

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Psidium araçá* Raddi (MYRTACEAE) E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL FARMACOLÓGICO POR *DOCKING* MOLECULAR

Paulo Gomes Pereira Júnior¹
Camila Macaúbas da Silva²
Ana Karoline Aquino da Silva³
Kaline de Araujo Medeiros⁴
Yanna Carolina Ferreira Teles⁵

RESUMO

As plantas são alvo de diversos estudos científicos devido ao seu potencial biológico e pela busca por novas moléculas bioativas. A grande aplicabilidade das plantas é justificada pela diversidade de moléculas produzidas pelo metabolismo celular. As espécies da família Myrtaceae, são comumente empregadas em casos de distúrbios gastrointestinais, hemorrágicos e doenças infecciosas. A espécie foco do presente estudo, *Psidium araçá* Raddi, é utilizada na alimentação e na medicina tradicional para tratamento de diarreia e como diurético. Apesar do seu uso, são escassos os estudos fitoquímicos da espécie. Considerando a vasta aplicação de espécies da família Myrtaceae, o presente estudo teve como objetivo isolar metabólitos de *P. araçá* e avaliar seu potencial farmacológico *in silico* por meio de *docking* molecular. Para tanto foram utilizadas técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Com o estudo, foi possível isolar e identificar a quercetina, um flavonóide que apresenta diversas atividades biológicas. O flavonóide isolado também apresentou energia de ligação com o receptor com valor comparável ao de fármacos com atividade antidiarreica, indicando seu possível mecanismo de ação que pode justificar o uso popular de preparações a base de extratos de araçá para tratar casos de diarreia.

Palavras-chave: Myrtaceae, *Psidium araçá*, Produtos Naturais, Fitoquímica, Quercetina.

INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas historicamente para diversos fins, principalmente devido à presença de metabólitos secundários em sua composição. Esses metabólitos são geralmente bioativos e podem ser utilizados como medicamentos, pesticidas, fragrâncias, agroquímicos, entre outros (JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018).

¹ Graduando do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, paulo_gomes55@outlook.com;

² Graduada pelo Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, karolaquino1193@gmail.com;

³ Graduada pelo Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, camilamacaubas@hotmail.com;

⁴ Graduanda do Curso de farmácia da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança- FACENE, kalinearaujo9197@hotmail.com;

⁵ Professora orientadora: Doutora, Universidade Federal da Paraíba - UFPB, yanna@cca.ufpb.br.

Nas últimas décadas tem se observado um grande avanço científico no estudo dos vegetais e seus metabólitos, com a identificação de várias moléculas importantes na alimentação e saúde. O interesse da população também se encontra cada vez mais elevado para a utilização de produtos à base de plantas com finalidade terapêutica (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo analisar a presença de constituintes químicos na espécie vegetal, podendo indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Essas classes de substâncias são produzidas a partir do metabolismo secundário das plantas e muitas apresentam atividades biológicas importantes, tais como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica, entre outras (SIMÕES et al., 2017).

A família Myrtaceae, alvo do estudo, está amplamente distribuída pelo hemisfério sul e compreende aproximadamente 4.630 espécies e 144 gêneros. No Brasil já foram relatadas 1.034 espécies e 23 gêneros (SILVA e MAZINE, 2016). Muitas mirtáceas apresentam elevado valor econômico, como o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), utilizado na produção de madeira e de aromatizantes. Outra espécie bastante comercializada é a goiabeira (*Psidium guajava*), fruteira apreciada pelas características de seus frutos consumidos *in natura* ou industrializados, que apresenta elevados teores de vitamina C e compostos antioxidantes (ZAHIN et al., 2017).

No que tange o uso na medicina tradicional, mirtáceas são empregadas principalmente em casos de distúrbios gastrointestinais, hemorrágicos, diabetes e doenças infecciosas. As partes mais usadas são as folhas, cascas e os frutos (SILVA e MAZINE, 2016). Um estudo realizado por Cruz e Kaplan (2004) listou diversas espécies utilizadas na medicina popular no Brasil. Dentre estas, 37 espécies eram pertencentes a família Myrtaceae, das quais cerca de 50% foram relatadas pela população com indicação para tratamento de diarreia ou disenteria.

Psidium araça Raddi é popularmente conhecido como araçá, araçazeiro, araçá-comum e araçá-mirim. É um arbusto bem distribuído no Brasil, principalmente na região da Zona da Mata Nordeste e floresce quase o ano todo. Suas folhas são tradicionalmente usadas para tratar problemas digestivos, diarreia e como diurético. As cascas são utilizadas em fábricas de curtumes devido ao alto teor de taninos, no entanto, há poucos estudos fitoquímicos sobre esta espécie.

Na atualidade, uma das técnicas mais utilizadas para realizar avaliação preliminar da interação de produtos naturais com seus alvos biológicos é a técnica de *docking* molecular. A docagem molecular, acoplamento molecular ou “*docking*”, como é rotineiramente conhecido, é um método que prediz a melhor orientação de uma molécula que se acopla a uma molécula-alvo, para formar um complexo que normalmente desenvolve uma atividade biológica. O *docking* é utilizado como ferramenta *in silico* para avaliação preliminar de um candidato a fármaco e sua interação com o possível seu alvo biológico, que na maioria das vezes é uma proteína (LENGAUER e RAREY, 1996).

A energia envolvida na ligação entre o ligante (fármaco) e o sítio ativo proteico é calculada a partir das ligações não covalentes entre grupos funcionais presentes na molécula bioativa e no sítio ativo proteico (receptor) (ANDREI et al., 2012). A técnica de ancoragem molecular gera estimativas de energias de ligação entre o ligante e a proteína alvo (RODRIGUES et al., 2012). No “*docking*” utilizando o ligante flexível se avalia diferentes conformações espaciais do ligante, sendo possível identificar qual é a mais provável conformação do ligante ao acoplar no sítio ativo da proteína alvo. Para cada conformação se obtêm as respectivas energias livres de ligação entre o ligante e o alvo, onde a menor energia será considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN et al., 2004).

O cálculo da energia livre de ligação não covalente entre o ligante e a proteína é obtido pela seguinte equação:

$$\Delta G_{\text{Ligação}} = G_{\text{Proteína-Ligante}} - [G_{\text{Proteína}} - G_{\text{Ligante}}]$$

A contribuição da energia livre é expressa como:

$$G = U - TS$$

Onde: U é a energia interna da molécula, T a temperatura absoluta do sistema (309K) e S é a entropia da molécula estudada (SMITH et al., 2007).

Considerando os relatos de uso de espécies de Myrtaceae na medicina popular para tratamento de diarreia, o presente estudo visa o isolamento de substâncias de *P. aração* e avaliação do seu potencial farmacológico *in silico* por *docking* molecular.

METODOLOGIA

As folhas da espécie *P. aração* foram coletadas no município de Areia-PB e identificadas pelo Prof. Dr. Leonardo P. Félix, do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Sisgen ACD1EAD). Uma excicata foi depositada no Herbário Jayme Coelho de Moraes, CCA - UFPB (código 11827).

O material botânico foi seco em estufa e triturado. O pó obtido foi submetido à maceração com hexano, acetato de etila e metanol, separadamente. As soluções extrativas obtidas de cada extração foram concentradas em um evaporador rotatório, obtendo-se os extratos hexano, acetato de etila e metanólico.

Uma amostra do extrato metanólico (2g) foi cromatografada em coluna Sephadex usando metanol como eluente.

A partir do procedimento, foram coletadas 30 frações. As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) sobre placas de sílica (Merk) para serem combinadas e recromatografadas. Os CCDA foram lidos sob uma luz UV/VIS (254 e 365 nm).

As frações 10 a 27 foram combinadas e submetidas a uma nova coluna Sephadex usando a mesma metodologia. A partir deste procedimento as frações 11 a 23 das frações foram combinadas e recromatografadas para purificar as frações 16-19 (Pa-1).

Para a identificação estrutural, os compostos purificados foram submetidos à análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN - Bruker Avance AV500), utilizando solventes deuterados.

Para realização do *docking* molecular, as proteínas alvo com seus respectivos ligantes inibidores foram baixados do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

As moléculas a serem testadas (*ligantes*) foram desenhadas e submetidas à acoplagem “proteína rígida-ligante flexível” utilizando o sistema gratuito autodock VINA no software *Pyrx*.

Para procedimento de *docking* (ligante – proteína) foi utilizada uma grade de aproximadamente 15 Å de raio e 0,30 de resolução que cobre o local do sítio de ligação, definido através de um ligante conhecido para cada enzima.

No *docking* se avalia diferentes conformações espaciais do ligante, sendo possível identificar qual é a mais provável conformação do ligante ao acoplar no sítio ativo da proteína alvo. Para cada conformação se obtêm as respectivas energias livres de ligação entre o ligante e o alvo, onde a menor energia será considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN et al., 2004).

Após o *docking*, a molécula em conformação mais estável na ligação com o sítio ativo foi selecionada para se analisar as interações não covalentes e aminoácidos responsáveis pela interação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto Pa-1 foi purificado como um pó amarelo. Os espectros de ^1H RMN mostraram um próton desprotegido em δ 12,47 indicando um próton quelado, comum em flavonoides. Um conjunto de 3 prótons acoplando *ortho* e *meta* com deslocamento químico δ 7,60 (dd, $J = 8,5$ and $2,2$ Hz), 7,56 (d, $J = 2,2$ Hz) e 6,80 (d, $J = 8,5$ Hz) indicaram a presença de um anel aromático com sistema ABX para a molécula. Dois dupletos em δ 6,17 e δ 6,37 acoplando *meta* com $J = 2,1$ Hz, sugeriram a presença de um anel A de flavonoides 5,7 di-substituídos.

A proposta foi reforçada pela visualização de sinais para 15 carbonos no espectro de ^{13}C RMN, com destaque para a carbonila da posição 3 do núcleo flavonoídico. A análise dos dados de RMN e comparações com dados da literatura permitiram identificar a substância como sendo o flavonoide quercetina, de ocorrência natural amplamente produzido por plantas (NAPOLITANO et al., 2012).

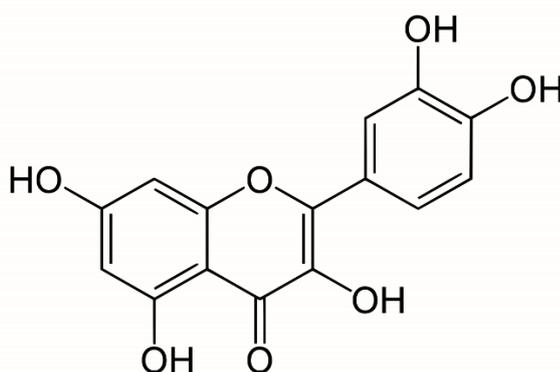


Figura 1. Estrutura molecular do flavonoide quercetina.

A quercetina é um que apresenta diversas atividades biológicas, como atividades antimicrobiana, antioxidante, antidiarréica e antiinflamatória. Assim, a produção desse composto pelo metabolismo secundário do vegetal pode justificar o uso medicinal das folhas de *P. araca*.

Tendo em vista os relatos do uso popular do araçá para tratar casos de diarreia, a substância isolada, quercetina, foi avaliada *in silico* por meio de *docking* molecular, quanto a sua interação com a proteína 4U14, que tem papel importante na motilidade intestinal.

Os resultados obtidos a partir do *docking* da molécula quercetina com a proteína alvo receptor intestinal da acetilcolina (PDBID: 4U14), indicaram uma energia de ligação para a quercetina e o alvo de -8,0 kcal/mol. Na Figura 1 é possível visualizar a estrutura do complexo *ligante-proteína alvo*, formado pela proteína 4U14 (maior parte em vermelho) e pela quercetina (em amarelo).

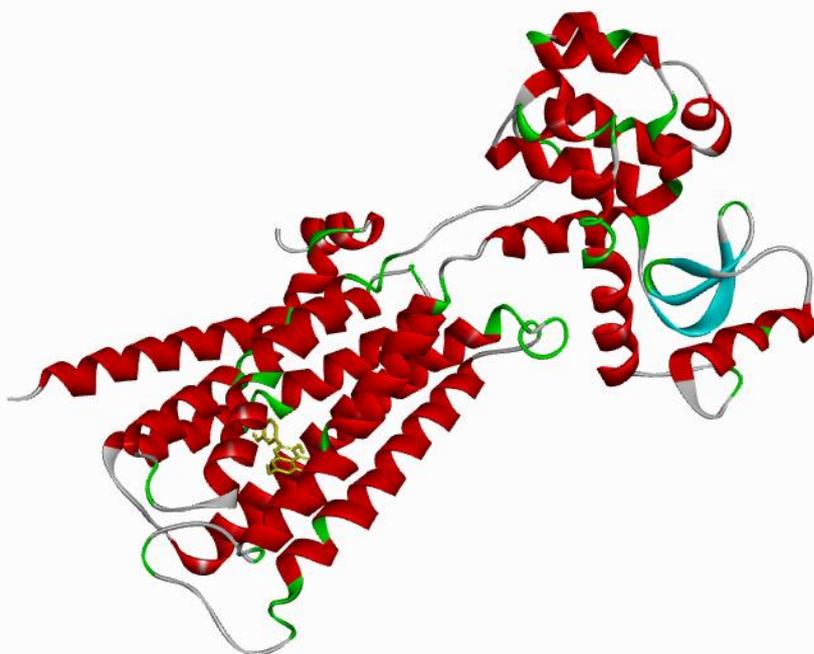


Figura 2. Complexo *ligante-proteína alvo*, formado pela proteína 4U14 (maior parte em vermelho) e pela quercetina (em amarelo).

A proteína 4U14 está envolvida no aumento da motilidade intestinal ocasionando diarreia. Portanto, a proteína configura-se como um alvo promissor para inibidores, que podem ser utilizados como candidatos à fármacos anti-diarreicos, que podem se ligar à sua estrutura e inibir sua ação, levando ao efeito desejado antidiarreico. Esta proteína é um dos alvos de atuação dos fármacos comerciais com efeitos antidiarreicos Lorapamida (-7.32 kcal/mol) e Triotopium (-9.2 kcal/mol) (Adnan et al., 2019).

Conforme os resultados obtidos, a quercetina apresentou energia de ligação com o receptor com valor comparável ao de fármacos com atividade antidiarreica, indicando seu

possível mecanismo de ação que pode justificar o uso popular de preparações a base de extratos de araquá para tratar casos de diarreia.

Como pode ser visualizado na Figura 2, os aminoácidos chave para interação com a quercetina foram a tirosina (148), serina (151), alanina (235), tirosina (529) e cisteína (532). Interessante observar a existência de interações polares, tais como as ligações de hidrogênio para a tirosina (529) e a serina (151), e apolares ocorrendo com os demais aminoácidos.

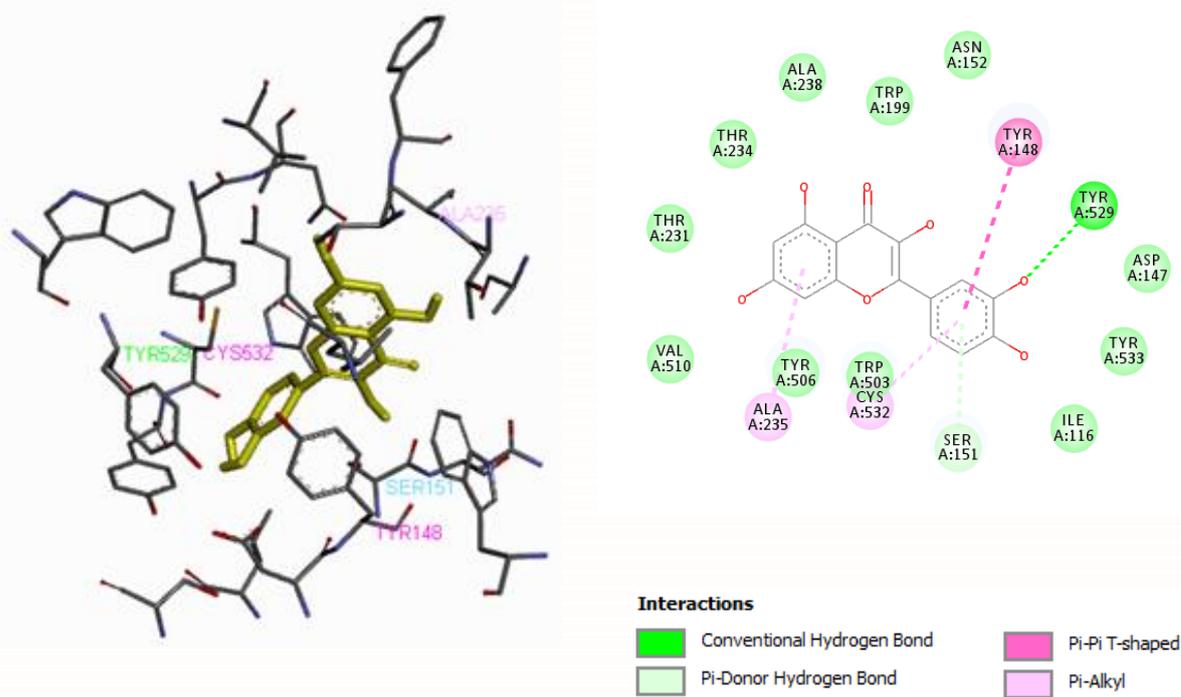


Figura 3. Quercetina interagindo com os aminoácidos do sítio ativo da proteína 4U14.

Outros estudos já descreveram o potencial antidiarreico *in vivo* da quercetina (ROHINI e DAS, 2010; RAJEEV et al., 2010), apontando diversos mecanismos de atuação. O flavonoide quercetina foi descrito como principal responsável pelo efeito antiarreico *in vivo* da espécie *Psidium guajava* (goiaba) (EZEKWESILI et al., 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo levou ao isolamento de um flavonoide das folhas de *P. araquá*, identificado como quercetina, relatada pela primeira vez para a espécie estudada. Este flavonoide têm sido relacionado à atividade antidiarréica e o *docking* molecular realizado no

presente trabalho contribuiu para ratificar o possível alvo de ligação do flavonoide quercetina para o desenvolvimento da sua ação antidiarreica.

REFERÊNCIAS

ADNAN M., NAZIN M., MOSTAFA A., AZAD M., PAUL A., UDDIN S., BARLOW J., FARUQUE M., PARK C., CHO D. Investigation of the Biological Activities and Characterization of Bioactive Constituents of *Ophiorrhiza rugosa* var. prostrata (D. Don) & Mondal Leaves through In Vivo, In Vitro, and In Silico Approaches. **Molecules**, vol. 24, p. 1367, 2019.

ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular: Um Curso Prático. São Paulo: **Manole**, 2012.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, vol. 11, n.1, p.47-52, 2004.

EZEKWESILI, J.O., NKEMDILIM, U.U, OKEKE, C.U. Mechanism of antidiarrhoeal effect of ethanolic extract of Psidium guajava leaves. **Biokemistri**, vol. 22, No. 2. 85-90, 2010.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, vol. 7, p.1-7, 2018.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews**, vol. 3, p. 935-949, 2004.

LENGAUER, T., RAREY, M. Computational methods for biomolecular “docking”. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, vol. 6, n. 3, p. 402–406, 1996.

NAPOLITANO, J. G. Complete ¹H NMR spectral analysis of ten chemical markers of *Ginkgo biloba*. **Magn Reson Chem**, vol. 50, n. 8, p. 569-75, 2012.

RAJEEV K, RAM JS, KHEMRAJ B, RAM K R, ARUN K. Pharmacological review on natural antidiarrhoeal agents. **Der Pharma Chemica**, vol. 2, p. 66-93, 2010.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, vol. 4, n. 6, p. 739-736, 2012.

ROHINI, R. M.; DAS, A. K. Antidiarrheal and anti-inflammatory activities of lupeol, quercetin, β -sitosterol, adene-5-en-3-ol and caffeic acid isolated from *Rhizophora mucronata* bark. **Der Pharmacia Lettre**, vol. 2, p. 95-101, 2010.

SILVA, A.T.; MAZINE, F.F. A família Myrtaceae na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, vol. 67, n.1, p. 203-224, 2016.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal de Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia plena**, vol. 6, n.2, 2010.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: **Artmed**, p. 848, 2017.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química. Rio de Janeiro: **LTC**, vol. 7, 2017.

ZAHIN, M.; AHMAD, I.; AQIL, F. Antioxidant and antimutagenic potential of Psidium guajava leaf extracts. **Drug Chem Toxicol.**, vol. 40, p.146-153, 2017.