a óbito. Dentre as doenças cardiovasculares, destaca-se a doença coronária arterial, sendo a mesma responsável por maior morbimortalidade no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca que os problemas cardiovasculares são mais prevalentes em países de baixa e média renda, sendo o tabagismo, dislipidemias, hipertensão e obesidade fatores que aumentam o risco de desenvolver essa patologia.

A doença aterosclerótica destaca-se por ser a patologia que provoca maior mortalidade na sociedade brasileira, sendo essa uma doença multifatorial, que envolve o acúmulo do colesterol e oxidação do mesmo no meio intracelular, gerando elevação da pressão média arterial e agregação plaquetária. A prevenção da arteriosclerose ocorre a princípio por meio da identificação e controle das hiperlipidemias associadas com o uso de hiperlipidêmicos (dentre estes as estatinas), bem como os fatores de riscos provenientes do estilo de vida inadequado, dieta rica em gordura, e sedentarismo (Markman, Rosa, & Koschtschak, 2010).

Conforme Xavier, et al., (2013), nas últimas décadas foi obtido notáveis progressos relacionados ao desenvolvimento de hipolipemiantes, com alto potencial para reduzir a

hipercolesterolemia, propiciando a obtenção de novas metas terapêuticas. Atualmente a terapêutica farmacológica para tratar a hipercolesterolemia, consiste basicamente nas classes farmacológicas resinas, fibratos, estatinas, ezetimiba, ácido nicotínico e utilização de ácido graxo ômega 3.

A 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A (HMGCoA) redutase é uma enzima importante para o estudo das dislipidemias, tendo em vista que a mesma é responsável pela regulação da velocidade de síntese do colesterol no fígado. As estatinas são uma classe farmacológica, que agem inibindo a ação dessa enzima, proporcionando uma redução nos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), dos triglicerídeos e o aumento dos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL). A sinvastatina é considerada um pró-fármaco, inibidor competitivo e reversível da HMG-CoA redutase, altamente prescrita para o tratamento da arteriosclerose (Markman, Rosa, & Koschtschak, 2010).

Atualmente a grande diversidade vegetal associada ao baixo custo na terapêutica são alguns facilitadores que impulsionam o uso de plantas medicinais no Brasil (Oliveira, Mezzomo, & Moraes, 2018). As plantas são a principal fonte de compostos fenólicos, vitamina E (α -tocoferol) e C (ascórbico), sendo estes os mais eficazes catalizadores de radicais livres no organismo. Grandes partes das frutas contem compostos benéficos a saúde como os tocoferóis, carotenóides, dentre outros. A ingestão dessas frutas pode ser essencial na redução de doenças crônicas, como as cardiovasculares e o câncer (Bursal, & Gulçin, 2011).

A *Actinidia deliciosa* (Kiwi) é um fruto de origem chinesa, atualmente cultivada em várias regiões. No Brasil é cultivado em São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, e nas serras do Espírito Santo (Lima, Sousa, Silva, Sousa, & Figueiredo, 2012). O kiwi é um fruto essencial para a nutrição humana, o mesmo é rico em fibras, potássio, ácido fólico, vitaminas, sendo a principal delas a vitamina c, e vários compostos fotoquímicos. Por ser uma fruta cítrica, contém antioxidantes que são importantes na diminuição da incidência de doenças degenerativas (câncer), cardiovasculares, inflamações e disfunções cerebrais (Gomes, Silva, Radeke, & Oshiroet, 2012).

Os flavonóides possuem ampla atividade terapêutica, em especial ação antioxidante. Dentre esses compostos se destacam no kiwi: o ácido siríngico, pirogalol, catecol, ácido cafeico, ácido ursólico, valina, ácido alágico, ácido gálico (Florentino, et al., 2009). O ácido siríngico e o ácido ursólico presentes na polpa da *Actinidia deliciosa* têm sido alvos de estudos por possuírem ação antioxidante, ao neutralizarem ação dos radicais livres.

A avaliação *in silico* é um método de simulação computacional que auxilia na escolha de compostos que acarretam bons resultados acerca das análises pré-clínica. Retrata um

avanço nas pesquisas que envolvem produção de novos fármacos, tendo em vista a capacidade de realizar a triagem destacando a viabilidade da molécula quanto a sua estrutura química e redução da necessidade de análises *in vitro* e *in vivo* (Oliveira, 2014; Šmelcerović, et al., 2017).

O objetivo desta pesquisa foi avaliar *in silico* a farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade dos ácidos siríngico e ursólico isolados da *Actinidia deliciosa* para analisar o mecanismo que fundamenta a sua atuação na redução do colesterol com o propósito de obter o potencial dessas substâncias como candidato ao desenvolvimento de novos fármacos.

2. Metodologia

No tocante a natureza deste trabalho, caracteriza-se como sendo uma pesquisa experimental, com finalidade quali-quantitativa e explicativa como preconiza Pereira et al. (2018) e, o qual se fundamenta em análises de alguns parâmetros por meio do uso de ferramentas *in silico* e softwares de Química Farmacêutica Medicinal disponíveis na plataforma web. Realizou-se levantamento bibliográfico através de bancos de dados LILACS - Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde, SciELO - Scientific Electronic Library Online e PubMed - National Library of Medicine and National Institute of Health para obtenção de informações sobre o uso popular do fruto, suas características fitoquímicas e os métodos de avaliação *in silico*.

Otimização da Estrutura Molecular

Antes da realização das análises *in silico* procedeu-se o desenho molecular e a otimização da estrutura tridimensional da sinvastatina, do ácido siríngico e do ácido ursólico, através do software ACD/ChemSketch versão 14.0, baseada em parâmetros da mecânica clássica (distância de ligação, ângulo de ligação e ângulo diedro). Após a otimização, as moléculas foram salvas em formato (.mol).

Análise Farmacocinética e Toxicológica *in silico*

A análise farmacocinética e toxicológica foi realizada pelo servidor online PreADMET que é mantido pela Universidade de Seu na Coreia do Sul e está disponível em (<https://preadmet.bmdrc.kr/>). O código fonte do arquivo .mol criado anteriormente foi

importado para a ferramenta PreADMET e realizou-se a predição *in silico* de diversos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos da sinvastatina, ácido siríngico e ácido ursólico com base na relação estrutura-atividade dessas moléculas com outras moléculas previamente pesquisadas e com seus resultados disponíveis em vários bancos de dados mundiais.

Preparação dos Alvos Moleculares

A enzima HMG-CoA redutase foi obtida através do Protein Data Bank (PDB), já ancorada a molécula da sinvastatina. Antes da realização do Docking computacional utilizou-se o software BIOVIA Discovery Studio versão 17.2.0 para remover moléculas de água, cofatores e o ligante complexado ao receptor e em seguida os alvos foram salvos em formato (.pdb). Ainda nesse mesmo programa o arquivo .mol dos ligantes testes foram convertidos em formato (.pdb).

Ancoragem Molecular

Inicialmente importou-se o ligante em formato .pdb no software AutoDockTools 1.5.6 onde foram detectadas ligações rotativas e definiu-se estas como rígidas e adicionaram-se hidrogênios polares e cargas de Gasteiger. E em seguida o ligante preparado foi salvo em formato (.pdbqt). Os alvos foram mantidos como flexíveis caracterizando o docking como semi-flexível, e foram também acrescentados de cargas de Gasteiger e hidrogênios polares, os hidrogênios não-polares foram removidos e os alvos salvos em (.pdbqt).

O volume do Grid de ancoragem foi definido em 40 pontos x 40 pontos x 40 pontos (dimensões X, Y e Z) para um espaço de 1 Å e o centro do grid de ancoragem foi definido na região que estava sendo ocupada pela sinvastatina que foi cristalizada ancorada ao alvo. As dimensões e coordenadas no plano cartesiano do grid em cada receptor foram utilizadas para gerar os arquivos de configuração do AutoDockVina. E por fim realizou-se o docking computacional da sinvastatina, ácido siríngico e ácido ursólico com a enzima HMG-CoA redutase.

Análise Estatística

As comparações entre a afinidade de interação da sinvastatina, ácido siríngico e ácido ursólico com HMG-CoA redutase, foram realizadas pelo software GraphPadPrism versão

7.00 através do Teste T para amostras não pareadas, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. Resultados e Discussão

As plantas medicinais são usadas há muito tempo por nossos antepassados e são conhecidas por terem um papel importante na cura e tratamento de algumas doenças. Elas são utilizadas como alimento e como remédio para tratar enfermidades desde as civilizações mais antigas promovendo cura e muitas vezes até a morte devido à falta de conhecimento acerca dos constituintes do vegetal (Tomazzoni, Negrelle, & Centa, 2006).

O kiwi, assim como outros vegetais é bastante consumido com a finalidade de promoção de cura, em especial para tratar disfunções do organismo que estão relacionados aos níveis de colesterol. O fruto possui como afirma Zhao, et, al. (2012) uma gama de polifenóis, alguns ácidos como o siríngico e o ursólico e carotenóides, ele também apresenta atividade antioxidante e agem bloqueando o estresse oxidativo *in vivo*.

Análises de parâmetros farmacocinéticos

PreADMET é um servidor online mantido pela universidade de Seul na Coréia do Sul, essa ferramenta é capaz de predizer diversos parâmetros farmacocinéticos de ADME (absorção, distribuição, metabolização e excreção), e também toxicológicos, através da relação estrutura-atividade de moléculas e fragmentos de moléculas já avaliadas e disponíveis em diversos bancos de dados mundiais. Tais ferramentas de análises *in silico* são importantes para o processo de descoberta de novos fármacos, uma vez que podem produzir resultados preliminares bastante importantes no processo de triagem de moléculas candidatas a fármaco (Quadro 1).

Quadro 1: ADME da Sinvastatina, Ácido Siríngico e Ácido Ursólico.

Método	Sinvastatina	Ácido Siríngico	Ácido Ursólico
BBB	1.14749	0.539779	8.00777
Caco2	29.7405	18.8327	21.8616
CYP_3A4_inhibition	Inibidor	Não	Inibidor
CYP_3A4_substrate	Substrato	Não	Substrato
HIA	96.564192	82.027960	95.996396
MDCK	0.0473019	29.7007	0.0451719
Pgp_inhibition	Inibidor	Não	Inibidor
Ligação de proteína plasmática	100.000000	69.775772	100.000000

Fonte: PREADMET, 2020.

As estatinas atuam por meio da inibição da enzima HMG-CoA redutase, uma enzima hepática que age transformando a coenzima A em mevalonato na primeira etapa da via de síntese de colesterol hepático (Silva, 2016). Dessa forma, devido às estatinas terem como alvo o sistema hepático, a sua penetração na barreira hematoencefálica (BBB) pode justificar efeitos colaterais no Sistema Nervoso central (SNC), assim quanto menor a quantidade desse fármaco atravessando a BBB, melhor será a segurança do mesmo. Dentre as três substâncias analisadas pode-se observar que o ácido ursólico foi o que apresentou maior penetração na BBB, caso essa substância seja cotada para o tratamento de dislipidemia, seria necessário avaliar posteriormente com mais detalhes a capacidade do mesmo de causar efeitos colaterais no SNC. A sinvastatina foi a segunda molécula com maior penetração na BBB, sabe-se que ela é um medicamento com segurança relativamente alta, porém não há evidências de efeitos colaterais no SNC. O ácido siríngico foi a molécula que obteve menor valor em relação a penetração na BBB, sendo este o mais seguro no que se refere aos efeitos colaterais no SNC.

Ao verificar parâmetros de absorção dos fármacos, foi avaliada a permeabilidade em células epiteliais Caco-2 (derivadas do adenocarcinoma do cólon humano). Segundo Sousa, Freitas, & Storpirtis, (2007), no decorrer dos anos as células Caco-2 vem sendo amplamente empregadas nos ensaios de análises de absorção e permeabilidade de fármacos, sendo que esse modelo ajuda na identificação de moléculas com potenciais terapêuticos. O mesmo possibilita prever a sua capacidade de absorção *in vivo*, que é fundamental para as triagens de moléculas em estudos pré-clínicos. Ao que se refere ao parâmetro descrito no quadro 1 do modelo de células Caco-2, observou-se que a sinvastatina mostrou maior permeabilidade quando comparado com as duas moléculas testes, porém os resultados de absorção nesse tipo de célula para o ácido siríngico e o ácido ursólico foram aproximados ao da sinvastatina.

Analogamente, para fazer uma correlação com os resultados do modelo Caco-2 obtidos na análise *in silico*, foi realizado o teste de excreção em células MDCK, um parâmetro que mede a taxa de excreção dos fármacos que usa um modelo de células do rim canino. Quando cultivado em membranas semipermeáveis, essas células diferenciam-se em epiteliais colunares apresentando junções o que as caracterizam como semelhante às células Caco-2 (Chong, Dando, & Morrison, 1997). De acordo com os resultados do quadro 1, houve uma variação em relação aos resultados obtidos na análise *in silico* entre os compostos fenólicos testes e o fármaco utilizado na terapêutica, a sinvastatina. Quanto maior for o valor do MDCK, melhor será a taxa de eliminação do fármaco. Dessa forma, observou-se que nesse parâmetro o ácido siríngico obteve resultado relevante, adquirindo melhor capacidade de excreção em relação a sinvastatina e ao ácido ursólico.

Um fator essencial na etapa de desenvolvimento de novos fármacos é a capacidade inibitória enzimática que a molécula apresenta. Assim, o citocromo P450, complexo enzimático de grande importância no metabolismo, apresenta várias subfamílias, nesse contexto, merecendo destaque o CYP3A4, que é caracterizado como um dos principais citocromos na metabolização de drogas no ser humano, sendo encontrado no trato gastrointestinal e no fígado, onde é responsável pela diminuição da biodisponibilidade de algumas drogas (Devlin, 2002). O resultado obtido na análise nos permite propor que o fármaco (sinvastatina) e o ácido ursólico possuem capacidade de inibição e funcionam como substrato enzimático da subfamília CYP3A4, podendo influenciar no metabolismo de outras drogas que possam ser utilizadas concomitantemente com eles, já o ácido siríngico não é substrato do CYP3A4 e não possui atividade inibitória, ou seja, esta substância possui menos interações farmacológicas quando comparado as demais aqui analisadas.

Segundo Polli, Crison, & Amidon, (1996), o processo de dissolução e de permeação no intestino pode apresentar fatores que limitam o processo de absorção nas formas farmacêuticas de uso oral. É no duodeno e na parte proximal do jejuno onde ocorre grande parte da absorção dos fármacos no trato gastrointestinal, a mucosa do TGI é composta por epitélio colunar simples, com uma membrana proeminente vascularizada, que possui pregas, microvilosidades e depressões para promover a absorção. No quadro 1 é possível observar que ambos os compostos testados apresentaram valores de HIA (Absorção Intestinal Humana) bem próximos ao da sinvastatina, apresentando absorção semelhante.

A Pgp (Glicoproteína – P), está presente em grande parte nas células epiteliais, que revestem o intestino delgado, hepatócitos, colón, glândula renal dentre outras estruturas, a mesma é caracterizada por ser um dos pontos seletivos para a entrada de xenobióticos nos tecidos, e tem uma função fundamental na excreção, auxiliando na eliminação de fármacos, promovendo redução da biodisponibilidade de variáveis moléculas (Amin, 2013; Ashoraj, Dey, Panchagnula, & Varma, 2003). Assim, ao avaliar o resultado sobre a Pgp, o ácido ursólico apresentou-se inibitório sobre essa proteína, como ocorre com a sinvastatina, onde há inibição da proteína e bloqueio do efluxo do fármaco após sua absorção. O ácido siríngico não apresentou atividade inibitória sobre a proteína de efluxo (pgp), o que implica dizer que haveria uma redução da biodisponibilidade da mesma, e seriam necessárias doses mais altas dessa substância para efetivação de sua atuação farmacológica, pois ela seria excretada de volta a luz intestinal após sua absorção pelas células epiteliais.

Outro fator analisado foi a ligação dos compostos a proteínas plasmáticas, descritos no quadro 1. De acordo com Santos, Daniel, Próspero, & Costa, (2018), quanto maior for a

quantidade de fármacos ligados a proteínas plasmáticas, maior será a capacidade do mesmo permanecer ligado na forma de reserva. De forma geral o ácido ursólico e a sinvastatina apresentaram 100% de ligação com proteínas plasmáticas, ou seja, a biodisponibilidade do fármaco é reduzida. O ácido siríngico apontou menor ligação com as proteínas plasmáticas, indicando que ele possui fração livre maior quando comparado a sinvastatina e o ácido ursólico e, portanto, melhor biodisponibilidade.

Análises de parâmetros toxicológicos

Os parâmetros toxicológicos avaliados para o fármaco controle e as moléculas testes provêm de avaliações *in silico* que simulam o contato destas moléculas com tecidos biológicos de diferentes espécies de seres vivos em ordem evolutiva, sendo constituído pelo teste de Ames, carcinogenicidade em roedores, interações com genes do tipo hERG que codificam canais iônicos em células cardíacas e parâmetros de toxicidade em organismos marinhos.

Quadro 2: Análise de Parâmetros Toxicológicos.

Métodos	Sinvastatina	Ácido Siríngico	Ácido Ursólico
TA100 (- S9)	Negativo	Negativo	Negativo
TA100 (+ S9)	Negativo	Negativo	Negativo
TA1535 (- S9)	Negativo	Positivo	Negativo
TA1535 (+ S9)	Negativo	Negativo	Negativo
Carcinogenicidade_Rato	Positivo	Positivo	Positivo
Carcinogenicidade_Camundongo	Positivo	Negativo	Positivo
Inibição_hERG	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco
Algae_at	0.00912522	0.0762153	0.00162087
daphnia_at	0.0171603	0.660163	0.00932035
medaka_at	0.000562335	0.523704	0.000166336
minnow_at	0.00113113	0.298169	3.50478e-005

Fonte: PREADMET, 2020.

As mutações acarretam grandes propensões por estarem concernentes a patologias degenerativas como, por exemplo, o câncer. O teste de Ames é um ensaio bacteriano em curto prazo bastante utilizado para a avaliação de mutágenos, através dele faz-se uso de estirpes da bactéria *Salmonella typhimurium* (TA100 e TA1535) com alterações nos genes que estão diretamente relacionados à produção da histidina para a averiguação prévia da capacidade das substâncias causarem modificações genéticas nas bactérias e provocar seu crescimento em meio com ausência de histidina (Benfenati, 2016; Dolabela, et al., 2018; Efinger, O'Driscoll, McAllister, & Fotaki, 2018).

Como evidenciado por Calixto, (2012) o teste com as cepas identifica agentes que podem causar alterações mutagênicas, elas podem ser avaliadas na presença ou na ausência da fração S9, essa fração está relacionada à metabolização de substâncias, são compostas por frações hepáticas microsossomais e citosólicas, e simulam as características dos metabólitos produzidos. A cepa TA100 constata a capacidade de a substância causar substituições de codificação genética no par guanina-citosina e a cepa TA1535 detecta substâncias que podem ocasionar a indução de metilação e substituição de pares de bases guanina-citosina (Grandis, 2016). Foi possível verificar através do teste de Ames que a sinvastatina e o ácido ursólico não apresentaram predição à mutagenicidade nas cepas, enquanto que o ácido siríngico, por sua vez, apresentou predição à mutagenicidade na cepa TA1535_10RLI (- S9) sugerindo que a molécula é mutagênica, no entanto após sua metabolização ela deixa de ser mutagênica. Porém esse resultado por si só não é definitivo, mesmo sendo um dos testes mais sensíveis que existem atualmente para essa avaliação, é necessária a realização de outros métodos para a validação dos resultados obtidos por meio do teste de Ames.

A predição *in silico* no servidor PreADMET possibilita maior agilidade na análise, uma vez que seu algoritmo é relacionado a dados do National Toxicology Program e do FDA, o que lhe propõe resultados confiáveis do potencial carcinogênico (Jónsdóttir; Jørgensen, & Brunak, 2005; Benfenati, 2016; Efinger, O'Driscoll, McAllister, & Fotaki, 2018). No teste de predição a carcinogenicidade em camundongos o ácido siríngico manteve-se negativo o que lhe confere menor toxicidade, enquanto a sinvastatina e o ácido ursólico apresentaram resultados positivos, já na predição da carcinogenicidade em ratos todas as moléculas estudadas obtiveram resultados positivos.

A avaliação da capacidade inibitória das moléculas testadas *in silico* no gene *herg*, que por sua vez, está relacionado com a codificação da subunidade α do canal de potássio voltagem dependente do miócito cardíaco, obteve resultados de baixo risco. Essa avaliação é de suma importância, pois a inibição do *herg* faz com que haja aumento do tempo de repolarização, que conseqüentemente eleva o potencial de ação e o intervalo QT podendo causar arritmias cardíacas (Jing, Easter, Peters, Kim, & Enydy, 2015).

Em relação aos parâmetros de toxicidade em organismos marinhos, os dados foram adquiridos por meio de séries de propriedades químicas com análise das redes neurais de toxicidade aguda aquática. No tocante a avaliação desses parâmetros, quanto menor for a concentração da molécula com habilidade de provocar inibição do crescimento, maior será o potencial tóxico. Diante dos dados expostos, constatou-se que houve aumento nos números atingidos nos teste em algas e em *Daphniasp.* para o ácido siríngico quando comparado a

sinvastatina o que caracteriza uma melhora considerável (Costa, Olivi, Botta, & Espindola, 2008; Melkinov, Kostal, Voutchkova-Kostal, Zimmerman, & Anastas, 2016; Dolabela, et al., 2018).

Análise da farmacodinâmica e docking molecular

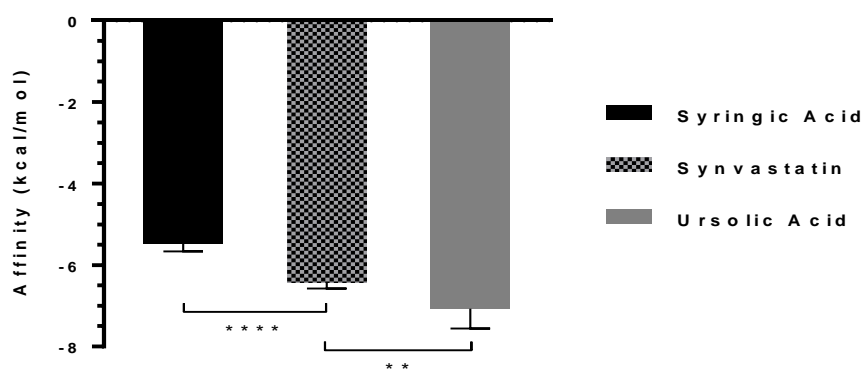
O docking molecular é um método computacional realizado através de um software de simulação de modelagem molecular, uma ferramenta computacional ágil e eficiente para avaliar e prever a capacidade de duas moléculas interagirem, ele é bastante eficiente para ser utilizado em pesquisas de acoplamento molecular. O desígnio do software de junção molecular é obter a predição da atividade molecular no que diz respeito a sua estrutura, afinidade e as formas de interação com seu alvo biológico, onde haverá formação do complexo (Forli, et al., 2016).

Estes métodos computacionais são utilizados para análise de macromoléculas biológicas e possuem extrema importância para acompanhamento da atividade das proteínas. Uma pesquisa de ancoragem inicia-se com o estabelecimento do sítio de ligação, ou seja, o local da proteína que haverá a interação, os resultados das tentativas de encaixe são analisados e uma lista classificatória das poses de interação é originada e fornecida para serem averiguados (Alonso, Blisnyuk, & Gready, 2006; Seeliger, & Groot, 2010).

De acordo com Quiroga, & Villarreal (2016) o AutodockVina, bastante empregado na triagem virtual, é um programa proveniente do Autodock 4, ele dispõe de função de pontuação, algoritmo de otimização global eficiente e precisão acentuada, além de realizar cálculos paralelos utilizando vários núcleos em uma máquina para acelerar o cálculo. Através do AutodockVina foi avaliada a conformação espacial de cada molécula testada (ligantes) para identificação da conformação mais viável ao acoplamento com o alvo biológico.

Acordante ao exposto por Smith, Van Ness & Abbott (2007) cada conformação emite energia livre de ligação, essa energia é calculada através das interações não covalentes entre os grupos funcionais das moléculas testadas e no acoplamento com o alvo, onde é formado um complexo que quanto menor for a energia de ligação, maior será a sua estabilidade. A variação da energia livre está associada à espontaneidade de um processo, os elementos de evolução temporal dos complexos moleculares são essenciais para os cálculos de energias livres para que se obtenham as mais variadas conformações que o complexo possa aderir. Diante do exposto, foi adquirida por meio de análise computacional a estatística dos valores de energia de ligação como evidenciado no Gráfico 1.

Gráfico 1: Comparação entre a Afinidade de Interação de Ácido Siríntrico, Ácido Ursólico e Sinvastatina com a Enzima HMG-CoA Redutase.

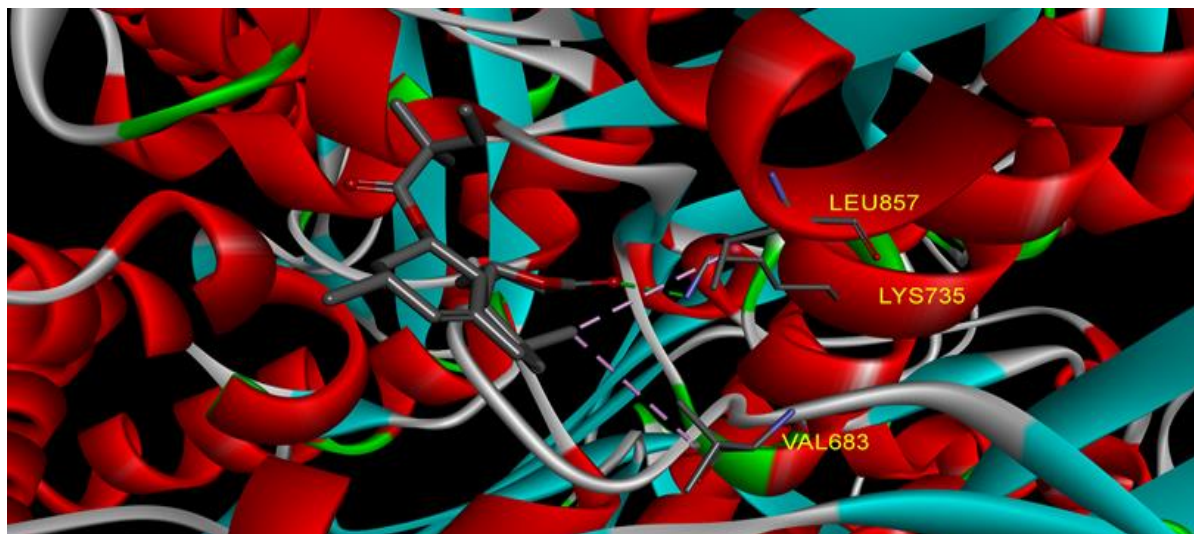


Fonte: Autores, 2020.

Pode-se observar no Gráfico 1, que comparando-se a afinidade da sinvastatina pela HMG-CoA redutase em relação ao ácido siríntrico, houve uma afinidade maior da sinvastatina, uma vez que esta possuiu uma menor energia de ligação, sendo esta variação entre as duas substâncias estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Na comparação da afinidade da sinvastatina, pela enzima alvo, com o ácido ursólico observou-se, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), uma maior afinidade de interação do ácido ursólico.

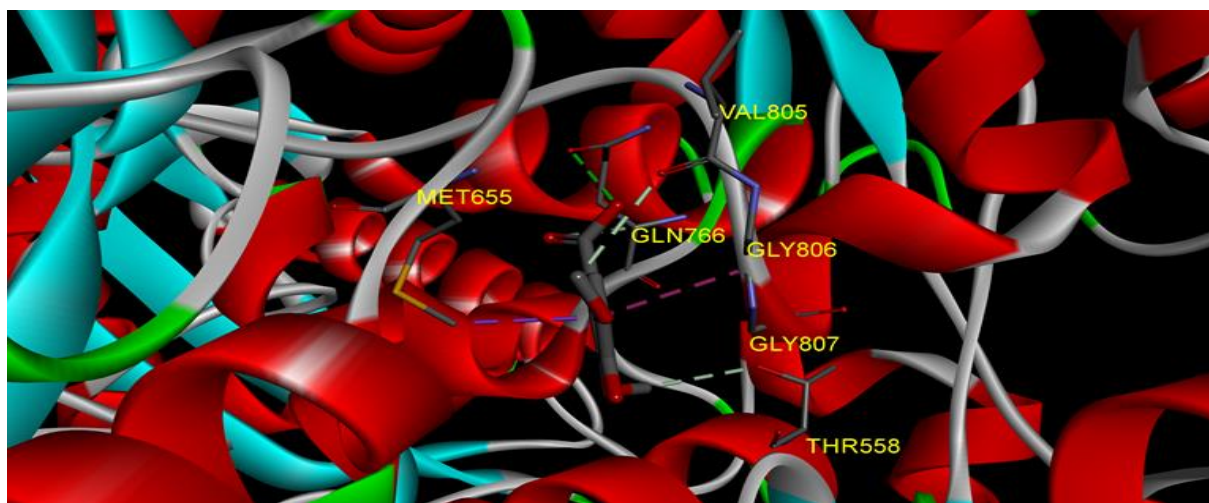
O estudo da predição do potencial farmacológico da interação entre as moléculas testadas e o alvo biológico foi baseado em avaliação *in silico* através do docking molecular, ilustrado nas Figuras 1, 2 e 3.

Figura 1: Complexo *ligante-proteína alvo* formado pela sinvastatina e HMG-CoA redutase e suas interações com os aminoácidos.



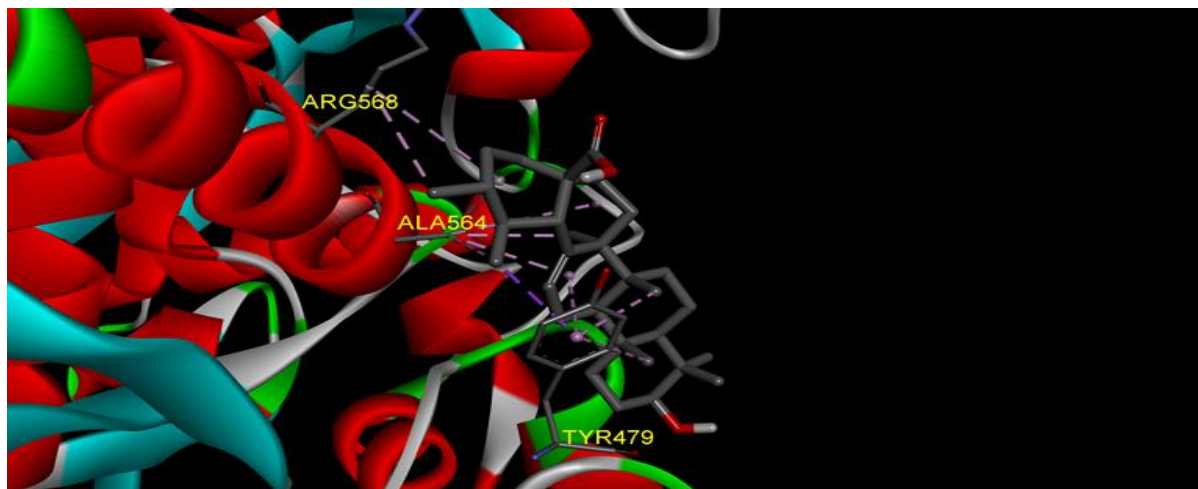
Fonte: Discovery Studio, 2020.

Figura 2: Complexo *ligante-proteína alvo* formado pelo ácido siríngico e HMG-CoA redutase e suas interações com os aminoácidos.



Fonte: Discovery Studio, 2020.

Figura 3: Complexo *ligante-proteína alvo* formado pelo ácido ursólico e HMG-CoA redutase e suas interações com os aminoácidos.



Fonte: Discovery Studio, 2020.

Conforme a observação da Figura 1 foi identificada a participação de três aminoácidos na interação da sinvastatina com sítio ativo, a leucina (857), lisina (735) e a valina (683). Desses três aminoácidos presentes na interação da sinvastatina, observou-se que na interação do ácido siríngico com seu alvo (Figura 2) um deles repetiu-se, o que implica dizer que as moléculas interagem no mesmo sítio ativo da HMG-CoA redutase. Já de acordo com o visualizado na Figura 3, na interação do ácido ursólico com os aminoácidos não houve repetição dos mesmos quando comparado à sinvastatina e ao ácido siríngico, isso significa que as interações ocorreram em locais diferentes na enzima.

4. Considerações Finais

O presente trabalho nos possibilitou por meio das predições realizadas, sugerir que os compostos fenólicos (ácido ursólico e ácido siríngico) por meios das simulações apresentaram parâmetros farmacocinéticos favoráveis ao uso, bem como poucos efeitos colaterais e baixos riscos toxicológicos quando comparados ao medicamento sinvastatina, que está presente no mercado.

Também, os dados obtidos por meio do docking molecular na HMG-CoA redutase demonstraram que houve formação do complexo das estruturas químicas do ácido ursólico e ácido siríngico no mesmo alvo terapêutico da sinvastatina e em sítios diferentes, com alguns aminoácidos semelhantes na formação do complexo enzimático entre ambos, sendo que o

ácido ursólico apresentou estabilidade de interação com o alvo biológico maior que a sinvastatina.

Por conseguinte, o ácido ursólico e o ácido siríngico, são substâncias qualificadas para a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo*, para uma avaliação mais aprofundada do potencial toxicológico e terapêutico no tratamento das dislipidemias. Da mesma forma, são necessárias maiores investigações para confirmar os diferentes tipos de interações moleculares bem como os mecanismos de ação referentes aos efeitos benéficos dos ácidos siríngico e ursólico como possíveis agentes anti-hiperlipêmico.

Referências

Alonso, H., blisnyuk, A. A., & Gready, E (2006). Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 26, No. 5, 531-568.

Amin, L (2013). P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Targets Insights*, 7, pp. 27-34.

Ashoraj, Y., Dey, C. S., Panchagnula, R., & Varma, M. V. S (2003). P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol RES*, 48 (4), pp. 347-359.

Benfenati, E. (Ed.). (2016). *In silico* methods for predicting drug toxicity. Humana Press.

Bursal, E., & Gulçin (2011). I. Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International* 44. Pag: 1482-1489.

Calixto, L. A. Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos: aplicações de estudo de metabolismo *in vitro*. 2012. 148f. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Chong, S., Dando, S., & Morrison, R (1997). Evaluation of Biocoat intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharm. Res.*, v.14, p.1835-1837.

Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M., & Espindola, E. L. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), 1820-1830.

Devlin, T. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*, Tradução da sexta edição americana, Editora Blucher, 2002.

Dolabela, M. F., Silva, A. R. P. D., Ohashi, L. H., Bastos, M. L. C., Silva, M. C. M. D., & Vale, V. V. (2018). Estudo in silico das atividades de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson.

Efinger, A., O'Driscoll, C.M., McAllister, M., & Fotaki, N (2018). Previsão ADME In vitro e *In silico*. Em A. Talevi, e PA Quiroga (Eds.), *Processos ADME em Ciências Farmacêuticas: Dosagem, Design e Farmacoterapia Sucesso* Springer.

Florentino, A., Dabroca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Scognamiglio, M., & Monaco, P (2009). Identification and assessment of the oxidant capacity of phytochemicals from kiwi fruits. *J Agric Food Chem*. Maio.

Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., Olson, A. J (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature protocols* VOL.11 NO.5 905.

Gomes, A. P. E., Silva, K. E. da., Radeke, S. M., & Oshiro, A. M. (2012). Caracterização física e química de kiwi in natura e polpa provenientes da comercialização de Dourados - MS. *Revista de Ciências exatas e da Terra*, v. 1, n. 1.

Grandis, R. A. Avaliação da atividade mutagênica de complexos heteroléticos de Rutênio (II) com atividade anti - *Mycobacterium tuberculosis*. p. 36-37. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Araraquara, São Paulo, 2016.

Jing, Y., Easter, A., Peters, D., Kim, N., & Enydy I. J. (2015). *In silico* prediction of hERG inhibition. *Future medicinal chemistry*, v. 7, n. 5, p. 571-586.

Jónsdóttir, S. Ó., Jørgensen, F. S., & Brunak, S. (2005). Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. *Bioinformatics*, 21(10), 2145-2160.

Lima, A. K. V. de, Sousa, C. F. de., Silva, L. M. de M., Sousa, E. P. de S., & Figueiredo, R. M. F. de (2012). Comparação dos parâmetros físico-químicos de polpas de kiwi com sementes e sem sementes. *Rev. Verde de Agroec. e Desen. Sust.*, Mossoró, RN, v. 7, n. 1, p. 01 – 03, jan./mar.

Magalhães, F. J., Mendonça, L. B. de A., Rebouças, C. B. de A., Lima, F. E. T., Custódio, I. L., & Oliveira, S. C (2014). Fatores de risco para doenças cardiovasculares em profissionais de enfermagem: estratégias de promoção da saúde. *Revista brasileira de enfermagem (Reben)*. Vol. 67. No.3. pag: 394-400. Maio-junho.

Markman, B. E. O., Rosa, P. C. P., & Koschtschak, M. R. W (2010). Avaliação da qualidade de cápsulas de sinvastatina de farmácias magistrais. *Revista publica de saúde. São Paulo*. Vol. 44. No. 6.

Melnikov, F., Kostal, J., Voutchkova-Kostal, A., Zimmerman, J. B., & Anastas, P. T. (2016). Assessment of predictive models for estimating the acute aquatic toxicity of organic chemicals. *Green Chemistry*, 18(16), 4432-4445.

Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual de Saúde. Dia Mundial do Coração: seja um herói do coração. 2019. Disponível em: <https://bvsm.sau.gov.br/ultimas-noticias/3039-29-9-dia-mundial-do-coracao-seja-um-heroi-do-coracao>. Acessado em: 20-01-2020.

Oliveira, M. L. G (2014). Avaliação *in silico* do potencial farmacológico e toxicológico de friedelanos, lupanos e derivados. UFMG-ICEX/DQ 1045ª T. 474ª.

Oliveira, V. B. de., Mezzomo, T. G., & Moraes, E. F. (2018). Conhecimento e Uso de Plantas Medicinais por Usuários de Unidades Básicas de Saúde na Região de Colombo, PR. Parana.

Revista Brasileira de Ciências da Saúde. Vol.22. N.1. Pag:57-64. Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Doenças cardiovasculares (2017). Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencascardiovasculares&Itemid=1096. Acessado em: 27-02-2020.

Pereira AS et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Polli, J. E., Crison, J. R., & Amidon, G. L. (1996). Novel approach to the analysis of in vitro-in vivo relationships. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, p. 753-761.

Quiroga, R., & Villarreal, M. A (2016). Vina: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening. PLOS ONE DOI:10.1371/journal.pone.0155183 May 12.

Santos, R. da C., Daniel, I. C., Próspero, D. F. A., & Costa, L. S. da (2018). Modificação molecular incremental: análise de parâmetros físicoquímicos, farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* de fármacos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs). Teresina. Boletim Informativo Geum v. 9, n. 2, p. 31-38, abr./jun.

Seeliger, D., & Groot, B. L (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL. *J Comput Aided Mol Des* 24:417–422 DOI 10.1007/s10822-010-9352-6.AndAutodock/Vina.

Silva, H. L., Oliveira, N. V. B. de, Soler, O (2016). Análise de metanálises e ensaios clínicos relativos à utilização de estatinas em doenças cardiovasculares. *Rev Pan-Amaz Saude* 2016; 7(4):107-119.

Šmelcerovic, A., Tomovic, K., Šmelcerovic, Ž., Petronijevic, Ž., Kocik, G., Tomasic, T., Jakopin, Z., & Anderluh, M. (2017). Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on in silico calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *European journal of medicinal chemistry*, 135, 491-516.

Smith, J. M., Van Ness, H. C., & Abbott, M. M. (2007). Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química, 7ª edição. LTC, Rio de Janeiro, 200.

Sousa, J. de., Freitas, Z. M. F., & Storpirtis, S (2007). Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. vol. 43, n. 4, out./dez.

Tomazzoni, M. I., Negrelle, R. R. B., & Centa, M. de L (2006). Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. Revistas Científicas da America y el Caribe y Portugal.

Xavier, H. T., Izar, M. C., Faria, N. J. R., Assah, M. H., Rocha, V. Z., Sposito, A. C., Fonseca, F. A. dos S. J. E., Santos, R. D., Bertolami, M. C., Faludi, A. A., Martinez, T. L. R., Diamant, J., Guimarães., Forti, N. A., Moriguchi, E., Chagas, A. C. P., Coelho, O. R., & Ramires, J. A. F. V. (2013). Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arquivo Brasileiro de Cardiologia. São Paulo. Vol. 101. no. 4. Outubro.

Zhao, X. Z., Li, X. W., Jin, Y. R., Yu, X. F., Qu, S. C., & Sui, D. Y (2012). Molecular Medicine Reports. China. Hypolipidemic effects of kaempferide-7-O-(4"-O-acetylramnosyl)-3-O-rutinoside in hyperlipidemic rats induced by a high-fat diet. Dezembro.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Glaydiane Alves de Sousa – 30%

Ivis Vinicius de Oliveira Martins – 30%

Vinicius Duarte Pimentel – 20%

Joubert Aires Sousa – 20%