

Potencial farmacológico e toxicológico de metabólitos isolados de *Siparuna guianensis* através de metodologia computacional

Pharmacological and toxicological potential of metabolites isolated from Siparuna guianensis through computational methodology

João Pedro Pereira dos Santos¹, Nelita Gonçalves Faria de Bessa², Gilson Araujo de Freitas³, Miréia Aparecida Bezerra Pereira de Freitas⁴.

RESUMO

A espécie *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae) é medicinal aromática, e está presente em importantes reservatórios de biomassa medicinal do Cerrado brasileiro, sendo restrita a alguns ambientes e recomendada como prioritária para conservação. As folhas são as partes da planta mais utilizada popularmente, sendo importante matéria prima para uso prospectivo devido ao potencial antimicrobiano. Nesse contexto o presente projeto teve o objetivo de avaliar o potencial toxicológico de metabólitos isolados de *Siparuna guianensis* através de predição *in silico* visando possível obtenção de novos candidatos a fármacos desta espécie. No tocante a análise toxicológica *in silico* foi possível identificar que a maioria dos compostos majoritários são potencial candidato a ser empregado em pesquisas relacionadas com a atividade biológica frente a microrganismos. No entanto, é essencial a continuidade da pesquisa com a planta em questão, uma vez que a mesma apresenta um grupode componentes e de substâncias que dispõe de ações farmacológicas, então é importante que haja a continuidade de realização de trabalhos utilizando esta espécie encontrada na região sul do Tocantins, uma vez que foram verificados compostos promissores e com menor toxicidade para futuras investigações em testes *in vitro* e *in vivo*, podendo ser um forte candidato a novo fármaco.

Palavras-chave: Produtos naturais, toxicologia, triagem virtual.

ABSTRACT

The species *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae) is medicinal aromatic, and is present in important reservoirs of medicinal biomass in the Brazilian Cerrado, being restricted to some environments and recommended as a priority for conservation. The leaves are the most popularly used parts of the plant, being an important raw material for prospective use due to their antimicrobial potential. In this context, the present project aimed to evaluate the toxicological potential of metabolites isolated from *Siparuna guianensis* through *in silico* prediction, aiming at obtaining new drug candidates from this species. Regarding the *in silico* toxicological analysis, it was possible to identify that most of the major compounds are potential candidates to be used in research related to biological activity against microorganisms. However, the continuity of the research with the plant in question is essential, since it presents a group of components and substances that have pharmacological actions, so it is important that there is continuity of work using this species found in the southern region of Tocantins, since promising compounds with less toxicity were verified for future investigations in *in vitro* and *in vivo* tests, which could be a strong candidate for a new drug.

Keywords: Natural products, toxicology, virtual screening.

1. Acadêmico do curso de Fisioterapia da Universidade de Gurupi-TO

E-mail: joao.p.p.santos@unirg.edu.br

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9373-8212>

2. Engenheira Agrônoma

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0492-0686>

3. Engenheiro Agrônomo/Doutor em produção vegetal

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8329-1840>

4. Doutora em produção vegetal e professora da Universidade de Gurupi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3035-6249>

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) 80% da população mundial dependem de medicamentos derivados de plantas (ALVES et al, 2019). Estessão uma excelente fonte para obtenção de compostos bioativos para serem exploradas terapeuticamente, levando-se em conta também a biodiversidade mundial, em destaque o Brasil que é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (FEITOSA, et al., 2015; FULAN et al., 2014; NEWMAN E CRAGG,2012).

No Brasil, milhares de plantas são utilizadas popularmente como remédios naturais, o que se deve, em parte, ao fato de o país ser berço de grande biodiversidade vegetal, com uma infinidade de plantas sendo usadas como matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (BRASIL, 2006; DUTRA et al., 2016). Dessa forma, além de conhecer o uso popular de plantas medicinais, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) visa fomentar a pesquisa, o desenvolvimento tecnológico e a inovação com base na biodiversidade brasileira e de acordo com as necessidades epidemiológicas da população (BRASIL, 2009).

Segundo Bessa et al (2015), a espécie vegetal aromática, *Siparuna guianensis* é importante mediante sua indicação como espécie prioritária para conservação, sendo nativa do Bioma Cerrado e potencialmente promissora como alternativa natural contra patógenos de interesse para área da saúde. Negramina ou Folha santa são denominações adotadas regionalmente para a espécie, onde não se tem registros sobre seu potencial antimicrobiano, o que merece atenção mediante a crescente busca mundial por produtos naturais enquanto alternativa no controle de microrganismos patogênicos (BESSA et al. 2015)

Diante do cenário mundial motivado por novas descobertas a partir de produtos naturais e prospecção da biodiversidade (TULP e BOHLIN, 2002; MONTANARI, 2010), entende-se que *S. Guianensis* é uma espécie potencial para fármacos e, ainda pouco estudada. A fitoquímica do seu extrato bruto foliar aponta para ação antimicrobiana, possivelmente, devido aos terpenos, taninos e flavonóides (BESSA et al., 2013), sendo os

flavonóides desta espécie devido ao poder ansiolítico indicados em terapias complementares para tratar transtornos de ansiedade e atrasar o processo de envelhecimento (NEGRI et al., 2012), embora haja relatos da presença de flavonóide cuja ação pode ser antiinflamatória (FACUNDO et al., 2012). Já em seu óleo essencial têm-se majoritariamente o álcool bisabolol e o monoterpene terpinoleno (MONTANARI, 2010), sendo estes terpenos os metabólitos secundários mais presentes nos óleos essenciais, ou seja, compostos com elevada atividade biológica, farmacologicamente ativos e majoritários (DUARTE, 2006; MIGUEL, 2010), podendo compor em até 85% da proporção somados a outros constituintes vestigiais (MIGUEL, 2010).

E, ainda, dados científicos toxicológicos sobre plantas medicinais são limitados. A ideia de que o uso tradicional de uma planta por centenas de anos não garante segurança, necessitando de estudos que confirmem este uso popular, bem como os princípios ativos relacionados e sua segurança farmacológica (AMARANTE et al., 2011; ARGENTA et al., 2011; LUNA et al.; 2005).

Nesse contexto, a química medicinal tem se empenhado para oferecer ferramentas que possam facilitar o processo de descoberta de novos fármacos, merecendo destaque para as análises *in silico*, ferramentas que utilizam métodos computacionais e matemáticos com comprovada efetividade para prever uma grande diversidade de características biológicas de uma molécula em um menor tempo e com custo reduzido (PAPA, 2017).

Diversos modelos *in silico* são úteis para avaliação de novas moléculas, princípios ativos, contaminantes ambientais, produtos de biotransformação, produtos de degradação, e tem sido realizada e proposta em diversos países e diferentes contextos (SANTOS, 2013). Muitas agências reguladoras têm investido na aplicação de testes alternativos, incluindo os modelos computacionais (*in silico*), como alternativas para avaliação da toxicidade de substâncias, segundo critérios e diretrizes apresentadas em sistemas de classificação de perigos, manuais referentes a ações regulatórias, guias de avaliação de risco, entre outros; visando racionalizar a utilização de animais e otimizar a relação custo-efetividade do processo de avaliação da toxicidade de substâncias (CRONIN, 2011; ECHA, 2008; 2009; OECD, 2007; WORTH, 2011).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial toxicológico de metabólitos isolados de *Siparuna guianensis* através de predição *in silico* visando possível obtenção de novos candidatos a fármacos desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A natureza deste trabalho, caracteriza-se em um estudo básico, sendo uma pesquisa experimental, transversal, 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. Baseia-se em estudar as estruturas químicas das moléculas estudadas avaliando múltiplas características simultaneamente, possibilitando prever os efeitos adversos de uma planta.

2.1 Escolha da Espécie

A espécie estudada foi a *Siparuna guianensis* (Siparunaceae) que é um arbusto de caule acinzentado e altura variando de 5 a 15 metros no Cerrado, monóico, perenifólio e com maior perda de folhas no período seco, embora apresente brotação ao longo de todo ano e com picos mais expressivos ao final do período chuvoso, além de apresentar maiores rendimentos de compostos voláteis na emissão dos botões florais, sendo seus frutos de cor verde a vermelho (VALENTINI et al., 2010b; VALENTINI et al., 2013).

As folhas aromáticas dessa espécie são as suas maiores reservas de óleos essenciais e de outros constituintes químicos de interesse biológico, como flavonóides, taninos e terpenóides. As plantas apresentaram considerável reserva de biomassa medicinal (3300 kg/ha) em floresta de savana brasileira localizada no bioma Cerrado (Bessa, 2014), conferindo importante reservatório genético e de matéria prima. Seu uso medicinal é popularmente difundido em vários países da América do sul, Brasil e pouco conhecido no Tocantins assim como é desconhecida a quantificação da sua biomassa medicinal (matéria prima) e são poucos os registros na literatura (MONTANARI, 2010; VALENTINI et al., 2010b) quanto ao seu potencial antimicrobiano, sem registros dessa abordagem no Estado do Tocantins, Brasil.

2.2 Constituintes do óleo essencial

As análises dos constituintes do óleo essencial foram realizadas em um equipamento GCMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu), com coluna tipo Rxi-1MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm (Restek) em temperatura de 50°C (2min), 3°C /min, até 250°C; Injetor 250°C Split (1:10) e Interface CG-MS a 260°C, com detector MS (Impacto eletrônico a 70eV) a 260°C. O gás de arraste usado foi o Hélio a 1.5 ml/min., com volume de injeção de 1 µl. O Software utilizado na avaliação dos constituintes presentes foi de aquisição de dados - GCMS Solution (Shimadzu) e as comparações dos espectros de massa e índices de retenção com aqueles da Biblioteca espectral: NIST 11; Arquivos*.qgd.; base no índice de retenção linear - IK (Índice de Kovats) para identificação dos componentes do óleo.

A avaliação cromatográfica do óleo essencial evidenciou a presença e a quantidade de 37 componentes do óleo essencial foliar de *S. guianensis*, resultante da correlação entre os dados do GC- FID e àqueles obtidos pelo índice de retenção de Kovat's (IK).

2.3 Ensaios *in silico*

2.3.1 Substância-teste

As substâncias testes analisadas foram escolhidas entre os 37 componentes identificados no óleo essencial foliar de *S. guianensis* com base na quantidade encontrada na pesquisa realizada por Bessa et al. (2015).

Todas as informações químicas da substância-teste serão obtidas do site Pubchem® (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.3.2 Teste toxicológico *in silico*

Para a análise da toxicidade teórica foi utilizado um software gratuito admetSAR para verificar a partir de predições o potencial Toxicidade AMES, Agentes Cancerígenos, Toxicidade Oral Aguda e Carcinogenicidade, que foi submetida ao estudo *in silico* dos parâmetros ADMET (toxicidade).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Foi realizada a seleção dos componentes do óleo essencial foliar de *S. guianensis* dentre os 37 que foram identificados a partir de uma análise daqueles que estavam em maior quantidade (Tabela 1). Foi realizada também pesquisa em artigos científicos com a finalidade de verificar a ação e função biológica de cada componente majoritário selecionado. Após, cada componente majoritário será analisado quanto a sua atividade farmacológica e toxicológica por ferramentas web.

Tabela 1. Componentes majoritários do óleo essencial foliar de *S. guianensis* para análise *in silico*.

Componentes majoritários	Classe	Ação	Função biológica	Referência
Mirceno	MT	Uso popular para gastrites e distúrbios do trato intestinal	analgésica e anti-inflamatória	scieloscielo
Biciclogermacreno	SQ	Danos em estruturas celulares. Possuem propriedades inseticida, bacteriana, e	ações antifúngicas bactericida,	
Exopóxido trans- α -bisaboleno	SQ	fungida	fitoterápica	scielo
Germacreno D	SQ	Usadas na medicina no combate de infecções	analgésica, antimalárica	scielo
Espatuleno	SQ	O mal cultivo da planta pode se tornar tóxica	antimicrobianas	scielo
Atractilona	SQ	As amostras se forem feitas de forma errada pode se trazer alterações nas composições	antiinflamatória	scielo
Curzereno	SQ	Interfere na formação da parede celular	antisséptica	scielo
α -bisabolol	SQ	Forte antioxidante atua no combate dos radicais livres	propriedade bactericidas, antimicóticas	scielo
2-undecanona	CET	Baixa eficiência no controle da atividade anticolinérgica	efeito larvicida	

Fonte: O próprio autor (2022)

Tabela 2. Análise de parâmetros toxicológicos de *Siparuna guianensis*.

Nome do modelo	Unidade	Valores máximos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Toxicidade AMES	Categórico (Sim/Não)	prevê se o composto será Ames positivo	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Máx. dose tolerada (humano)	Numérico (log mg/kg/dia)	menor ou igual a 0,477 log(mg/kg/dia)	0.617	0,894	1.154	1.203	0,817	0,272	-0,04	-	-
Inibidor de HERG I	Categórico (Sim/Não)	prevê se o composto será um inibidor hERG I	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor de HERG II	Categórico (Sim/Não)	prevê se o composto será um inibidor hERG I	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
Toxicidade aguda oral em ratos (LD50)	Numérico (mol/kg)	prevê o LD50 em mol /kg	1.643	1.646	1.608	1.634	1.668	1.914	1.836	2.053	1.602
Toxicidade Crônica Oral em Ratos (LOAEL)	Numérico (log mg/kg_bw/dia)	previsto em Log (mg /kg _bw / dia)	2406,00	1.386	1.358	1.413	1.168	1.199	1.121	1.858	2.33
Hepatotoxicidade	Categórico (Sim/Não)	prevê se está associado à função normal do fígado interrompida	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não
Sensibilização da pele	Categórico (Sim/Não)	prevê se está associado à sensibilidade da pele	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Toxicidade do <i>T.Pyriformis</i>	Numérico (log ug/L)	-0,5 log ug-L	0.894	1.338	1.843	1.671	1.118	2.256	2.362	0.656	1.465
Toxicidade de peixinhos	Numérico (log mM)	-0,5 log ug-L	0.736	0.595	0.102	0.257	1.176	0.458	-0.194	1.338	0.248

Legenda:

- 1 - Mirceno
- 2 - Biciclogermacreno
- 3 - Exopido Trans-a-bisabolene
- 4 - Germacreno D
- 5 - Espatulenol
- 6 - Atractilona
- 7 - Cruzereño
- 8 - X-bisabolol
- 9 - 2-undecanona

Em relação, a dose máxima tolerada é um teste que fornece uma estimativa de dose tóxica de produtos químicos em humanos, foi verificada que os compostos; Mirceno; Biciclogermacreno; Exopido Trans-a-bisabolene; Germacreno D, Espatulenol; foram considerados altos, isso significa que é tóxico para dose inicial máxima recomendada para produtos farmacêuticos em ensaios clínicos de fase I. Já os compostos Atractilona;

Cruzereno; X-bisabolol; 2-undecanona foram considerados baixos. A inibição dos canais de hERG I e II, codifica a subunidade formadora de poros dos canais de potássio, que é importante para a repolarização cardíaca. Quando é inibida causa o desenvolvimento da síndrome do QT longo adquirido levando à arritmia ventricular fatal (pkCSM). Nenhum dos compostos apresentaram potencial para inibição do hERG I, presumindo, assim, uma boa aceitabilidade quando relacionado a pessoas que possuem problemas cardiovasculares.

Já para o hERG II os compostos Mirceno; Biciclogermacreno, Exosido Trans-a-bisaboleno; Germacreno D, Espatuleno; Cruzereno, x-bisabolol; 2-undecanona não apresentaram potencial para causar alguma interação com os canais de potássio. Apenas a atractilona apresentou potencial para causar essa interação. Para Souza (2010), canais de potássio hERG são essenciais para a atividade elétrica normal no coração. A arritmia também pode ser induzida por um bloqueio dos canais hERG por um grupo de drogas surpreendentemente diversificado. Este efeito colateral é uma razão comum para a falha de drogas em testes de segurança pré-clínica, ambos apresentaram parâmetros aceitáveis, sendo os dois com baixo risco de inibição desses canais, presumindo assim, uma boa aceitabilidade quando relacionado a pessoas que possuem problemas cardiovasculares (Santana et al, 2020).

Na predição de hepatotoxicidade, analisa se um determinado composto está associado a um evento patológico ou fisiológico do fígado, causando a interrupção da função normal do mesmo. Na análise, os compostos Mirceno; Biciclogermacreno, Exosido Trans-a-bisaboleno; Germacreno D; Espatuleno; Atractilona; 2-undecanona, não apresentaram potencial de toxicidade. Já os compostos Cruzereno, e x-bisabolol foram apontados com potencial risco de toxicidade para o fígado.

A predição da sensibilização da pele, avalia se o composto está associado a um efeito adverso de produtos que pode induzir a uma dermatite alérgica quando aplicados por via dérmica. Foi verificado que os compostos, Mirceno; Exosido Trans-a-bisaboleno; Germacreno D; Cruzereno não apresentaram potencial de risco. Já os compostos Biciclogermacreno; Espatuleno; Atractilona; x-bisabolol, 2-undecanona apresentaram potencial de toxicidade, podendo causar um efeito adverso quando aplicado a pele.

A toxicidade do *T. Pyriformis* é uma bactéria protozoária, com sua toxicidade frequentemente utilizada como desfecho tóxico, para inibir 50% do crescimento (IGC50). É considerado tóxico, com um valor maior que $> -0,5 \log \mu\text{g}/\text{L}$. Foi verificado que os compostos Mirceno, Biciclogermacreno; Exosido Trans-a-bisaboleno; Germacreno D;

Espatuleno; Atractilona, Cruzeiroeno; X-bisabolol; 2-undecanona, apresentaram valores acima do permitido, por isso é considerado tóxico. A predição da toxicidade de peixinhos, representa a concentração de uma molécula necessária para causar a morte de 50% dos Minnows Flathead. É considerado com alta toxicidade aguda valores de LC 50 abaixo de 0,5mM (log LC < -0,3). Nenhum dos compostos apresentaram potencial para toxicidade de peixinhos.

Através da análise *in silico*, foi possível realizar a predição dos compostos químicos identificados no óleo essencial foliar de *S. guianensis* com base na quantidade encontrada na pesquisa realizada por Bessa et al. (2015). De acordo com Sousa, et al., (2020), a predição *in silico* é promissora pela rapidez, proporcionando segurança nos resultados do potencial de toxicidade, e também pela menor necessidade de testes em animais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No tocante a análise toxicológica *in silico* foi possível identificar que a maioria dos compostos majoritários são potencial candidato a ser empregado em pesquisas relacionadas com a atividade biológica frente a microrganismos. No entanto, é essencial a continuidade da pesquisa com a planta em questão, uma vez que a mesma apresenta um grupo de componentes e de substâncias que dispõe de ações farmacológicas, então é importante que haja a continuidade de realização de trabalhos utilizando esta espécie encontrada na região sul do Tocantins, uma vez que foram verificados compostos promissores e com menor toxicidade para futuras investigações em testes *in vitro* e *in vivo*, podendo ser um forte candidato a novo fármaco.

REFERÊNCIAS

- BONIL, L. N.; BUENO, S. M. **Plantas medicinais: benefícios e malefícios**. 2017.
- BORTOLUZZI, M. M.; SCHNITT, V.; MAZUR, C. E. **Efeito fitoterápico de plantas medicinais sobre a ansiedade: uma breve revisão**. Research, Society and Development, v. 9, n. 2, p. 47, 2020.
- BLUMENTHAL, M. et al. The complete commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines. 1. ed. Boston: M. **Integrative Medicine Communications**, 2018. p. 104-105.
- CHEHROUDI, S. et al. **Effects of *Melissa officinalis* L. on reducing stress, alleviating anxiety disorders, depression, and insomnia, and increasing total antioxidants in burn patients**. Trauma Monthly, v. 22, n. 4, 2016.

COLETA, M. et al. **Comparative Evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. And *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test.** Pharmacopsychiatry, v. 34, p. S20-1, 2001.

KENNEDY, D. O. et al. **Attenuation of laboratory-induced stress in humans after acute administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm).** Psychosom Med, v. 66, p. 607-613, 2004.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1998. 220 p.

MUÑOZ, F. **Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado.** Madrid: Mundi-Prensa, 1996. 365 p.

REIS, S. R. et al. **Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. in vitro sob influência do meio de cultura.** Acta Scientiarum Agronomy Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, 2009.

SANTANA, L. E. G. de S. et al. **Análise in silico da farmacocinética, da farmacodinâmica e da toxicidade de dois compostos isolados da *Moringa oleífera*.** Research, Society and Development, v. 9, n. 11, e81991110469, 2020.

SHAKERI, A. et al. ***Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology.** Journal of Ethnopharmacology, v. 188, p. 204-228, 2016.

SILVA, B. Q.; HAHN, S. R. **Uso de plantas medicinais por indivíduos com hipertensão arterial sistêmica.** R. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde, v. 2, n. 3, p. 36-40, 2015.

SOUSA, G. A. et al. **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, v. 9, n. 7, e790974679, 2020.

SOUZA, M. V. N. **Fármacos inibidores de fusão: uma nova estratégia no combate à replicação do vírus VIH.** Rio de Janeiro: Acta Farm. Bonaerense, 2010.