

Faculdades Integradas de Patos
 Curso de Medicina
 v. 3, n. 1, jan./mar 2018, p. 913-921
 ISSN: 2448-1394



ANÁLISE FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA *IN SILICO* DO FLAVONOIDE 5-HIDROXI-4', 7-DIMETOXIFLAVONA

PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS IN SILICO OF FLAVONOIDE 5-HYDROXY-4', 7-DIMETOXIFLAVONE

Vinicius Filgueiras de Oliveira
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa–Paraíba - Brasil
filgueirasv@gmail.com

Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira
 Hospital Universitário Ana Bezerra – UFRN – Santa Cruz – Rio Grande do Norte - Brasil
heloisambf@gmail.com

Cássio Ilan Soares Medeiros
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa – Paraíba – Brasil
cassioism@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos – Paraíba - Brasil
abrahão.farm@gmail.com

Thais Gaudêncio do Rego
 Universidade Federal da Paraíba – UFPB – João Pessoa –Paraíba - Brasil
gaudenciothais@gmail.com

RESUMO

Objetivo: Analisar o potencial farmacológico e toxicológico *in silico* do 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona utilizando softwares gratuitos.

Métodos: Inicialmente utilizou-se o software *Chemdraw* para o desenho da molécula, em seguida a análise da probabilidade da atividade da molécula foi realizada com o software *Pass online*. Na análise dos parâmetros farmacológicos, foi avaliado a biodisponibilidade oral teórica do produto, pela "Regra dos Cinco" de Lipinski com o software *Molinspiration Cheminformatics*. Finalmente, os parâmetros toxicológicos bem como o estudo teórico sobre o efeito carcinogênico, o teste de AMES e a toxicidade oral aguda foi efetuada no programa *admetSAR*.

Resultados: No *pass online* foi detectado 25 possíveis atividades farmacológicas dentre elas, anti-mutagênico, anti-hemorrágico, anti-inflamatório, antioxidante e anticarcinogênico. O flavonoide em estudo não vai contra nenhuma das Regras dos Cinco de Lipinski, ou seja, o produto apresenta uma boa biodisponibilidade oral teórica. O flavonoide também não apresentou toxicidade pelo teste AMES, não foi classificado como carcinogênico e a categoria de toxicidade oral aguda é a categoria III.

Conclusões: A partir desta análise computacional foi possível observar que o flavonoide em estudo apresenta promissoras atividades farmacológicas e toxicológicas *in silico* e a presença dos softwares *Pass online*, *Molinspiration* e *admetSAR* provaram serem viáveis como ferramentas alternativas nos testes.

Palavras-Chave: Fármacos. Software. Toxicologia.

ABSTRACT

Objective: To analyze the pharmacological and toxicological *in silico* potential of 5-hydroxy-4', 7-dimethoxyflavone using free software.

Methods: Initially the *Chemdraw* software was used for the design of the molecule, and then the analysis of the probability of the activity of the molecule was performed with the software *Pass online*. In the analysis of pharmacological parameters, the theoretical oral bioavailability of the product was evaluated by Lipinski's Rule of Five with *Molinspiration Cheminformatics* software. Finally, the toxicological parameters as well as the theoretical study on the carcinogenic effect, the AMES test and the acute oral toxicity were carried out in the *admetSAR* program.

Results: In the *Pass online* were detected 25 possible pharmacological activities among them, anti-mutagenic, anti-hemorrhagic, anti-inflammatory, antioxidant and anticarcinogenic. The flavonoid under study does not go against any of the Lipinski Five Rules, is the product has a good theoretical oral bioavailability. The flavonoid was also non-toxic by the AMES test, not classified as carcinogenic, and the acute oral toxicity category is category III.

Conclusions: Based on this computational analysis it was possible to observe that the flavonoid in the study presented promising pharmacological and toxicological activities *in silico* and the presence of *Pass online*, *Molinspiration* and *admetSAR* software proved to be viable as alternative tools in the tests.

Keywords: Drugs. Software. Toxicology.

Introdução

Os produtos naturais cada vez mais vêm recuperando espaço e importância nas indústrias farmacêuticas ao serem fortes aliados ao desenvolvimento de novas drogas. No entanto, o planejamento de novos fármacos é um processo árduo, que requer tempo e investimento aplicado a pesquisa e o desenvolvimento. Calcula-se que para obter uma nova droga segura e eficaz ao consumo humano, seja necessário entre 15-25 anos, com um gasto de 800 a 1,4 bilhões de dólares¹.

Além disso, a descoberta de novas drogas, como as oriundas de plantas medicinais, é um problema mais complexo do que era no passado. O problema na verdade é a complexidade das moléculas oriundas de plantas medicinais. Neste contexto, os estudos *in silico*, que utilizam sistemas computacionais que estocam, manipulam e mostram estruturas químicas e as informações associadas a elas se tornaram uma ferramenta importante e de uso crescente na pesquisa².

A computação se mostra promissora por permitir a detecção precoce de moléculas com problemas e por orientar a pesquisa na direção de moléculas com maior potencial³⁻⁵. A disponibilidade de programas computacionais e bancos de dados são ferramentas essenciais para a simulação do comportamento de moléculas no planejamento de novos fármacos. Novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise da relação estrutura-atividade, onde os dados estruturais podem ser obtidos por diferentes técnicas^{6,7}.

O desenho de drogas é um processo iterativo que começa quando um composto com perfil biológico interessante é identificado e termina quando tanto o perfil de atividade e a síntese de uma nova entidade química são otimizados².

Apesar da existência deste caminho científico, poucos são os estudos farmacológicos e toxicológicos de produtos naturais oriundos de plantas medicinais que se iniciam com os testes computacionais, tornando-se assim escasso o material literário sobre os softwares e os testes disponíveis e confiáveis.

Com base nisso, torna-se importante realizar os testes *in silico* de vários metabólitos secundários de plantas com possíveis propriedades terapêuticas, como os flavonoides, compostos polifenólicos constituído por três anéis contendo 15 átomos de carbono⁸.

Com base nisso, este trabalho buscou avaliar as atividades farmacológicas e toxicológicas *in silico* do flavonoide 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona com ferramentas computacionais (*Pass online*, *Molinspiration* e *admetSAR*), para destacar as principais atividades farmacológicas, a biodisponibilidade oral teórica e investigar o perfil toxicológico.

Métodos

Os ensaios laboratoriais referentes aos estudos *in silico* do flavonoide 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), com a colaboração do Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Para o início do estudo foi realizado o desenho da molécula no programa conhecido como *Chemdraw* (<http://www.chemspider.com/>) que possui a tarefa de transmitir as informações químicas referente a molécula. Com esses dados foi possível realizar os estudos *in silico* proposto no trabalho.

Em seguida, ocorreu a análise da probabilidade do desenvolvimento de propriedades farmacológicas do flavonoide em estudo utilizando o software *Pass online*, o qual é conhecido como uma ferramenta válida e altamente recomendada na previsão do espectro de atividade para substâncias com o destino de avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica sobre o organismo humano. Este programa fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividades biológicas com base na estrutura dos compostos orgânicos. O espectro de atividade biológica de um composto químico é o conjunto de diferentes tipos de atividade biológica, que refletem os resultados de interação do composto com várias entidades biológicas. *Pass online* dá várias facetas (características) da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade

"de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente ⁹.

Na análise dos parâmetros farmacológicos, foi avaliado a biodisponibilidade oral teórica do produto, pela "Regra dos Cinco" de Lipinski, que estabelece que pelo menos três de quatro requisitos devam ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade. Assim, para que compostos sejam absorvidos, devem possuir miLogP menor ou igual a 5,00; MM menor ou igual a 500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å² ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12; Máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), que é expresso pela soma de átomos de N e O; Máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH), expresso pela soma de OH e NH na molécula ¹⁰. Para esta predição, foi empregado o programa *Molinspiration Cheminformatics* (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

Com os parâmetros toxicológicos foi efetuado o estudo teórico sobre o efeito carcinogênico, o teste de AMES e a toxicidade oral aguda; pelo programa *admetSAR* (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>). Nesta análise, os resultados foram classificados como tóxicos (T) e não-tóxicos (NT); carcinogênico (C) e não-carcinogênico (NC).

A toxicidade oral aguda foi classificada com base nas quatro categorias da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos que divide os compostos de acordo com seu valor de DL_{50} (conhecida como a dose letal mediana). A categoria I contém os compostos com valores de DL_{50} inferior ou igual a 50 mg/kg, a Categoria II contém compostos com DL_{50} valores superiores a 50 mg/kg e inferior a 500 mg/kg, a Categoria III inclui compostos com DL_{50} valores superiores a 500 mg/kg e inferior a 5000 mg/kg e a Categoria IV consiste de compostos com DL_{50} valores superiores a 5000 mg/kg.

Resultadso e Discussão

A análise farmacológica do flavonoide 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona utilizando o software *Pass online* demonstrou que este composto tem a probabilidade de apresentar vários efeitos biológicos com importância terapêutica, como por exemplo: anti-mutagênico, anti-hemorrágico, anti-inflamatório, antioxidante e anticarginogênico, como mostra a tabela 1.

Tabela 1- Análise *in silico* do flavonoide 5-hidroxi- 4', 7-dimetoxiflavona com o software *Pass online*.

Nº Atividades	Pa	Pi	Atividade biológica
1	0,910	0,002	Antimutagênico
2	0,755	0,018	Antineoplásico
3	0,658	0,010	Anti-hipercolesterolêmico
4	0,627	0,011	Anticarcinogênico
5	0,619	0,004	Antioxidante
6	0,610	0,029	Antiinflamatório
7	0,560	0,009	Antisséptico
8	0,555	0,003	Anti-hemorragico
9	0,518	0,017	Antimicobacteriano
10	0,505	0,030	Antifúngico
11	0,486	0,026	Antiulcerativo
12	0,479	0,032	Antialérgico
13	0,459	0,014	Antitussígeno
14	0,442	0,021	Antituberculósico
15	0,410	0,029	Antiparasitário
16	0,369	0,038	Antibacteriano
17	0,340	0,006	Antifibrinolítico
18	0,336	0,034	Antiprotozoário
19	0,317	0,032	Antihelmíntico
20	0,311	0,283	Anti-isquêmico, cerebral
21	0,280	0,115	Antitrombótico
22	0,272	0,011	Anti-hematotóxico
23	0,242	0,097	Antitóxico
24	0,212	0,069	Anticatarático
25	0,164	0,143	Antiviral

Autoria própria (2017)

Estes resultados da análise *in silico* corroboram com outros dados da literatura científica que aponta os flavonoides como metabólitos secundários com um amplo número de atividades farmacológicas anti-inflamatória ¹¹, antiviral ¹²⁻¹⁴, antifibrótica ¹⁵, antioxidante ¹⁶, antineoplásica ¹⁷, antifúngica ^{18,19} e antibacteriana ^{20,21}. Por isso são utilizados para o tratamento de várias doenças e há séculos constituem alvos de pesquisas científicas. Além disso, esses metabólitos são conhecidos por inibir a peroxidação lipídica, agregação plaquetária, permeabilidade e fragilidade capilar e as atividades enzimáticas da ciclo oxigenase e da lipoxigenase. Eles promovem estes efeitos ao agirem como sequestradores de radicais livres, antioxidantes e quelantes de cátion divalente ^{22,23}.

A análise computacional do flavonoide em estudo utilizando o software *Molinspiration* revelaram propriedades expostas na tabela 2.

Tabela 2- Análise *in silico* do flavonoide 5-hidroxi- 4', 7-dimetoxiflavona com o software *Molinspiration*.

Comp.	miLogP	MM	nALH	Ndlh	nviolações	TPSA	nrotb
Flavonoide	3.54	298.29	5	1	0	68.91	3

Comp. – composto; miLogP – coeficiente de partição octanol/água; nALH – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; nviolações – número de violações; TPSA – área superficial polar topológica; nrotb – número de bandas rotáveis.

Autoria própria (2017)

Os resultados obtidos (Tabela 2) foram comparados com a Regra dos Cinco de Lipinski em que um composto deve apresentar os seguintes resultados, para ter boa biodisponibilidade oral: miLogP menor ou igual a 5,00; MM menor ou igual a 500 g.mol⁻¹; Área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å² ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12; Máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), que é expresso pela soma de átomos de N e O; Máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH), expresso pela soma de OH e NH na molécula¹⁰. Os compostos que violarem mais de um desses parâmetros poderão apresentar problemas de biodisponibilidade.

Além desses parâmetros analisados existe também o parâmetro número de bandas rotáveis (nrotb), que está relacionado à flexibilidade da molécula para a predição da biodisponibilidade, pois quanto maior a sua flexibilidade mais fácil a interação com a enzima. A flexibilidade da molécula está associada ao número de ligações rotáveis que corresponde ao número de ligações simples, fora de um anel, ligado a um átomo não terminal. Quanto mais ligações simples tiver a molécula, maior é a interação com a enzima facilitando a transposição da barreira, ou seja, maior a biodisponibilidade do fármaco. Através de alguns estudos, Veber e colaboradores²⁵ estabeleceram que compostos, com uma TPSA menor ou igual a 140 Å² e um número de ligações rotáveis menor ou igual a 10, apresentaram elevada probabilidade de boa biodisponibilidade oral.

Após a comparação pode-se observar que o flavonoide em estudo não vai contra nenhuma das Regras dos Cinco de Lipinski, ou seja, o produto apresenta uma boa biodisponibilidade oral teórica. Estes resultados estão de acordo com o estudo *in vivo* realizado por Liu & Hu²⁵, que mostrou que a flavona apigenina, o flavonoide em estudo, eram bem absorvidas no intestino.

Embora os produtos naturais sejam amplamente considerados de menor risco em comparação às drogas sintéticas, eles não são completamente livres da possibilidade de toxicidade ou outros efeitos adversos²⁶.

Sendo assim, há a necessidade de realizar estudos toxicológicos para determinação de parâmetros de segurança que não são observados durante o uso

popular dos derivados de plantas medicinais, constituindo assim, uma análise bastante relevante, uma vez que se caracterizam os efeitos deletérios das drogas produzidos a partir de sua administração, ajudando a decidir se uma nova substância deve ser adotada ou não para uso clínico ²⁷.

Um software que pode ser utilizado para avaliar a toxicidade computacional é o *admetSAR*. Por meio da análise do flavonoide utilizando este programa, pode-se observar que o flavonoide não apresentou toxicidade pelo teste AMES, não foi classificado como carcinogênico e a categoria de toxicidade oral aguda é a categoria III (Tabela 3).

Tabela 3 – Toxicidade *in silico* do flavonoide 5-hidroxi- 4', 7-dimetoxiflavona calculada no software *admetSAR*

Tipo de toxicidade	Toxicidade AMES	Carcinogênico	Toxicidade oral aguda
5-hidroxi- 4', 7-dimetoxiflavona	NT (não tóxico)	NC (não carcinogênico)	III (500 – 5000 mg/kg)

Autoria própria (2017)

Conclusão

Tendo em vista os resultados obtidos, pode-se concluir que o flavonoide 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona apresenta promissoras atividades farmacológica e toxicológica *in silico* e o uso de softwares como o *Pass online*, *Molinspiration* e *admetSAR* é uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos fármacos a base de produtos naturais.

Referências

1. Geldenhuys WJ, Gaasch KE, Watson M, Allen DD, Van Der Schyf CJ. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2006; 1(3-4): 127-132. *Fitoterapia. Acta Farm Bonaer*. 1990; 9(2): 131-138.
2. Richon AB. An Introduction to Molecular Modeling. *Mathematech*. 1994; 1(83).
3. Hansch C, Leo A, Mekapati SB, Kurup A. QSAR and ADME. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12(1): 3391-3400.
4. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *Nature*. 2003; 422(6934): 835-847.

5. Troullier P, Olliaro p, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public health policy failure. *The Lancet*. 2002; 359: 2188-2194.
6. Carvalho I, Pupo MT, Borges ADL, Bernardes LSC. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quim Nova*. 2003; 26(3): 428-438.
7. Patrick GL. (2001). *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2nd ed., Oxford University Press: Oxfor.
8. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2008; 7(3): 1089–1099.
9. Srinivas N, Sandeep KS, Anusha Y, Devendra BN. *In Vitro* Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid: An *In Silico* Approach. *Intenational Invention Journal of Biochemistry Bioinformatics*. 2014; 2(3): 20-29.
10. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 46(1-3): 3-26.
11. Theoharides TC, Alexandrakis M, Kempuraj D, Lytinas M. Antiinflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 2001; 14(1): 119-127.
12. Chiang LC, Chiang W, Liu MC, Lin CC. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(1): 194-198.
13. Kim HJ, Wood ER, Shin CG, Park H. A new flavonol gallate ester from Acer and its inhibitory activity against HIV-1 integrase. *Journal of Natural Products*. 1998; 61(1): 145-148.
14. Lin YM, Anderson H, Flavin MT, Pai YHS. *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids from *Rhus succedanea*. *Journal of Natural Products*. 1997; 60(1): 884-888, 1997.
15. Qi LH. Antifibrotic effects of genistein and quercetin *in vitro*. *Yao Xue Xue Bao*. 2001; 9(1): 648-651.
16. Boadi WY, Iyere PA, Adunyah, SE. Effect of quercetin and genistein on copper-and iron-induced peroxidation in methyl linolenate. *J Appl Toxicol*. 2003; 23(1): 363-369.
17. Lopez-Lozaro M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents*. 2002; 2(1): 691-714.
18. Oliveira-Filho AAO, Fernandes HMB, Sousa JP, Maia GLA, Silva DF, Barbosa-Filho JM, Oliveira TL, Lima EO, Pêsoa HLF. Antibacterial and Antifungal Potential of the Ethanolic Extract of *Praxelis clematidea* R.M. King & Robinson. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2013; 5(1): 183-185.

19. Stevenson PC, Haware MP. Maackiain in *Cicer bijungum* associated with resistance to Botrytis. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1999; 27(1): 761-767.
20. Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 306(1): 530-536.
21. Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshito T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza in ata*. *Phytochemistry*. 1998; 48(1): 125-129.
22. Chebil L, Humeau C, Falcimaigne A, Engasser J, Ghoul M. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*. 2006; 41(1): 2237-2251.
23. Middleton EJR, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000; 52(4): 673-751.
24. Veber Daniel F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45(12): 2615-2623.
25. Liu Y, Hu M. Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metab Dispos*. 2002; 30(1): 370-377.
26. De Smet PAGM. Health risks of herbal remedies: an update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2004; 76(1): 1-17.
27. Saraiva SRGL, Guimarães AL, Oliveira AP, Saraiva HCC, Oliveira-Júnior RG, Barros VRP, Menezes VG, Oliveira RA, Silva FS, Lima RS, Matos MHT, Amorim ELC, Almeida JRGS. Antioxidant activity and acute toxicity of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Afr J Biotechnol*. 2012; 11(1): 13998-14006.