



SELEÇÃO SISTEMÁTICA DE LIMONÓIDES DE *CARAPA GUIANESIS* AUBLET COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ATRAVÉS DE TÉCNICAS *IN SILICO* PARA USO TÓPICO

Raimundo Nonato da Silva Barbora Júnior ¹

André Silva dos Reis ²

Eloisa Helena de Aguir Andrade ³

José Rogério de Araújo Silva ⁴

Alberdan Silva Santos ⁵

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo é investigar *in silico* a atividade inibitória de limonoides sobre a enzima COX-1 e os seus descritores de lipossolubilidade para ações tópicas contra inflamações.

Referencial Teórico: O óleo de andiroba apresenta limonóides com potenciais anti-inflamatórios, destacando suas vertentes para a bioeconomia sustentável devido serem classificadas como não esteroidais. Neste contexto foram estudadas nove estruturas de limonóides *in silico* via ancoragem molecular na enzima COX-1.

Método: As estruturas químicas 2D dos limonóides foram preparadas pelo programa MarvinSketch, sendo convertidas em estruturas 3D e otimizadas por métodos de mecânica clássica. A estrutura da proteína COX-1 complexada com flurbiprofeno no seu sítio ativo foi baixada do RCSB PDB de origem *Homo sapiens* e usada na ancoragem molecular através programa *Virtual Molegro Docker*.

Resultados e Discussão: Os resultados obtidos mostram que os limonóides apresentam potencial de inibição da COX-1. Estes resultados mostraram informações valiosas sobre lipossolubilidade e atividade inibitória da COX-1, ressaltando o potencial em uso tópico do óleo de andirobas.

Implicações da Pesquisa: As implicações práticas e teóricas desta pesquisa ressaltam que os limonóides podem inibir a COX-1 impedindo a formação de tromboxanos TXA₂, além de estar associado à inibição da agregação plaquetária, sendo uma medida eficaz na prevenção de trombose arterial, e que pode ser estendida às enfermidades vasculares, podendo abrir perspectivas para possível redução, não só das microvarizes, mas de flebites superficiais.

Originalidade/Valor: Este estudo contribui para a literatura pois é um estudo inédito envolvendo a COX-1 e os limonóides presentes no óleo de andirobeira.

Palavras-chave: COX-1, Atividade Anti-Inflamatória, Descritores Lipossolúveis, Andirobeira, Planta Amazônica.

¹ Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (Labisisbio), Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil. E-mail: rjufpa@gmail.com

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7625-7991>

² Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (Labisisbio), Universidade Federal do Pará, 66075-110, Belém, Pará, Brasil. E-mail: andrechemistry25@gmail.com

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2202-7434>

³ Museu Paraense Emílio Goeldi, Adolpho Ducke Laboratory, Belém, Pará, Brasil.

E-mail: eloisaandrade@ufpa.br Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0640-7496>

⁴ Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (Labisisbio), Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil. E-mail: rogerio@ufpa.br

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2310-5107>

⁵ Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biodiversidade Molecular (Labisisbio), Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil. E-mail: alberdan@ufpa.br

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1863-176X>



SYSTEMATIC SELECTION OF LIMONIDS FROM *CARAPA GUIANENSIS* AUBLET WITH ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY, THROUGH *IN SILICO* TECHNIQUES FOR TOPICAL USE

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate *in silico* the inhibitory activity of limonoids on the COX-1 enzyme and their liposolubility descriptors for topical actions against inflammation.

Theoretical Framework: Andiroba oil has limonoids with anti-inflammatory potential, highlighting their potential for sustainable bioeconomy due to their classification as non-steroidal. In this context, nine limonoid structures were studied *in silico* via molecular docking to the COX-1 enzyme.

Method: The 2D chemical structures of the limonoids were prepared using the MarvinSketch program, converted into 3D structures and optimized using classical mechanics methods. The structure of the COX-1 protein complexed with flurbiprofen in its active site was downloaded from the RCSB PDB of Homo sapiens origin and used for molecular docking using the Virtual Molegro Docker program.

Results and Discussion: The results obtained demonstrated that limonoids have the potential to inhibit COX-1. These results showed valuable information on liposolubility and COX-1 inhibitory activity, highlighting the potential for topical use of andirobas oil.

Research Implications: The practical and theoretical implications of this research emphasize that limonoids can inhibit COX-1 by preventing the formation of TXA2 thromboxanes, in addition to being associated with inhibition of platelet aggregation, being an effective measure in the prevention of arterial thrombosis, and which can be extended to vascular diseases, opening up perspectives for possible reduction, not only of microvaricose veins, but also of superficial phlebitis.

Originality/Value: This study contributes to the literature as it is an unprecedented study involving COX-1 and the limonoids present in andirobeira oil.

Keywords: COX-1, Anti-inflammatory Activity, Fat-soluble Descriptors, Andirobeira, Amazonian Plant.

SELECCIÓN SISTEMÁTICA DE LIMONÓIDOS DE *CARAPA GUIANENSIS* AUBLET CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA, MEDIANTE TÉCNICAS *IN SILICO* PARA USO TÓPICO

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este estudio es investigar *in silico* la actividad inhibitoria de los limonoides sobre la enzima COX-1 y sus descriptores de liposolubilidad para acciones tópicas contra la inflamación.

Marco Teórico: El aceite de Andiroba posee limonoides con potencial antiinflamatorio, destacando su potencial para la bioeconomía sostenible debido a su clasificación como no esteroideos. En este contexto, se estudiaron *in silico* nueve estructuras de limonoides mediante acoplamiento molecular con la enzima COX-1.

Método: Las estructuras químicas 2D de los limonoides se prepararon mediante el programa MarvinSketch, se convirtieron en estructuras 3D y se optimizaron mediante métodos de mecánica clásica. La estructura de la proteína COX-1 complejada con flurbiprofeno en su sitio activo se descargó del PDB RCSB de origen Homo sapiens y se utilizó para el acoplamiento molecular mediante el programa Virtual Molegro Docker.

Resultados y Discusión: Los resultados obtenidos muestran que los limonoides tienen el potencial de inhibir la COX-1. Estos resultados mostraron información valiosa sobre la liposolubilidad y la actividad inhibidora de la COX-1, destacando el potencial de uso tópico del aceite de andirobas.

Implicaciones de la investigación: Las implicaciones prácticas y teóricas de esta investigación destacan que los limonoides pueden inhibir la COX-1 impidiendo la formación de tromboxanos TXA2, además de estar asociados a la inhibición de la agregación plaquetaria, siendo una medida eficaz en la prevención de la trombosis arterial, y que puede extenderse a las enfermedades vasculares, abriendo perspectivas para una posible reducción, no sólo de las microvarices, sino también de las flebitis superficiales.



Originalidad/Valor: Este estudio contribuye a la literatura, ya que es un estudio sin precedentes que involucra la COX-1 y los limonoides presentes en el aceite de andirobeira.

Palabras clave: COX-1, Actividad Antiinflamatoria, Descriptores Liposolubles, Andirobeira, Planta Amazónica.

RGSA adota a Licença de Atribuição CC BY do Creative Commons (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



1 INTRODUÇÃO

Nesta estudo, investigações com técnicas de metabolômica e química computacional, envolvendo ancoragem molecular, foram aplicadas para investigar o perfil metabólico de um concentrado de limonóides e confirmar em níveis decrescente de energia a atividade inibitória da COX-1, e qual dos limonóides apresentam os melhores potenciais como pré-candidatos quimioterápicos de inibição desta enzima para uso tópico.

Neste sentido a inibição da agregação plaquetária em microvarizes poderá ser uma solução importante para a estética corporal, e de um modo geral, é possível que a inibição da COX-1 possa está direcionada para a redução, não só das microvarizes, mas de flebites ou tromboflebites superficiais, nos casos leves; lesões desportivas e acidentais, hematomas, distensões, contusões, tendinite e tenossinovites, diminuindo as dores e as inflamações relacionadas. Nestes caso, o desenvolvimento de anti-inflamatórios seguros, produzidos a partir de óleos vegetais se apresentam como fontes de grande interesse para uso tópico, fato que destaca os produtos naturais cientificamente investigados, tomando como base seus usos tradicionais, biocompatíveis e uma alternativa custo-benefício-efetividade-segurança para o tratamento de adversidades inflamatórias superficiais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A inflamação é um fenômeno reacional que ocorre no organismo com respostas bioquímicas contra ferimentos, infecções, lesões, hematomas, tendinite, tenossinovite, flebite ou tromboflebite e que também pode estar associada a resposta autoimune ou exposições a toxinas. Este fenômeno é descrito como processo de curto ou longo período, conhecido como inflamação aguda ou crônica, respectivamente; e que apresenta as ciclo-oxigenases, COX-1 e COX-2, como enzimas chave neste processo (Chandrasekharan and Simmons 2001); (Carter et al., 2014); (Orlando and Malkowski, 2016). A enzima COX-1 catalisa as reações de formação



das prostaglandinas (PGD2 e PGE2), prostaciclina (PGI2) e tromboxanos (TXA2), enquanto que a COX-2 é responsável pelas formações de prostaciclina (PGI2) e prostaglandinas (PGE2).

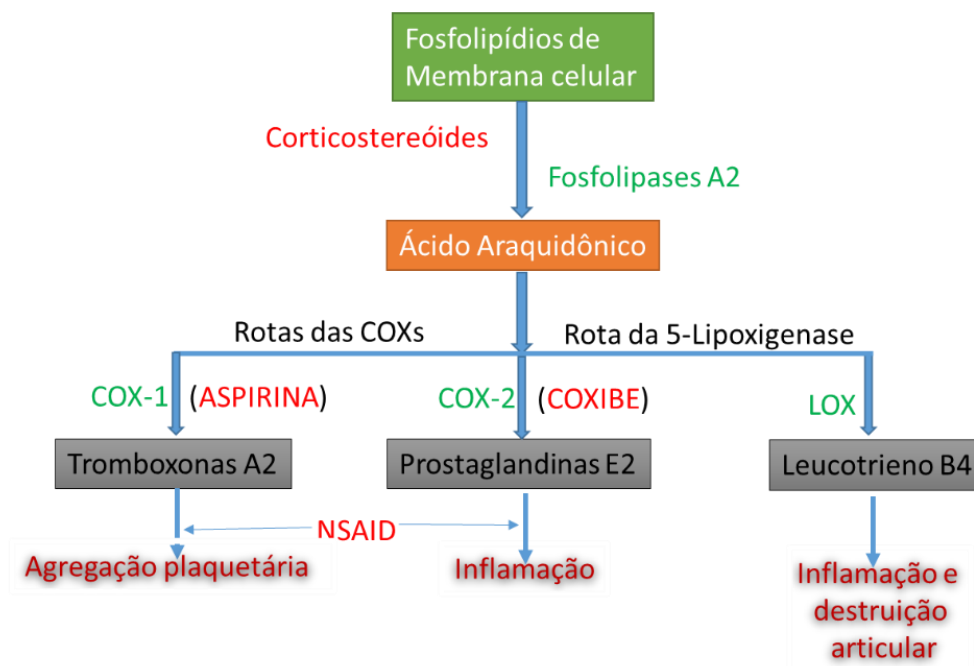
A inibição da COX-1 impede a formação de tromboxanos TXA2, além de que este impedimento está associado à inibição da agregação plaquetária e exerce ação vasodilatadora. Deste modo, no endotélio, a ativação da COX-1 permite a produção de prostaciclina (PGI2); nas plaquetas a COX-1 é essencial para a síntese de TXA2, a qual estimula a agregação plaquetária e vaso constricção e segue um efeito hemostático e, consequentemente, trombogênico. Neste sentido, a inibição da formação de TXA2 também induz a inibição da agregação plaquetária, seguindo o mesmo princípio de atuação da aspirina (AAS) na minimização da trombose arterial. Tromboxanos são substâncias que apresentam atividade vaso constritor na circulação sistêmica, mas vaso dilatador na circulação pulmonar. A inibição da agregação plaquetária é uma medida eficaz demonstrada na prevenção de trombose arterial, o que pode ser estendida às enfermidades vasculares.

Em estudos realizados com ratos, foram obtidos resultados dos efeitos das inibições agudas da COXs na reatividade de trombolismo dirigido em plaquetas induzido por colágeno ou por mimética do tromboxano TXA2 U46619; observou-se que a aspirina, o diclofenaco e o parecoxibe, quando usados para inibir COX-1 e COX-2 apresentaram resultados diferentes: A aspirina e diclofenaco, como esperado, apresentaram efeitos de inibição do trombo, mas não houve efeito de redução do trombo quanto ao uso do parecoxibe, pois ele é seletivo para a COX-2. A inibição da COX-1 reduziu a formação de trombo induzido por colágeno (Armstrong et al., 2011). Estes resultados foram importantes para demonstrar que a inibição da COX-1 poderá ser útil na minimização ou combate de trombozes e consequentemente de tromboflebite leve e/ou de microvarizes. Neste estudo, pode-se observar que a inibição da COX-1 é importante na seleção de moléculas com potencial de uso tópico, Figura 1.



Figura 1

Etapas de inibição das ciclo-oxigenases e suas influências



O ácido araquidônico (AA), gerado a partir da membrana celular por ação da fosfolipase A2, pode ser inibido por ação de esteróides e, conseqüentemente, inibir a artrite e substâncias pré-trombóticas. Deste modo, o AA pode ser reduzido no organismo com dietas de menor consumo de carne vermelha ou pelo maior consumo de peixes de águas frias, pode-se lançar mão de inibidores das COXs já conhecidos. A COX-1 pode ser inibida pela aspirina em baixas concentrações; a COX-2 pode ser inibida pela celocoxibe, Celebrex, as quais são seletivas para esta enzima; e a LOX pode ser inibida pela curcumina ou ácido boswélico (Figura 1).

Nesta interação é sabido que a aspirina é a única NSAID que se liga irreversivelmente às enzimas COXs e por isso se busca moléculas similares a estas características, pois ficou demonstrado que muitas NSAIDs não são seletivas na inibição das COX, atuando sobre as duas isoformas COX-1 e COX-2. Além disso, já existem inibidores seletivos da COX-2 que conferem proteção gástrica, entretanto, eles estão associados ao aumento de riscos de maiores eventos coronários (Carvalho et al., 2004), (Sharma et al., 2019). A inibição da COX-1 regula a expressão da COX-2, o que pode neutralizar as influências deletérias e os eventos subsequentes, devido a uma deficiência de PG, e os diversos estudos estão focados, principalmente, na inibição seletiva da COX-2 por substâncias administradas oralmente, devido aos efeitos adversos provocados quando a COX-1 é inibida. Entretanto o uso de NSAID tópico apresenta maior segurabilidade e seus efeitos dermatológicos adversos podem incluir pruridos



e dermatites, o que pode ser interrompido pela remoção de uso do produto. Neste sentido, NSAID tópicos deveriam ser considerados como a primeira opção antes de NSAID oral, especificamente para pacientes adultos com osteoartrite e para aqueles que apresentam condições de comorbidade e/ou fator de risco adversos (Honvo et al., 2019). Neste caso o mecanismo de atuação é a penetração do NSAID através da pele para dentro do tecido subdermal, incluindo o tecido sinovial para agir diretamente no local da inflamação (Pradal, 2020), sendo necessário substâncias biocompatíveis e que apresentem potencial de penetração na pele de modo a atravessar a barreira lipídica.

Uma das estratégias utilizadas é a busca por moléculas de fontes naturais, utilizadas por humanos ao longo da existência (Dias et al., 2012), e especificamente neste estudo, destaca-se a espécie *Carapa guianensis* conhecida como Andirobeira, e que é uma planta de ciclo vegetativo longo com ocorrência na Amazônia e que produz uma classe de metabólitos pertencentes aos tetranortriterpenóides, conhecidos como limonóides (Nascimento et al., 2019), (Reis et al., 2021), e que são encontrados principalmente no óleo das sementes, o qual tem sido muito utilizado pela população amazônica no combate às inflamações cutâneas (Chia et al., 2018) (Porfírio-Dias et al., 2020). Entretanto, nunca ninguém investigou os limonóides como ligantes de inibição da COX-1, agindo na ação anti-inflamatória. Deste modo, nove análogos de tetranortriterpenos, resultantes da classe dos limonóides, isolados a partir das sementes da espécie *C. guianensis* foram selecionados com base na ação anti-inflamatória como potenciais inibidores da COX-1 para investigar especificamente sua ação no combate de inflamações relacionadas à trombose arterial, hematomas microvarizes, flebites ou tromboflebites superficiais, nos casos leves; lesões, distensões, contusões, tendinite e tenossinovites.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DO CONJUNTO DAS MOLÉCULAS A SEREM ANALISADAS

O conjunto de moléculas de limonóides foram obtidas da literatura (Pereira da Silva et al., 2023), (Nagatomo et al., 2022), assim como algumas estruturas foram obtidas de estudos realizados em nossos laboratórios (Reis et al., 2021), a partir de estudos de lipidômicas aplicados no óleo das sementes de Andirobeira (*C. guianensis*), sob código do Sigen AF60078.



3.2 INVESTIGAÇÃO SISTEMÁTICA E TRIAGEM METABÓLICA ATRAVÉS DO ANCORAGEM MOLECULAR

3.2.1 Seleção das moléculas de limonóides como ligantes da COX-1

Um conjunto de dados de 9 moléculas, baseado em estrutura tetranortripernoidicas, conhecidas como limonóides, foram obtidas experimentalmente das sementes de *C. guianensis*. As estruturas químicas 2D dos ligantes, limonóides, foram preparadas pelo programa MarvinSketch (ChemAction, USA), sendo convertidas em estruturas 3D e otimizadas por métodos de mecânica clássica. Em seguida, estes limonóides foram submetidos aos ensaios *in silico* via ancoragem molecular, utilizando a estrutura 3D de COX-1.

3.3 PREPARAÇÃO DA ENZIMA

A estrutura cristalina do COX-1 (PDB ID: 1Q4G) foi baixada do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) de origem Homo sapiens, X-ray 2.51 Å (Orlando & Malkowski, 2016). Esta COX-1 contém o inibidor flurbiprofeno complexado em seu sítio de ligação, bem como, o grupo porfirina contendo Fe como cofator. Em seguida, a estrutura da proteína cristalizada foi processada removendo-se as moléculas do ligante, (íon amônio, 2-acetamida-2-deoxy- α -D-glucopyranose, octyl- α -D-glucopyranosidide, protoporfirina contendo Fe, (Figura 1) e água existentes. Depois disso, hidrogénios polares e cargas Kollman foram adicionados à proteína usando as ferramentas programa *Virtual Molegro Docker* (MVD, v. 6.0). A função de pontuação *moldock* foi utilizada para classificar as melhores conformações e seus respectivos valores de energia de afinidade (em kcal/mol) para o flurbiprofeno (auto-ancoragem) e os limonóides (Mota et al., 2019).

3.4 PREPARAÇÃO DOS LIGANTES

As estruturas de limonoides, a partir do óleo de semente de *C. guianensis*, foram preparadas pela MarvinSketch (ChemAxon, EUA). Depois disso, as estruturas foram convertidas em estruturas 3D pela função "Clean in 3D" no MarvinSketch e salvas no formato de arquivo de dados da estrutura (sdf). Na última etapa, todos os ligantes foram convertidos para o formato pdbqt, utilizando o programa OpenBabel. As simulações computacionais foram realizadas no programa Molegro Virtual Docker v. 6.0 (2007). A função de pontuação *moldock*



foi utilizada para classificar as melhores conformações e seus respectivos valores de energia de afinidade (em kcal/mol) para o flurbiprofeno (auto-ancoragem) e para os limonóides (Mota et al., 2019).

3.5 APLICAÇÃO DO SCREENING VIRTUAL E DOCKING MOLECULAR NAS MOLÉCULAS DE LIMONÓIDES

O Programa Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD 2007) foi utilizado para a análise de docking molecular. Os compostos foram acoplados à COX-1 usando a estrutura protéica e os sítios de ligações, preparadas conforme descrito acima. As moléculas de água foram removidas durante os cálculos de docking. Os sítios de ligação foram definidos como uma esfera de 15 Å com um centro de coordenadas idênticas às do inibidor na estrutura cristalizada correspondente.

Durante as experiências de ancoragem, os ligantes foram tratados como flexíveis, enquanto que a proteína ficou rígida. Uma função de pontuação MolDock-Score (Grid) foi aplicada na análise e a resolução da grade foi definida a 1 Å. O tamanho máximo da população e as interações foram ajustadas para 100 e 1500, respectivamente. Para cada ligante foram realizadas 50 corridas de docking independentes. Foram selecionadas as mais baixas poses de ancoragem de energia para as análises apresentadas abaixo.

Para validação do programa, uma re-docagem com o inibidor cristalográfico Flurbiprofeno (BFL) foi realizada utilizando as coordenadas originais do complexo cristalográfico oriundo do PDB. Para isso, o ligante BFL foi removido da cavidade catalítica deixando-o livre para que o algoritmo Moldock, do MVD, pudesse encontrar a conformação mais próxima das coordenadas experimentais cristalográficas. Em seguida, as nove estruturas dos limonóides selecionados foram investigadas *in silico*, no sítio de ligação, utilizando o algoritmo chamado de “ancorar-e-crescer” do inglês (*anchor-and-grow*) (Löwe et al., 2001).

Funções de pontuação (*scoring*) foram aplicadas para selecionar as melhores conformações do ligante, sendo as interações *van der Waals* avaliadas por potenciais Lennard-Jones, e as electrostáticas avaliados por médias de funções dielétricas dependentes do tempo (*means of time-dependent dielectric functions*) (Thomsen & Christensen, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

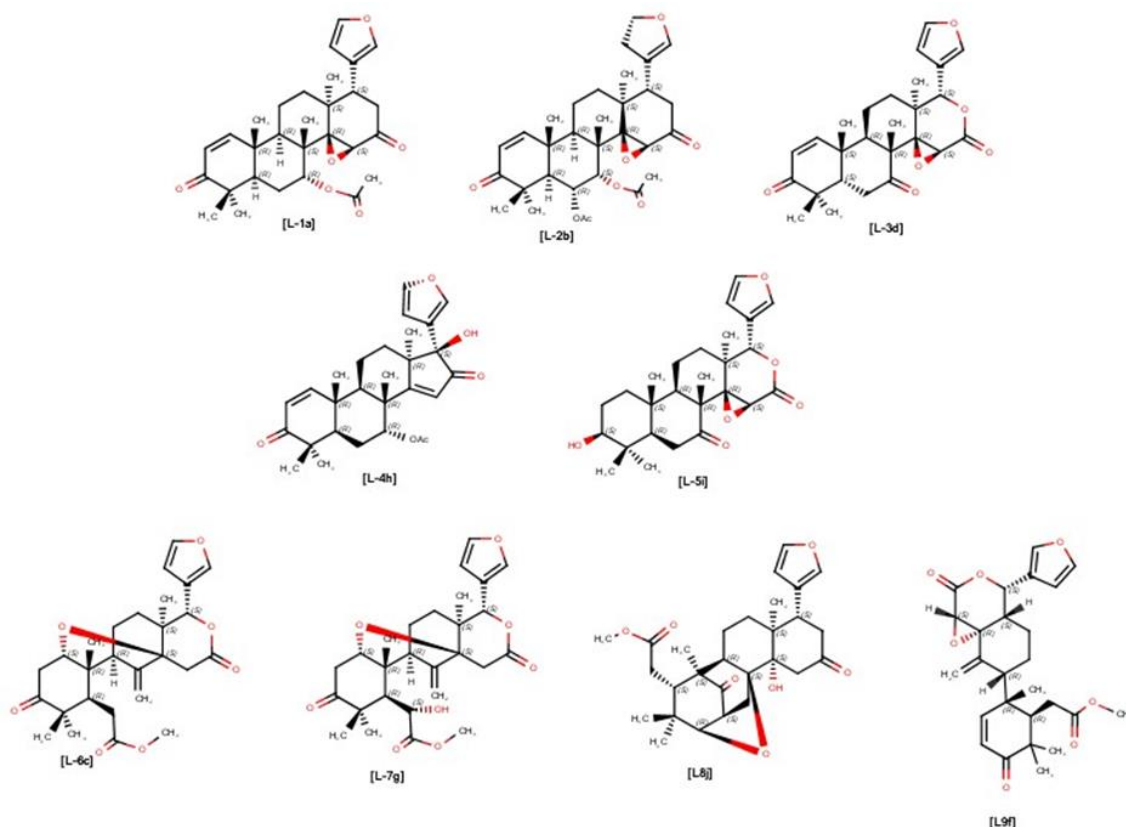
O óleo integral de andiroba é composto por uma mistura de triacil, monoacil, diacilgliceróis, limonoides, esteroides, carotenóides e outras moléculas em concentrações



diminutas. O grupo de limonóides estudados nas espécies de andirobeiras no Brasil, especialmente na espécie *C. guianensis*, varia consideravelmente de localidade, sazonalidade e métodos de extração do óleo. Por este motivo, é praticamente impossível se detectar todos os limonóides em amostras exclusivas. O rol de moléculas apresentadas foram analisadas e isoladas em diferentes localidades e hoje se sabe que nove estruturas podem ser indentificadas em óleos de *C. Guianenses* na região norte o Brasil. Deste modo nove limonóides foram selecionados e submetidos á investigação de atividade antiinflamatória *in silico*, voltadas para uso tópico, Figura 2.

Figura 2

Estrutura base dos limonóides naturais, obtidos de C. guianensis.



O óleo de andiroba apresenta diversa substâncias pertencentes aos grupos dos tetranortriterpenóides e esteroides, entretanto, nem sempre são encontrados um número expressivo destas substancias, devido a diversos fatores, tais como sazonalidade e fatores geológicos que influenciam na síntese e produção destes metabólitos. Diversas estruturas pertencentes a estes grupos foram identificados, entretanto nove delas ocorrem maior incidência na Região Amazônica. Em geral, quando se aplica técnicas de metabolômica no óleo de

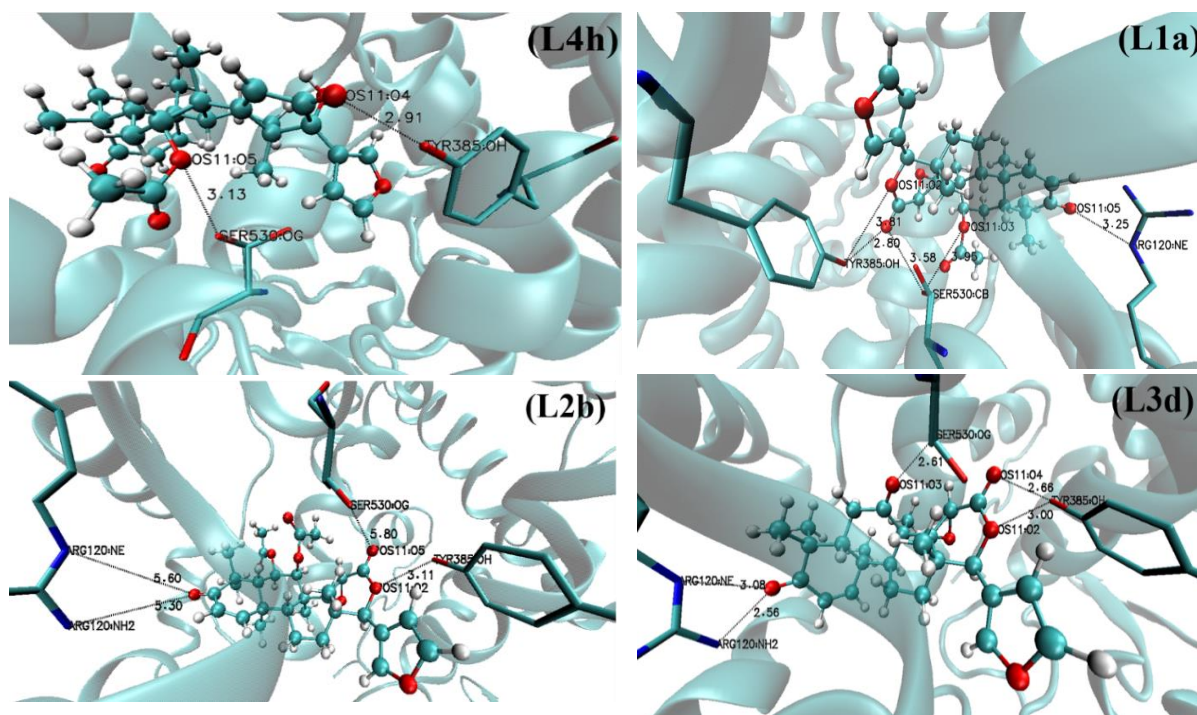


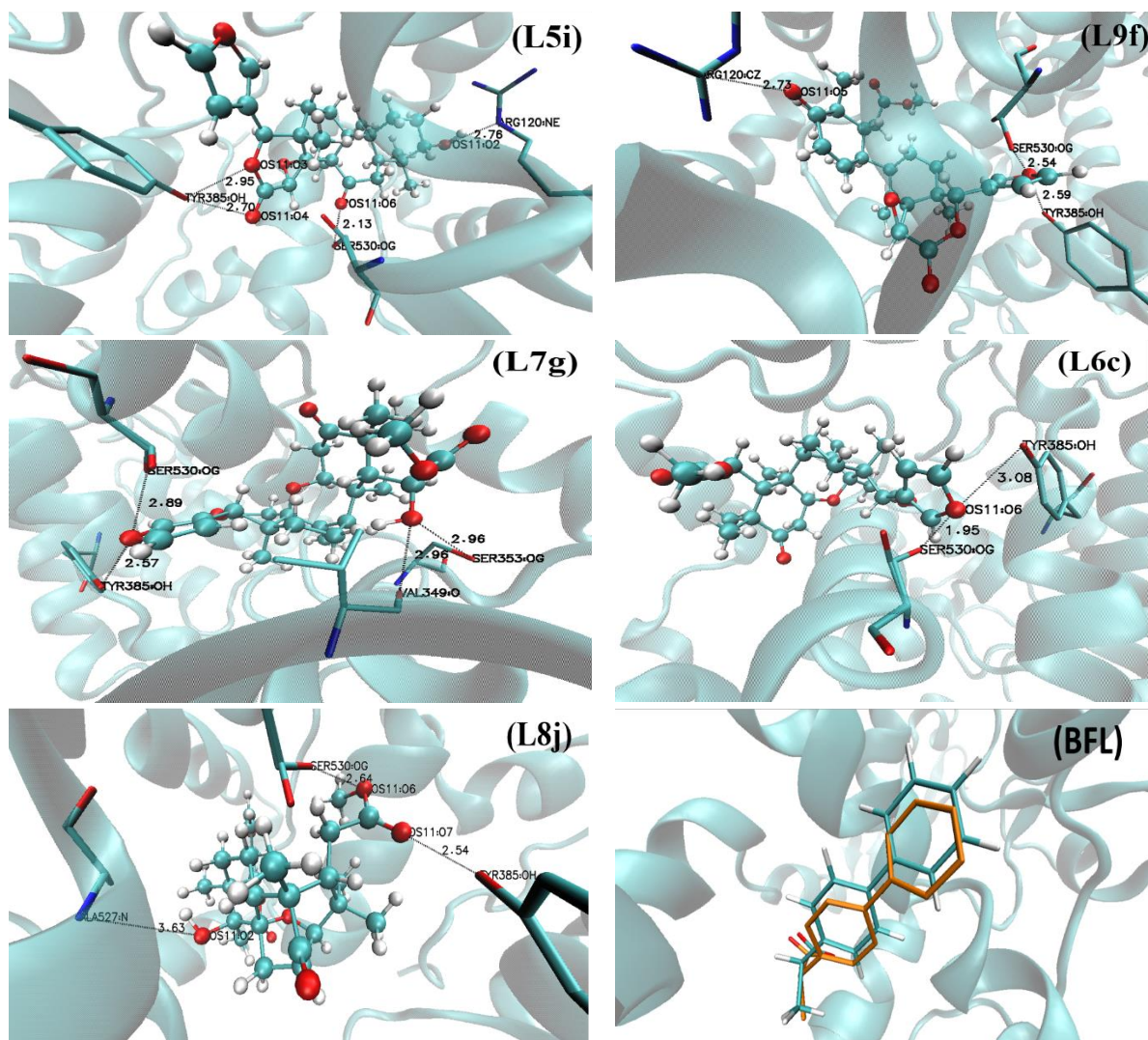
andiroba, pode-se identificar de 3 a 7 destas substâncias, além de ácidos graxos comuns, e por este motivo estas nove estruturas foram alvos de investigação *in silico* via ancoragem molecular.

O programa Molegro Virtual Docker (MVD) foi utilizado na metodologia de docking molecular, pois demonstra melhor desempenho quando comparado com Surflex e Flexx. O algoritmo evolucionário de otimização estrutural, Moldock, foi utilizado para encontrar a melhor orientação do potencial ligante na cavidade catalítica (Thomsen & Christensen, 2006). A redocagem (Figura 3) confirma que o programa Molegro reproduziu os resultados experimentais do ligante cristalográfico BFL, obtendo-se conformação semelhante no mesmo sítio de ligação experimental. As funções de pontuação aplicados nos limonóides e no BFL, apresentadas na figura 3, mostram as conformações selecionadas como potenciais inibidores, interagindo com os principais resíduos catalíticos serina (SER) e tirosina (TYR) e suas respectivas distâncias de ligações, presentes nos seus respectivos sítios de ligações. Além disso, é possível atribuir interações com os resíduos catalíticos de SER e TYR para todos os potenciais inibidores. As distâncias de ligações para SER (530:OG) e todos os inibidores variaram entre 1.95Å e 5.80 Å e no caso da TYR, as distâncias de ligações foram entre 2.70 Å à 3.11 Å.

Figura 3

Conformações interações dos ligantes com os principais resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação da COX-1





(L1a) Gedunina, (L2b) 6 α -acetoxigedunina, (L6c) metil-angolensate, (L3d) 7-desacetoxi-7-oxogedunina, (L9f) Andirobina, (L7g) methyl-6-hidroxiangolensate, (L4h) 7-hidroxiadzadione, (L5i) 1,2 diidro-3b-hidroxi-7-desacetoxi-7-oxogedunina, (L8j) Xilocensi k, inibidor BFL redocking (cor laranja) e inibidor BFL cristalografado (cor azul).

Casos específicos (Figura 3) como dos inibidores L1a, L2b, L3d, L5i e L9f apresentaram valores de distâncias de ligações com resíduo de arginina (ARG 120) variando de 2.56 Å para L3d e a maior distância para o inibidor L2b com valor de 5.60 Å. Exceções foram encontradas para o inibidor L7g que interagiu com o resíduo de valina (VAL 349:O) com distância de ligação 2.96 Å e para o inibidor L8j o qual, apresentou interação de 3.63 Å com o resíduo de alanina (ALA 527:N). Diverso estudo tem sido realizados empregando produtos naturais (Levita et al., 2017)

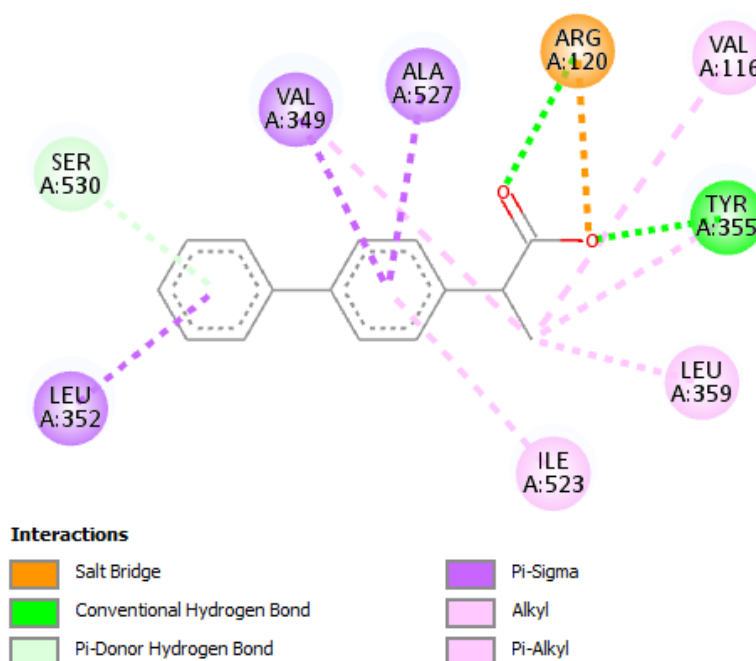
Ressalta-se que no sitio de ligação, interagindo com BFL estão os seguintes resíduos de aminoácidos: SER530, VAL349, ALA527, ARG120, VAL116, TYR355, LEU359, ILE523, LEU352, Figura 3. Neste caso, a ligação convencional de hidrogenio está relacionada a Arg120 e TYR355; observando-se que a maior contribuição na ARG120 é em virtude da ligação



salina. Estes res[íduos] de amkioácidos são relevantes nestesídio e marcam o bolsão de interação com os ligantes que possivelmente podem inibir esta enzima. Diversos estudos de ancoragem molecular foram realizados, ressaltandos-se os sitios ativos das COX-1, o que se pode confirmar que os res[íduos] presentes são: VAL116, ARG120, VAL349, LEU352, TYR355, LEU359, TYR385, TRP387, ILE523, ALA527, SER530 (Tziona et al., 2022).

Figura 4

Sítio de ligação da COX-1 e interação com BFL



Fonte: BIOVIA Discovery Studio Visualizer. 2022

Os valores de distâncias de ligação apontam provável afinidade dos inibidores no sítio de ligação da estrutura tridimensional da enzima ciclooxigenase entretanto, as conformações melhor classificadas na Tabela 1, pelo Moldock Score, apontam as moléculas L1a, L2b, L3d, L4h, L5i e L9f como promissoras pois, seus valores de Moldck Score apontam valores menores que -75 kcal/mol. Observa-se que os valores de energia de afinidade L9f e L1a apresentam valores bem próximos em ambos os sítios de ligação, e além disso, foram equivalentes ao valor obtido para o inibidor cristalográfico BFL de -106.658 kcal/mol. Todavia, o valor de -113.124 kcal/mol de energia de afinidade de ligação, calculado pelo programa MVD, para o inibidor L5i, mostrou-se muito maior quando comparado com os outros inibidores e ainda muito superior ao inibidor cristalográfico BFL. Entretanto L3d, L4h e L2b apresentaram valores abaixo de -77 kcal/mol e neste aspecto, a importancia das moléculas L1a, L2b e L3d é devido



suas presenças no óleo de andiroba com maior frequência, apresentando bons valores de inibição o que corresponde um mínimo de 72,26% quando comparado ao BFL.

Tabela 1

Valores de energia de afinidade (kcal/mol) obtido no docking molecular.

Ligantes	Moldock Score	Informações
(L5i) 1,2 diidro-3-hidroxi-7-desacetoxi-7-oxigedunina	-113.124	Candidato
(L9f) Andirobina	-104.934	Candidato
(L1a) Gedunina	-104.984	Candidato
(L3d) 7-desacetoxi-7-oxogedunina	-96.8876	Candidato
(L4h) 7-hidroxi-azadione	-90.1818	Candidato
(L2b) 6 α -acetoxigedunina	-77.0742	Candidato
(L6c) metil-angolensate	-58.4684	Candidato
(L7g) methyl-6-hidroxiangolensate	-53.4826	Candidato
(L8j) Xilocensin	-45.4288	Candidato
Flurbiprofeno (BFL) (re-docking)	-106.658	Referência

Neste sentido, se pode observar que a substância L2b corresponde a 72,26% da atividade de inibição do flurbiprofeno, enquanto que L1a corresponde a 98,42% da inibição.

As moléculas de limonoides, L1a e L2b, foram avaliadas *in silico* quanto a atividade anti-inflamatória, observando-se se ambas as substâncias apresentam evidências de inibirem a COX-1. As simulações por ancoragem molecular foram validadas utilizando como referência o inibidor BFL já complexado a enzima COX-1. Os mesmos padrões foram aplicados para os limonóides L1a e L2b. Os valores energéticos obtidos sugerem que o composto L1a (-104,984 kcal/mol) tem potencial para inibir a enzima COX-1 próximo ao inibidor BFL (-106,658 kcal/mol), enquanto que o composto L2b, embora possua afinidade com a enzima COX-1, este possui um menor potencial de inibição tanto em relação ao L1a quanto ao BFL.

Estudos das atividades e dos descritores paramétricos físico-químicos são apresentados na Tabela 2. Observa-se que todas as moléculas, inclusive a referência interage com proteínas do plasma, o que ressalta que a molécula L2b apresenta maior quantidade de penetrabilidade quando comparada como L1a e com a referência. Deste modo a lipossolubilidade, expressa por log P, apresenta valor numérico menor que 5 e, conseqüentemente, apresentam alto potencial de lipossolubilidade, o que permite atravessar a membrana celular.

Tabela 2

Descritores paramétricos de interação físico-químicos dos ligantes

LIGTE	PPB cm/H	Permeabilidade cutânea Log KP, cm/H	SPW mg/L	SKLogP Mol/L	SKlogS Mol/L	HA*	HD*
L1a	92,25	-1,8082	0,2272	3,7317	-6,3272	6	0



L2b	88,91	-2,0469	0,2535	3,1546	-6,3288	8	0
L3d	92,95	-1,8655	0,4085	3,4416	-6,0307	6	0
L4h	93,28	-1,1987	0,5559	3,9871	-5,9239	6	1
L5i	90,94	-2,5577	0,3931	3,3975	-6,0514	6	1
L6c	91,03	-1,7564	1,1948	3,4524	-5,5953	7	0
L7g	87,99	-2,2778	2,3697	2,6636	-5,3124	8	1
L8j	82,74	-2,7659	3,4871	2,1941	-5,1447	7	1
L9f	92,44	-2,4209	1,3566	3,3677	-5,5251	7	0
BFL	78,89	-2,5262	2,7085	2,4853	-5,3009	2	1

PPB=ligação com a proteína do plasma: Forte >90%, Fraca <90%; LogKP: alta permeabilidade < 0,1 e Baixa permeabilidade > 0,1 ; SPW=solubilidade em água pura: alta >1, baixa<1; HA=aceitador de H, HD=doador de H, SKlogP=lipossolubilidade: média-alta lipossolubilidade >3, baixa-moderada lipossolubilidade <3. LIGTE=ligantes. *SwissAdme (<http://www.swissadme.ch/index.php>)

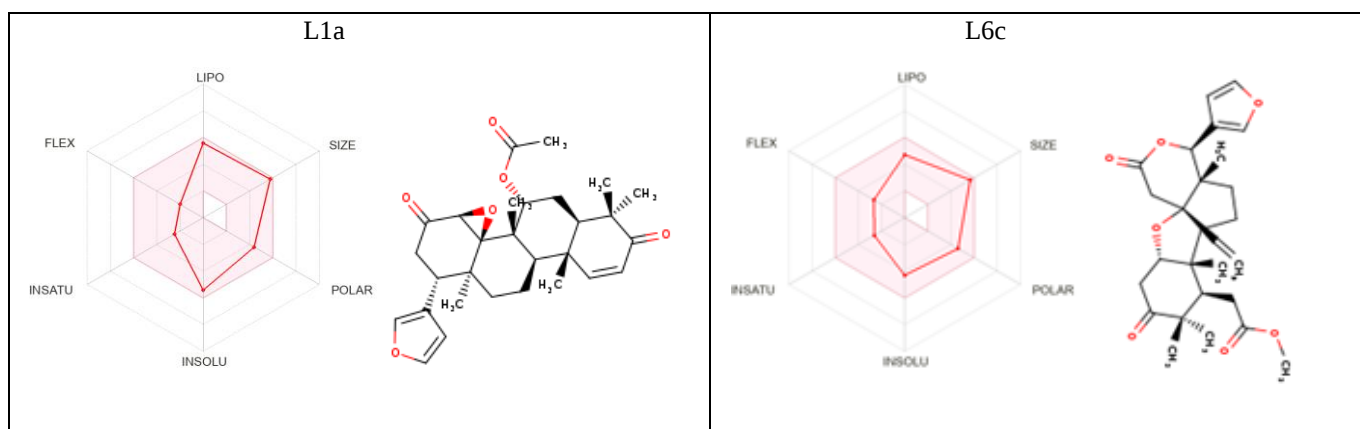
Observa-se que a solubilidade das substâncias em água pura destaca a BFL como sendo a mais solúvel, seguida da L2b, a qual tem menor valor de permeabilidade cutânea (Log KP) quando comparada com L1a e L3d. Entretanto, todas apresentam alta permeabilidade. Os valores de lipossolubilidade são aceitáveis e se correlacionam com os níveis de alta aceitação (HÁ) e nenhuma doação (HD) de hidrogênio, caracterizando assim seus potenciais de penetrabilidade da pele.

Em ambos casos, os limonóides se apresentam com descritores altamente favoráveis para uso tópico, entretanto é necessário o processamento da amostra para se gerar um processo de obtenção de um concentrado dos limonóides. Neste caso, a separação da fração saponificável da insaponificável poderá ser uma alternativa concreta.

Deste modo, é apresentado na Figura 5 os gráficos na forma de radar dos descritores físico-químicos das estruturas de limonóides estudadas.

Figura 5

Comparação de descritores físico-químicos e suas estruturas



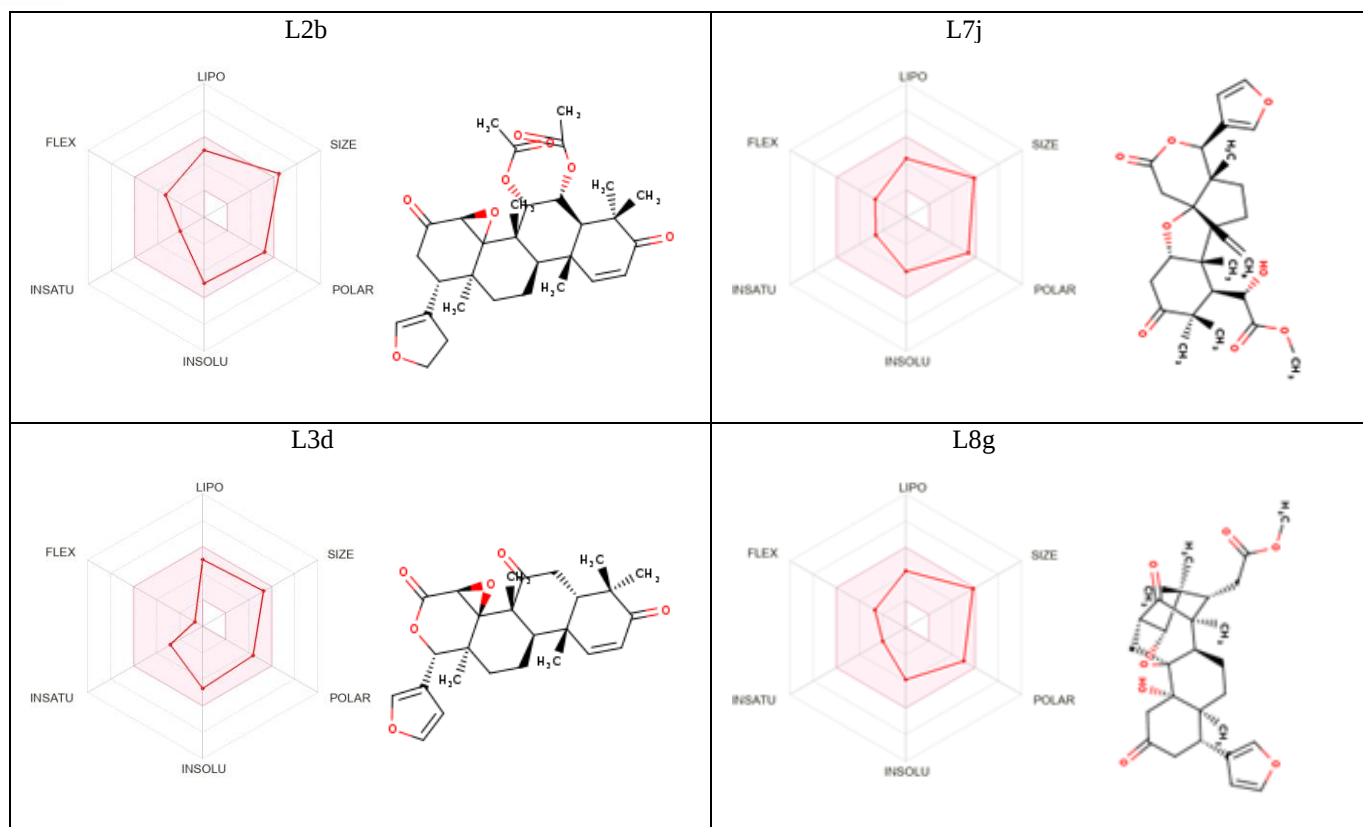
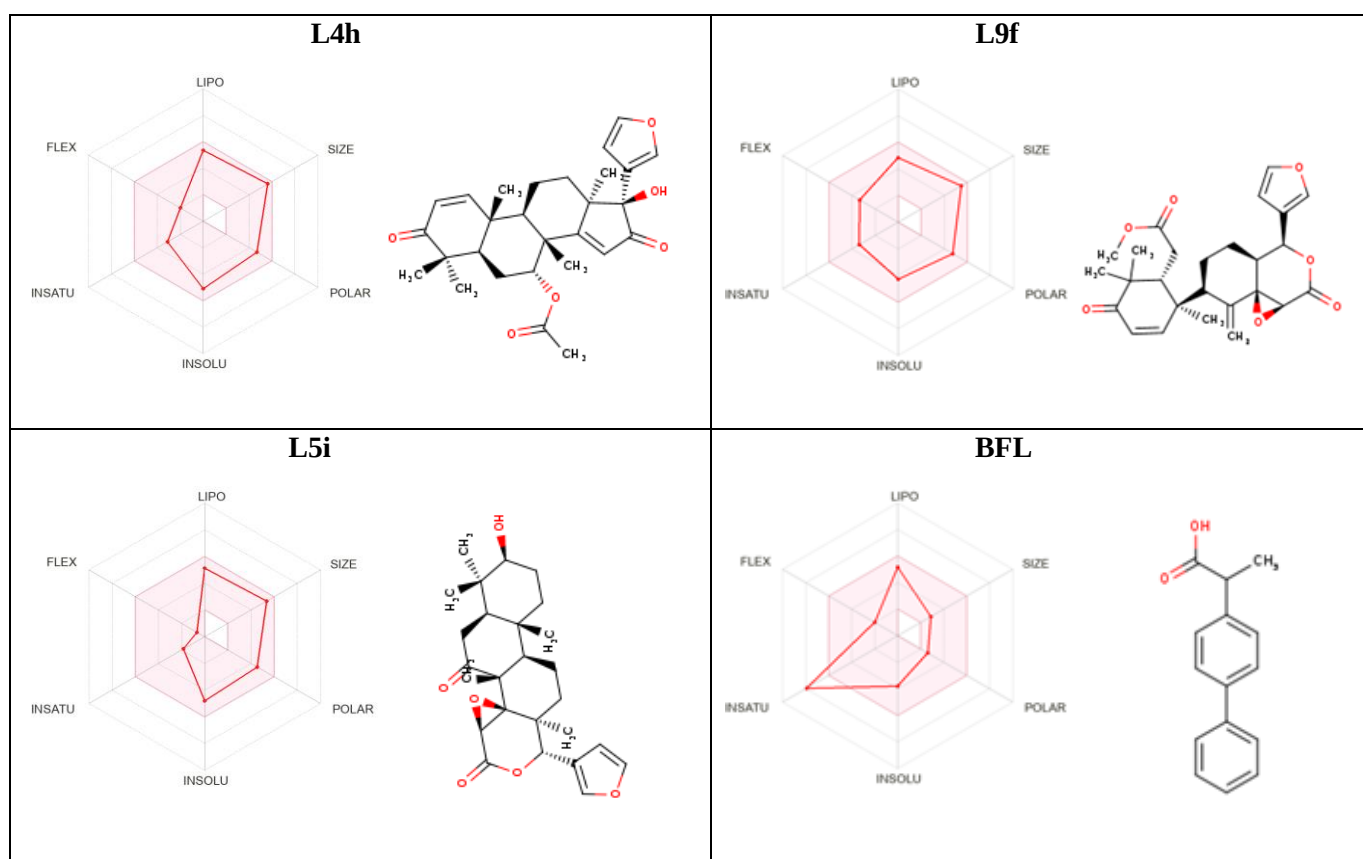


Figura 4

Continuação





Observa-se que L3d e L5i apresentam tendências semelhantes quanto à lipossolubilidade (LIPO), tamanho da molécula (SIZE), polaridade (POLAR), insolubilidade (INSOLU), grau de insaturação (INSATU) e flexibilidade (FLEX). L1a apresenta uma leve tendência de similaridade com L4h. Neste mesmo sentido as moléculas L6c, L7j e L9f apresentam similaridades. Entretanto as estruturas 1, 3, 4 e 5 apresentam mesmo nível de lipossolubilidade, seguida de todas as estruturas apresentarem similaridades no nível de tamanho molecular. Estas informações coadunam com a importância de uso destas moléculas em ações tópicas.

5 CONCLUSÃO

As simulações por ancoragem molecular ressaltaram os maiores efeito anti-inflamatório das moléculas L1a e L2b, observando-se que a molécula L1a apresentou melhor afinidade de interação do que a molécula L2b quando comparadas a referência BFL. Os resultados de penetrabilidade demonstraram que os candidatos possuem potencial de lipossolubilidade, que atravessam a barreira cutânea. Os descritores físico-químicos acrescentaram as evidências necessárias para que todas as moléculas apresentem lipossolubilidade, ressaltando-se L11a, L3d, principalmente. As informações dos descritores físico-químicos descrevem o comportamento de solubilidade para todas as moléculas, entretanto é importante ressaltar que as mesmas não serão usadas em administração oral, mas que estes estudos estão voltados para uso tópico.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à CAPES, CNPq, Propesp-UFPA e ao PPG-Bionorte.

REFERÊNCIAS

- Armstrong, P. C., Kirkby, N. S., Zain, Z. N., Emerson, M., Mitchell, J. A., & Warner, T. D. (2011). Thrombosis is reduced by inhibition of COX-1, but unaffected by inhibition of COX-2, in an acute model of platelet activation in the mouse. *PLoS ONE*, 6(5), 5–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020062>
- Carter, G. T., Duong, V., Ho, S., Ngo, K. C., Greer, C. L., & Weeks, D. L. (2014). Side effects of commonly prescribed analgesic medications. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 25(2), 457–470. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2014.01.007>
- Carvalho, W. A., Carvalho, R. D. S., & Rios-Santos, F. (2004). Analgésicos inibidores



- específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 54(3), 448–464. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942004000300017>
- Chandrasekharan, N., & Simmons, D. L. (2001). Protein family review The Smads. *Genome Biology*, 5(9), 241.
- Chia, C. Y., Medeiros, Dantas, A., Corraes, A. de M. S., Manso, J. E. F., Silva, C. S. C., Takiya, C. M., & Vanz, R. L. (2018). Healing effect of andiroba-based emulsion in cutaneous wound healing via modulation of inflammation and transforming growth factor beta 3 1. *Acta Cirurgica Brasileira*, 33(11), 1000–1015.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2, 303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Honvo, G., Leclercq, V., Geerinck, A., Thomas, T., Veronese, N., Charles, A., Rabenda, V., Beaudart, C., Cooper, C., Reginster, J. Y., & Bruyère, O. (2019). Safety of Topical Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs and Aging*, 36(s1), 45–64. <https://doi.org/10.1007/s40266-019-00661-0>
- Levita, J., Rositama, M. R., Alias, N., Khalida, N., Saptarini, N. M., & Megantara, S. (2017). Discovering COX-2 Inhibitors from Flavonoids and Diterpenoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(07), 103–110. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70716>
- Löwe, J., Li, H., Downing, K. H., & Nogales, E. (2001). Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 313(5), 1045–1057. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5077>
- Mota, F. V. B., De Araújo Neta, M. S., De Souza Franco, E., Bastos, I. V. G. A., Da Araújo, L. C. C., Da Silva, S. C., De Oliveira, T. B., Souza, E. K., De Almeida, V. M., Ximenes, R. M., De Sousa Maia, M. B., Junior, F. J. B. M., Marchand, P., De Faria, A. R., & Da Silva, T. G. (2019). Evaluation of anti-inflammatory activity and molecular docking study of new aza-bicyclic isoxazoline acylhydrazones derivatives. *MedChemComm*, 10(11), 1916–1925. <https://doi.org/10.1039/c9md00276f>
- Nagatomo, A., Ninomiya, K., Marumoto, S., Sakai, C., Watanabe, S., & Morikawa, T. (2022). A Gedunin-Type Limonoid , 7-Deacetoxy-7-Oxogedunin , from Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) Reduced Intracellular Triglyceride Content and Enhanced Autophagy in HepG2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13141), 1–18.
- Nascimento, G. O., Souza, D. P., Santos, A. S., Batista, J. F., Rathinasabapathi, B., Gagliardi, P. R., & Gonçalves, J. F. C. (2019). Lipidomic profiles from seed oil of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa vasquezii* Kenfack and implications for the control of phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 129, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.069>
- Orlando, B. J., & Malkowski, M. G. (2016). Substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by fenamic acid derivatives is dependent on peroxide tone. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 15069–15081. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725713>
- Pereira da Silva, V., de Carvalho Brito, L., Mesquita Marques, A., da Cunha Camillo, F., & Raquel Figueiredo, M. (2023). Bioactive limonoids from *Carapa guianensis* seeds oil and



- the sustainable use of its by-products. *Current Research in Toxicology*, 4(March). <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2023.100104>
- Porfírio-Dias, C. L., Melo, K. M., Bastos, C. E. M. C., Ferreira, T. A. A., Azevedo, L. F. C., Salgado, H. L., Santos, A. S., Rissino, J. D., Nagamachi, C. Y., & Pieczarka, J. C. (2020). Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) shows cytotoxicity but no mutagenicity in the ACPP02 gastric cancer cell line. *Journal of Applied Toxicology*, 40(8), 1060–1066. <https://doi.org/10.1002/jat.3966>
- Pradal, J. (2020). Comparison of skin permeation and putative anti-inflammatory activity of commercially available topical products containing ibuprofen and diclofenac. *Journal of Pain Research*, 13, 2805–2814. <https://doi.org/10.2147/JPR.S262390>
- Reis, A. S., Santos, A. S., & Gonçalves, J. F. C. (2021). Ultrasound-assisted lipid extractions , enriched with guianensis seeds and the application of lipidomics using GC / MS. *RSC Advances*, 11, 33160–33168. <https://doi.org/10.1039/d1ra04776k>
- Sharma, V., Bhatia, P., Alam, O., Javed Naim, M., Nawaz, F., Ahmad Sheikh, A., & Jha, M. (2019). Recent advancement in the discovery and development of COX-2 inhibitors: Insight into biological activities and SAR studies (2008–2019). *Bioorganic Chemistry*, 89(103007), 1–45. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103007>
- Thomsen, R., & Christensen, M. H. (2006). MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11), 3315–3321. <https://doi.org/10.1021/jm051197e>
- Tziona, P., Theodosios-Nobelos, P., Papagiouvannis, G., Petrou, A., Drouza, C., & Rekka, E. A. (2022). Enhancement of the Anti-Inflammatory Activity of NSAIDs by Their Conjugation with 3,4,5-Trimethoxybenzyl Alcohol. *Molecules*, 27(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules27072104>