

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN SILICO* DO MONOTERPENO GENIPIN

Daniele de Souza Siqueira¹; José Lucas Soares Ferreira¹; Joyce Natuelle Miranda Cavalcante¹; Elaine Roberta Leite de Souza¹; Abrahão Alves de Oliveira Filho²

¹ Acadêmicas do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) –
Campus Patos/PB.

E-mail: danieleodonto13@gmail.com

E-mail: Jlucas_sf@hotmail.com

E-mail: joyce_natielle@hotmail.com

E-mail: elaine_roberta5@hotmail.com

² Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) –
Campus Patos/PB.

E-mail: abrahão.farm@gmail.com

Resumo: Os conhecimentos sobre as plantas medicinais são de importância indiscutível para o desenvolvimento da sociedade. Apesar de notáveis progressos da terapêutica medicamentosa atual, a maior parte da população faz uso de plantas medicinais na atenção primária à saúde. Produtos naturais de origem vegetal têm sido bastante utilizados para fins medicinais, como fonte de compostos bioativos. Diante disso, grande é o interesse na área da pesquisa com produtos naturais quanto a sua atividade toxicológica a fim de regulamentar suas exigências quanto à qualidade, eficácia e segurança para então alcançar ensaios clínicos e o desenvolvimento de drogas. Dessa forma, destaca-se o monoterpene genipin, já testado e comprovado o seu efeito anti-inflamatório, efeito anti-oxidantes, além de cicatrizante. Esse trabalho procura analisar a toxicidade *in silico* do monoterpene Genipin, a metodologia *in silico* é um novo avanço da Toxicologia no contexto da avaliação e predição da toxicidade. Os parâmetros foram avaliados pela ferramenta admetSAR. Foram observados os parâmetros de Potencial Mutagênico AMES (AMES), Toxicidade Oral Aguda (TOA), Potencial Carcinógeno (PC) e Carcinogenicidade (Car). Os resultados de toxicidade apresentou-se como mutagênico pelo teste AMES, foi classificado como não carcinogênico, a categoria de toxicidade oral aguda foi III, que inclui compostos com DL50 de valores superiores a 500 mg/kg e inferiores a 5000 mg/kg.

Palavras chaves: Monoterpene; toxicidade; plantas medicinais.

INTRODUÇÃO

Desde a existência da humanidade o reino vegetal é de importância inegável para o desenvolvimento da sociedade. Conhecimentos foram sendo adquiridos e as plantas passaram a ter bastante relevância para nutrição e saúde do homem (DIAS et al., 2017).

A popularidade dos produtos de origem vegetal se dissemina na sociedade decorrente a cultura e os relatos sobre respostas positivas frente à doença com baixa ocorrência de efeitos colaterais negativos e, portanto, passam a ser reconhecidos quanto a sua eficácia. (DE CARVALHO et al., 2013). Em contraproposta o custo dos medicamentos industrializados, as dificuldades da população em receber assistência médica e a tendência de uso de produtos de origem natural têm contribuído para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal (ROSSATO et al., 2012).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (MARCIEL et al., 2015). A necessidade por parte do ramo farmacêutico na descoberta de novos fármacos eficazes para diversas doenças aumenta dia após dia, o reino vegetal nesse ponto torna-se “fonte” por conter plantas com atividades farmacológicas variadas, potentes e eficazes ressaltando dessa forma a importância do estudo das plantas medicinais (OMBITO, et al., 2014).

Dentre os vários produtos naturais e/ou sintéticos bastante pesquisados na farmacologia pode-se citar os compostos terpênicos, que são divididos de acordo com o número de carbono (C) em suas moléculas, em isoprenos ou hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C); diterpenos (20 C); sesterpenos (25 C); triterpenos (30 C); tetraterpenos (40 C) e polisoprenóides (n C) (BAKKALI et al., 2008; SPITZER, 2004).

Os monoterpenos, que são os principais constituintes da maioria dos óleos essenciais, compreendem uma série ampla de substâncias naturais e/ou sintéticas que já apresentaram diversas atividades biológicas testadas e confirmadas tais como: fungicida (CÁRDENAS-ORTEGA et al., 2005) e bactericida (CRISTANI et al., 2007).

Os iridoides, os compostos fenólicos e os carotenoides são metabólitos secundários de plantas e

são classificados como compostos bioativos em virtude de apresentarem diversos tipos de atividade biológica, como capacidade antioxidante e anti-inflamatória (AHMAD et al., 2008; BEARA et al., 2012; CHISTE et al., 2011). São monoterpenos que apresentam como característica peculiar a capacidade de reagir com aminoácidos e proteínas e formar compostos coloridos (FRANCIS, 2002).

Genipin é um composto iridóide e um agente de reticulação natural alternativo. Mostrou capacidade para formar produtos reticulados biocompatíveis e estáveis e mostrou citotoxicidade . Além disso, foi comprovado que a genipina tem efeito anti-inflamatório, cicatrização e efeitos anti-oxidantes e habilidades de inibir a peroxidação lipídica e produção de monóxido de nitrogênio (NO). Além disso, a genipina pode aumentar a capacidade mitocondrial potencial de membrana , aumenta os níveis de ATP e fecha os canais de KATP e estimula a insulina secreção . Finalmente, estudos mostraram que a genipina suprime as células epiteliais do cristalino alfa-TN4 e migração de fibroblastos subconjuntival induzida por TGF-b (JIN et al., 2004)

Assim como é de extrema importância à avaliação da ação biológica na triagem de estudo de um vegetal, são também os ensaios toxicológicos, que acrescentam informações para garantir a devida segurança na sua aplicação. Os experimentos toxicológicos têm por objetivo pré-dizer os níveis de ingestão das substâncias e os possíveis efeitos colaterais, que podem aparecer no homem após sua administração (MOURA et al., 2012).

A inserção de um novo medicamento no mercado pode ser demorada e dispendiosa até que se prove sua eficácia e segurança. O desenvolvimento de abordagens *in silico* otimiza o tempo e os gastos necessários para trazer um medicamento para o mercado. Tornando os perfis de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) previsíveis, resultando em um processo rápido de descoberta de medicamentos (WANG, et al., 2015; DIRAR et al., 2016).

A Toxicologia Computacional pode ser definida como a área da Toxicologia, na qual aplica-se modelos computacionais e matemáticos para a predição de efeitos adversos, e, para o melhor entendimento do(s) mecanismo(s) através do(s) qual(is) uma determinada substância provoca o dano. Nesta grande área do conhecimento, destaca-se a produção de ferramentas computacionais de avaliação preditiva da toxicidade, a partir da integração de avanços em informática e bioinformática, estatística, química

computacional, biologia e toxicologia (IUPAC, 2007; USEPA, 2003, 2009, 2010).

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico das plantas medicinais e sua importância, esse trabalho procura analisar a toxicidade *in silico* do monoterpene Genipin, presente em plantas medicinais testadas na literatura e amplamente utilizadas na medicina popular.

METODOLOGIA

Ensaio *in silico*

1.1 Local da Pesquisa

Os ensaios ocorreram no Laboratório de Fitoterapia, Bioquímica e Microbiologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), coordenado pelo Prof^o. Dr^o. Abraão Alves de Oliveira Filho.

1.2 Parâmetros toxicológicos

Os parâmetros toxicológicos teóricos foram calculados com o objetivo de analisar se a substância possui as características essenciais para que possa ser considerado como possível fármaco e, dessa forma, evitar gastos desnecessários durante o processo de pesquisa & Desenvolvimento (AFONSO, 2008). Esses parâmetros são: Potencial Mutagênico AMES (AMES), Toxicidade Oral Aguda (TOA), Potencial Carcinógeno (PC) e Carcinogenicidade (Car). Os parâmetros relacionados à toxicidade foram avaliados pela ferramenta admetSAR (SOUZA, 2015).

1.3 AdmetSAR

O admetSAR é um banco de dados aberto, com sistema de pesquisa de texto e estrutura molecular, continuamente atualizado que coleta, organiza e gerencia dados de propriedades associados à Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade (ADMET) disponíveis na literatura publicada. Em admetSAR, mais de 210.000 dados anotados sobre ADMET para mais de 96.000 compostos exclusivos com 45 tipos de propriedades associadas à ADMET. O banco de dados

fornece uma interface simples para consultar um perfil químico específico, usando o número de registro no Chemical Abstract Service - CAS, o nome comum ou a similaridade de estrutura (CHENG et al., 2012).

RESULTADOS E DISSCUSSÕES

A fruta Gardenia tem sido tradicionalmente usada como remédio popular durante séculos em países asiáticos. A extração com etanol foi usada para obter um extrato (GFE) que contém dois constituintes conhecidos, geniposídeo e genipin, que foram subsequentemente avaliados quanto à atividade antiinflamatória. Ao final dos testes, observou-se que o genipin, em vez de geniposídeo, é o principal componente antiinflamatório da gardênia (KOO, et. al., 2006).

Butler et. al. (2003) ao estudarem o genipin e seus mecanismos de ação, observou que o monoterpeno em questão apresentava baixa toxicidade. Ozaki et al. (2002) avaliaram a genotoxicidade do extrato dos frutos de gardênia, através do teste de Ames. Os resultados demonstraram que o extrato não apresentou atividade mutagênica.

Para os parâmetros de toxicidade foi possível observar que o composto avaliado apresentou potencial mutagênico pelo teste AMES, foi classificado como não carcinogênico pelo PC, não apresentando Car . A TOA foi classificada em III, que inclui compostos com DL_{50} de valores superiores 500mg/kg e inferiores a 5000mg/kg segundo a USEPA. Os resultados estão descritos na tabela a seguir.

Tabela 1. Resultados para os testes de toxicidade realizados na ferramenta AdmetSAR e suas respectivas probabilidades.

TESTE	RESULTADO	PROBABILIDADE
TOA	Classificação III segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA)	0.5546
PC	Não Carcinogênico	0.9490
Car	-	0.7068

(-) Não relevante

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos após os testes, foi possível concluir que o genipin apresenta moderada toxicidade com relação aos parâmetros usados pela USEPA para TOA, e não apresenta potencial carcinogênico, entretanto se apresentou como mutagênico, dessa forma, necessita de novos testes viabilizando o seu uso e estudo terapêutico.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. F.. **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos in silico de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana.** [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008. 136p.

AHMAD, I., CHEN, S., PENG, Y., CHEN, S., & XU, L. (2008). Lipoxygenase inhibiting and antioxidant iridoids from *Buddleja crispa*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 23(1), 140-143.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.446-475, 2008.

BEARA, I. N., LESJAK, M. M., ORCIC, D. Z., SIMIN, N. D., CETOJEVIC-SIMIN, D. D., BOZIN, B. N., & MIMICA-DUKIC, N. M. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. **Lwt-Food Science and Technology**, 47(1), 64-70. 2012.

BUTLER, M. F.; NG, Y.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. **Journal of**

Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, v. 41, n. 24, p. 3941-3953, 2003.

CÁRDENAS-ORTEGA, N. C.; ZAVALA-SÁNCHEZ, M. A.; AGUIRRE-RIVERA, J. R.; PEÄREZ-GONZÄLEZ, C.; PEÄREZ-GUTIENÄRREZ, S. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *I Mexicana* Gray. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p. 4347–4349, 2005.

CHENG, F. et al. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. 2012.

CHISTE, R. C., MERCADANTE, A. Z., GOMES, A., FERNANDES, E., LIMA, J. L. F. D., & BRAGAGNOLO, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, 127(2), 419- 426.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four Monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for Their antibacterial activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.55, p. 6300–6308, 2007.

DE CARVALHO JS, MARTINS JD, MENDONÇA MD, DE LIMA LD. **Uso popular das plantas medicinais na comunidade da Várzea**, Garanhuns-PE. 2013; 12(2): p. 58-65.

DIAS GT, LIMA CM, LIRA AB, RAMALHO JA, OLIVEIRA KM, DINIZ MF. Toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides*. **Acta Brasiliensis**. 2017 Feb 15;1(1):8-12.

FRANCIS, F. J. (2002). Food colorings. In D. B. MacDougall (Ed.), *Colour in Food: Improving Quality* (pp. 297-330). Boca Raton: CRC Press.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. IUPAC Glossary of Terms Used in Toxicology. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 7, p. 1153-1344, 2007. Disponível em: <<http://sis.nlm.nih.gov/enviro/iupacglossary/glossaryi.html>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

JIN, J.; SONG, M.; HOURSTON, D.J. Novel chitosan based films cross-linked by genipin

with improved physical properties. *Biomacromolecules* 2004, 5, 162–168.

KOO, H. et al. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. *Journal of ethnopharmacology*, v. 103, n. 3, p. 496-500, 2006.

MARCIEL, M. A. M., et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Cad. Prospecção*, Salvador, vol. 8, n. 3, p. 478-487, jul./set. 2015.

MOURA, NS, VASCONCELOS, ACM, BERNABÉ, BM, TEIXEIRA, L JQ, SARAIVA, SH. Ensaio toxicológicos: Um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. *enciclopédia biosfera*. Centro Científico Conhecer. 2012; 8(15): p.1945.

OMBITO, J.O.; SALANO, E.N.; YEGON, P.K.; NGETICH, K.; MWANGI, E.M. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *J Sci Innov Res*. 2014;3(4):460-6.

OZAKI A, KITANO M, FURUSAWA N, YAMAGUCHI H, KURODA K, ENDO G. Genotoxicity of gardenia yellow and its components. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1603–10.

ROSSATO BADKE M, DENARDIN BUDÓ MD, TITONELLIE ALVIN NA, DOLEJAL ZANETTI G, HEISLER EV. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. *Texto & contexto enfermagem*. 2012; 21(2).

SOUZA, J. P. A.. *Estudo de ancoragem molecular de derivados de ácido cinâmico frente à enzimas do ciclo replicativo do HIV-1* (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná). [Trabalho de Conclusão de Curso]. Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2015. 91p.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Computational Toxicology Research Program**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ncct/>> Acesso em: 10 mai. 2018.

WANG Y, XING J, XU Y, ZHOU N, PENG J, XIONG Z, LIU X, LUO X, LUO C, CHEN K, ZHENG M. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Quarterly reviews of biophysics*. 2015 Nov;48(4):488-515.