



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN SILICO* DOS FLAVONOIDES DE *Lantana camara* L. FRENTE À ENZIMA CICLOOXIGENASE-2

EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY IN SILICO OF FLAVONOIDS FROM *Lantana camara* L. AGAINST THE ENZYME CYCLOOXYGENASE-2.

Ari Sérgio de Oliveira Lemos¹, Lara Melo Campos¹, Otávio de Assis Cruz², Livia Lacerda Netto², Priscila Vanessa Zabala Capriles Goliatt², Rodrigo Luiz Fabri^{1}*

¹Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Juiz de Fora, MG, Brasil.

²Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Ciência da Computação, Instituto de Ciências exatas, Juiz de Fora, MG, Brasil.

*Autor para Correspondência: rodrigo.fabri@ufff.edu.br

RESUMO

Lantana camara L. é uma rica fonte de substâncias com propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, inseticida, anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação dos flavonoides de *L. camara* na enzima ciclooxigenase-2, para identificar quais dessas substâncias possuem melhor atividade anti-inflamatória. Uma revisão de literatura foi realizada antes das análises *in silico*. No estudo, 18 artigos científicos foram encontrados e 4 deles descreviam a estrutura química totalmente elucidada dos flavonoides. As substâncias apigenina, hispidulina, isovitexina, lantanosideo, linarosideo, luteolina, pectolinarigenina, pectolinarina e vitexina foram selecionadas. O perfil ADMET foi realizado pelas plataformas Swiss ADME[®] e PKCSM[®] e os alvos farmacológicos pelas plataformas Swiss target prediction[®] e PASS online[®]. O docking molecular foi realizado pelos softwares Modeller 9.25[®], AutoDock tools[®] e AutoDock Vina[®]. O naproxeno foi usado como controle positivo. As substâncias



mostraram elevados níveis de segurança e baixa toxicidade. Em relação aos alvos farmacológicos, todos os flavonoides apresentaram atividade anti-inflamatória, sendo alguns desses alvos a COX-2. O *docking* molecular revelou que a luteolina, hispidulina e apigenina foram as substâncias mais promissoras e que os flavonoides de *L. camara* interagem com resíduos His 90, Arg 120, Tyr 355 e Tyr 385. A COX-2 serve como uma interface entre a inflamação e o câncer, logo, a sua inibição torna-se promissora para o tratamento dessas patologias. Concluímos que os flavonoides de *L. camara* são substâncias promissoras na inibição da COX-2 devido a interação com os resíduos do sítio ativo e apresentam baixa toxicidade.

Palavras-chave: *Lantana camara* L. COX-2. *In silico*.

ABSTRACT

Lantana camara L. is a rich source of substances with antibacterial, antifungal, antiviral, insecticide, anti-inflammatory and antioxidant properties. The objective of this work was to evaluate the action of *L. camara* flavonoids on the cyclooxygenase-2 enzyme, to identify which of these substances have the best anti-inflammatory activity. A review was performed before the *in silico* analyses. In the study, 18 articles were found and 4 of them described the fully elucidated chemical structure of the flavonoids. The substances apigenin, hispidulin, isovitexin, lantanoside, linarioside, luteolin, pectolinarigenin, pectolinarin and vitexin were selected. The ADMET profile was performed by the Swiss ADME[®] and PKCSM[®] platforms and the pharmacological targets by the Swiss target prediction[®] and PASS online[®] platforms. Molecular docking was performed using Modeller 9.25[®], AutoDock tools[®] and AutoDock Vina[®] software. Naproxen was used as a positive control. The substances showed high levels of safety and low toxicity. Regarding the pharmacological targets, all flavonoids showed anti-inflammatory activity, with some of these targets being COX-2. Molecular docking revealed that luteolin, hispidulin and apigenin were the most promising substances and that flavonoids from *L. camara* interact with residues His 90, Arg 120, Tyr 355 and Tyr 385. COX-2 serves as an interface between inflammation and cancer, so its inhibition holds promise for the



treatment of these pathologies. We conclude that *L. camara* flavonoids are promising substances in COX-2 inhibition due to their interaction with active site residues and have low toxicity.

Keywords: *Lantana camara* L. COX-2. *In silico*.

INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica desencadeada por uma variedade de fatores, dentre eles, patógenos, células danificadas e compostos tóxicos. Esses fatores podem induzir respostas inflamatórias agudas e/ou crônicas devido a ativação de diferentes vias, como por exemplo, as vias dependentes de NF- κ B, MAPK e JAK-STAT (CHEN *et al.*, 2018). No processo inflamatório, também é possível observar algumas mudanças visuais clássicas, como: vermelhidão, inchaço, calor, dor e perda de função (LIU *et al.*, 2017). A sensação de calor e vermelhidão é causada pelo aumento do movimento sanguíneo nos vasos dilatados. O inchaço (edema) é oriundo do aumento da passagem de células e fluidos oriundos dos vasos sanguíneos para os tecidos circundantes danificados. A dor por sua vez, é devido aos efeitos diretos de mediadores inflamatórios. Já a perda de função, é devido a perda de mobilidade causada pelo edema, dor, ou pela formação de tecido de cicatrização no local afetado (PUNCHARD *et al.*, 2004).

Um dos principais alvos dos anti-inflamatórios disponíveis no mercado é a ciclooxigenase-2 (COX-2), uma enzima chave do processo inflamatório e que está relacionada com o metabolismo do ácido araquidônico (AA) (GANDHI *et al.*, 2017). Um dos produtos da reação catalítica do AA com essa enzima são as prostaglandinas, substâncias que medeiam tanto funções homeostáticas, quanto mecanismos patogênicos de origem inflamatória (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Além disso, a COX-2 serve como uma interface entre a inflamação e câncer, sendo que a sua indução exacerbada está relacionada a patogênese de vários tipos de doenças malignas (ASHAL *et al.*, 2020).



Embora os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) sejam uma das classes de fármacos mais comumente prescritas para dor e inflamação devido a sua ação na COX-2, estes não são isentos de efeitos adversos, causando desde úlceras péptica, insuficiência renal aguda, acidente vascular cerebral, até infarto do miocárdio devido a seu uso prolongado (SOSTRES *et al.*, 2010). Logo, a busca de novas alternativas terapêuticas, principalmente de origem natural, para reduzir a dor e a inflamação tem crescido ao longo dos anos (MARCUM e HANLON, 2010; MAROON, BOST e MAROON, 2010; ASWAD *et al.*, 2018). Muitos desses fitocompostos funcionam inibindo as vias inflamatórias de maneira similar aos AINEs (inibição da COX), mas podem atuar também, inibindo vias inflamatórias relacionadas a ativação do fator NF-kB (MAROON, BOST e MAROON, 2010).

Lantana camara L. é uma espécie difundida no Brasil e conhecida por vários nomes populares, entre eles: “chumbinho”, “erva-doce”, “cambará-de-espinho”, “cambará”, “cambará-de-duas cores”, “cambará-juba”, “cambará-de-cheiro”, “cambará-de-lead”, “cambará-vermelho”, “cambará-real”, “cambará-kid”, “cambará de folha grande”, “Lantana”, “lantana-espinhosa (FONSECA *et al.*, 2019). Essa planta é considerada tanto uma erva daninha quanto uma planta ornamental e medicinal, sendo uma fonte importante de compostos orgânicos naturais (BEZERRA *et al.*, 2016). Além disso, todas as partes dessa planta apresentam algum tipo de atividade, tanto biológica (antimicrobiana, fungicida, inseticida e nematicida) quanto farmacológica (antioxidante, anti-inflamatório e atividade diurética) (KALITA *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2016).

Alguns estudos vêm demonstrando o potencial anti-inflamatório de *L. camara* sobre a enzima COX-2 (ASHAL *et al.*, 2020). Dentre os metabolitos com potencial anti-inflamatório destacam-se os flavonoides, substâncias com amplo potencial biológico (MALEKI *et al.*, 2019). Embora exista uma série de alvos e mecanismos anti-inflamatórios dos flavonoides, o mais importante é a inibição das enzimas geradoras de eicosanoides, como as isoformas da COX (FARZAEI *et al.*, 2019). *L. camara* é uma espécie rica em flavonoides, entretanto, nenhum estudo relacionado ao mecanismo de inibição de seus flavonoides com a COX-2 ainda foi realizado. Logo, o objetivo deste



estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório *in silico* dos flavonoides de *L. camara* por meio de análises do perfil ADMET, dos possíveis alvos farmacológicos e do *docking* molecular desses flavonoides na enzima COX-2.

MATERIAL E MÉTODOS

Revisão de literatura

Antes da realização das atividades *in silico*, uma revisão de literatura foi realizada em periódicos indexados nas bases de dados Google acadêmico, *Scielo* e *Pubmed*. Foram encontrados 18 artigos científicos quando utilizadas as palavras chaves “*Lantana camara and flavonoids*” e “*Lantana camara and inflammation*”, sendo que 4 dos artigos encontrados descreviam a estrutura química totalmente elucidada dos compostos utilizados, sendo este, o critério de inclusão para a utilização das substâncias encontradas.

Perfil ADMET e possíveis alvos/atividades farmacológicas

Após a revisão de literatura, os flavonoides de *L. camara* tiveram suas estruturas químicas projetadas no *software Chem Sketch*[®] onde foram obtidas a notação *smile* de cada substância. As notações *smile* foram utilizadas para avaliar o perfil ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) pelas plataformas online *Swiss ADME*[®] (DAINA; MICHIELIN e ZOETE, 2017) e PKCSM[®] (PIRES; BLUNDELL e ASCHER, 2015) e também para avaliar os possíveis alvos farmacológicos/atividades biológicas pelas plataformas online *Swiss target prediction*[®] (DAINA; MICHIELIN e ZOETE, 2019) and *PASS online*[®] (FILIMONOV *et al.*, 2014).

Modelagem molecular

A modelagem molecular da enzima ciclooxigenase 2 seguiu a metodologia De Assis *et al.* (2020) com adaptações. Para o estudo de modelagem molecular foi construído



um modelo da COX-2 oriunda do organismo *Mus musculus*, a partir da sequência: Uniprot ID = Q05769. O estudo foi realizado por meio de modelagem comparativa. Desta forma, foram pesquisadas estruturas cristalográficas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) a fim de encontrar *templates* adequados para a construção dos modelos 3D. A construção dos modelos foi realizada utilizando o software *Modeller v9.25*[®] tendo o *template* 3NT1 como estrutura base. Em seguida, a qualidade dos modelos foi analisada pelo gráfico de *Ramachandran* gerado pelos programas *PROCHECK*[®] e *Molprobit*[®].

Estudos de docking molecular

As análises de docking molecular foram realizadas de acordo com De Assis *et al.* (2020) seguida de algumas modificações. A estrutura 2D dos flavonoides de *L. camara* foram projetadas no software *Chem Sketch*[®] e otimizadas no software *Avogadro v1.1*[®], utilizando o campo de força MMFF94s e o algoritmo *steepest descended*. Na segunda etapa, os ligantes foram preparados no *Auto Dock Tools v1.5.6*[®] (ADT), onde foram adicionadas as cargas parciais *Gasteiger*, ligações rotacionáveis e hidrogênios. Após esse passo, os arquivos *pdbqt* foram gerados. A enzima COX-2 obtida por modelagem comparativa foi usada como um receptor e os flavonoides como ligantes flexíveis. A estrutura tridimensional da COX-2 teve sua estrutura preparada no *Auto Dock Tools v1.5.6*[®] onde foram adicionados os hidrogênios, as cargas *Gasteiger* e gerado o arquivo *pdbqt*. A *grid box* usada foi: dimensões de 22 Å × 22 Å × 22 Å, coordenadas de X = 126,798, Y = 115,912 e Z = 89,696, e *spacing* de 0,375 Å. O *docking* molecular foi realizado com *Auto Dock Vina*[®]. O programa forneceu várias conformações de *docking* (9 *poses*) que foram avaliadas no software *Pymol 2.4.1*[®]. Foi selecionada a estrutura mais promissora com base nos parâmetros energéticos e nas interações formadas entre a COX-2 e os flavonoides. Os valores de *Ki* (Constante de afinidade dada em µM) foram calculados para as melhores *poses* com base na energia de ligação gerada pelo *Auto Dock Vina*[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estrutura das substâncias químicas avaliadas

Com o intuito de encontrar os flavonoides de *L. camara* que possuíam a estrutura química completamente elucidada, uma revisão de literatura foi realizada e, assim, nove estruturas químicas de flavonoides foram selecionadas, dentre elas agliconas e glicosídeos (Tabela 1).

Tabela 1- Flavonoides com a estrutura química totalmente elucidada e descrita na espécie *Lantana camara* e utilizados nas análises *in silico*.

Flavonoides	Referência
Linarosideo	BEGUM <i>et al.</i> , 2008
Lantosideo	BEGUM <i>et al.</i> , 2008
Pectolinarina	FONSECA <i>et al.</i> , 2019
Hispidulina	JUANG <i>et al.</i> , 2005
Pectolinarigenina	JUANG <i>et al.</i> , 2005
Vitexina	KASSEM <i>et al.</i> , 2011
Isovitexina	KASSEM <i>et al.</i> , 2011
Luteolina	KASSEM <i>et al.</i> , 2011
Apigenina	KASSEM <i>et al.</i> , 2011

A pesquisa de novas terapias anti-inflamatórias é de grande interesse, uma vez que os fármacos de escolha no tratamento de diversas doenças como artrite, reumatismo e também no alívio de diversas dores não estão isentos de efeitos adversos (ZARGHI *et al.*, 2011; WONGRAKPANICH *et al.*, 2018). Atualmente existe um aumento na busca por substâncias naturais, onde a pesquisa de compostos biologicamente ativos auxilia na descoberta de novas moléculas, adquirindo credibilidade para o uso popular (JOHNSON *et al.*, 2019). Além disso, substâncias como os flavonoides estão amplamente associados com atividades anti-inflamatórias (FARZAEI *et al.*, 2019) o que torna relevante o estudo do seu mecanismo para uma das principais enzimas inflamatórias, a COX-2. Desta forma, tal achado auxilia na compreensão do potencial anti-inflamatório de plantas medicinais ricas nessas substâncias, como é o caso de *L. camara*.

Perfil ADMET

Antes da análise de *docking* molecular, as substâncias selecionadas foram avaliadas quanto as suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. As notações *smile* foram utilizadas para “alimentar” as bases de dados Swiss *ADME*[®] e PKCSM[®], que forneceram informações importantes sobre as propriedades dos compostos avaliados. Os resultados oriundos das propriedades físico-químicas demonstraram que a maioria dos flavonoides de *L. camara* possuem características promissoras para serem administrados por via oral, uma característica também observada para o controle positivo naproxeno (Tabela 2).

Tabela 2- Propriedades físico-químicas dos flavonoides de *Lantana camara* utilizados nas análises *in silico*.

Substância	Peso molecular (g/mol)	Log P	Número de grupos doadores de hidrogênio	Número de grupos aceptores de hidrogênio	Violações de Lipinski	Administração oral
Apigenina	270,24	2,57	3	5	0	Sim
Hispidulina	300,26	2,58	3	6	0	Sim
Isovitexina	432,38	0,09	7	10	1	Sim
Lantosideo	518,47	0,93	4	10	2	Sim
Linarosideo	476,43	0,36	5	11	1	Sim
Luteolina	286,24	2,28	4	6	0	Sim
Pectolarigenina	314,29	2,88	2	6	0	Sim
Pectolarina	622,576	-0,78	7	15	3	Não
Vitexina	432,38	0,09	7	10	1	Sim
Naproxeno	230,26	3,03	1	2	0	Sim

Em sequência foi analisado as propriedades farmacocinéticas dos flavonoides utilizados neste estudo. Os resultados encontrados demonstraram propriedades interessantes como ausência de hepatotoxicidade, ausência de potencial mutagênico e



permeabilidade cutânea em todos os compostos avaliados. Além disso, foi observada uma diferença entre os perfis de absorção dos diferentes flavonoides, demonstrando que as agliconas apresentam uma maior capacidade de serem absorvidas no trato gastrointestinal do que os glicosídeos (Tabela 3).

Tabela 3- Propriedades farmacocinéticas dos flavonoides de *Lantana camara* utilizados nas análises *in silico*.

Propriedade	Apigenina	Hispidulin a	Isovitexina	Lantanosideo	Linarosideo	Luteolina	Pectolinarigenina	Pectolinarina	Vitexina	Naproxeno
GI absorção	Alta	Alta	Baixa	Baixa	Baixa	Alta	Alta	Baixa	Baixa	Alta
Permeação cutânea	Permeável	Permeável	Permeável	Permeável						
Permeação pela BBB	Não	Não	Não	Sim						
Permeação pelo SNC	Não permeável	Não permeável	Não permeável	Permeável						
Inibidor da CYP1A2	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
Inibidor CYP2C19	Não	Não	Não	Não						
Inibidor CYP2C9	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não
Inibidor CYP2D6	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
Inibidor CYP3A4	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Potencial mutagênico	Não	Não	Não	Não						
Hepatotoxicidade	Não	Não	Não	Não						

Legenda: GI, gastrointestinal; BBB, Barreira hematoencefalica, SNC, Sistema nervoso central.



As propriedades físico-químicas das substâncias podem estar relacionadas com a sua biodisponibilidade oral. Segundo Lipinski *et al.* (1996), compostos que apresentam determinadas características físico-químicas, tais como massa molecular < 500 Da, lipofilicidade (log P) <5, número de grupos doadores <10 e aceptores de hidrogênio <5 podem se comportar como bons candidatos a fármacos administrados por via oral. Contudo, moléculas que violam mais do que duas destas regras podem ter problemas de biodisponibilidade oral. As análises dos flavonoides de *L. camara* revelaram que a apigenina, hispidulina, isovitexina, lantanosídeo, linarosídeo, luteolina, pectolinarigenina e vitexina demonstram boas características para serem administrados por via oral, sendo assim, substâncias promissoras.

Uma vez que os fármacos sejam administrados por via oral, eles passam pelo processo de absorção no trato gastrointestinal, um processo importante para que essas substâncias alcancem a corrente sanguínea e cheguem aos seus alvos teciduais (TRIFUNOVI *et al.*, 2016). Nossos resultados revelaram uma maior capacidade de absorção gastrointestinal das agliconas em relação aos glicosídeos, sugerindo que os flavonoides apigenina, hispidulina, luteolina e pectolinarigenina apresentam maior capacidade de alcançar os tecidos onde está ocorrendo o processo inflamatório.

Outro parâmetro que também foi observado é alta permeabilidade cutânea de todos os compostos investigados. Esta propriedade é vantajosa, uma vez que, os sistemas de liberação trans dérmica têm demonstrado vantagens significativas na prática clínica, pois podem reduzir os efeitos colaterais sistêmicos. Além disso, a administração cutânea também é utilizada para alcançar uma liberação prolongada de fármacos e pode ser explorada como alternativa à via oral, caso as substâncias apresentem alguma limitação (RUELA *et al.*, 2016). Desta forma, a permeabilidade cutânea apresentada pelos compostos estudados, pode ser uma boa alternativa, caso a via de administração oral não seja a de escolha.

O fígado, por sua vez, é um órgão extremamente importante, nele estão presentes as enzimas do citocromo P450s (CYP450s), proteínas responsáveis pela metabolização de fármacos, e que em certos casos, metabolizam fármacos inativos à sua forma farmacologicamente ativa. Além disso, o sistema hepático, converte substâncias químicas



lipofílicas em compostos hidrofílicos para facilitar a sua eliminação (ALMAZROO *et al.*, 2017). Os flavonoides de *L. camara* revelaram propriedades promissoras como baixa toxicidade hepática, mostrando que não conduzem a danos prejudiciais ao fígado. Entretanto, como foi observada alguma ação nas enzimas do CYP450, essas substâncias também não seriam isentas de efeitos adversos. Ainda no que diz respeito à toxicidade, essas substâncias não apresentaram potencial mutagênico pelas análises de predição *in silico*, sugerindo que esses compostos não apresentam potencial carcinogênico (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Avaliação dos possíveis alvos/atividades farmacológicas

As análises anteriores revelaram que as substâncias estudadas possuem propriedades relevantes. Diante disso, nossos esforços foram voltados para a investigação dos possíveis alvos/atividades farmacológicas. Utilizando as plataformas *Swiss target prediction*[®] and *PASS online*[®] foi pesquisado a possibilidade dos flavonoides possuírem atividade anti-inflamatória e se essa propriedade está relacionada a inibição da COX-2. Os resultados revelaram que todos os flavonoides apresentam potencial anti-inflamatório e que a apigenina, hispidulina, isovitexina, linarosideo, luteolina e pectolinarigenina apresentam esta propriedade devido a inibição da ciclooxigenase-2 ou por funcionarem como AINEs (Tabela 4).

Tabela 4- Avaliação dos possíveis alvos/atividade farmacológica dos flavonoides de *Lantana camara* utilizados nas análises *in silico*.

Substância	Possíveis alvos/atividades farmacológicas
Apigenina	Anti-inflamatório, inibidor da expressão de TNF, inibidor da ciclooxigenase-2
Hispidulina	Anti-inflamatório, anti-inflamatório não esteroideal, inibidor da oxido nítrico sintase induzível,
Isovitexina	Anti-inflamatório, inibidor da expressão da oxido nítrico sintase induzível, inibidor da ciclooxigenase-2
Lantosideo	Anti-inflamatório
Linarosideo	Anti-inflamatório, inibidor da ciclooxigenase-2.
Luteolina	Anti-inflamatório, inibidor da expressão de TNF, anti-inflamatório não esteroideal, inibidor da ciclooxigenase-2.
Pectolarigenina	Anti-inflamatório, inibidor da ciclooxigenase-2,
Pectolarina	Anti-inflamatório, inibidor da expressão da oxido nítrico sintase induzível, inibidor da expressão de TNF,
Vitexina	Anti-inflamatório, inibidor da oxido nítrico sintase induzível, inibidor da expressão de TNF.
Naproxeno	Anti-inflamatório, anti-inflamatório não esteroideal, inibidor da expressão de TNF, inibidor da ciclooxigenase-2, inibidor da ciclooxigenase-1

Legenda: TNF, fator de necrose tumoral.

A COX-2 é uma proteína de 604 aminoácidos que é expressa constitutivamente no rim, cérebro e ovários (AMARAVANI *et al.*, 2012). Entretanto devido a indução de moléculas inflamatórias como IL-1, TNF- α e LPS, essa enzima tem a sua expressão aumentada (CARVALHO *et al.*, 2004). Embora os genes de ambas as isoformas da COX sejam diferentes, a COX-1 e COX-2 têm estruturas e atividades catalíticas semelhantes (SOHILAIT *et al.*, 2017). As sequências de aminoácidos para a ligação do substrato e sítios catalíticos são quase idênticas, entretanto a COX-2 tem valina substituída por isoleucina nas posições 434 e 523 (SOHILAIT *et al.*, 2017). As análises de predição de alvos moleculares mostraram que a atividade anti-inflamatória da maioria dos flavonoides de *L. camara* pode estar relacionada a inibição da COX-2. Esses resultados são significativos, uma vez que este é um dos principais alvos dos fármacos anti-inflamatórios disponíveis.



Docking molecular

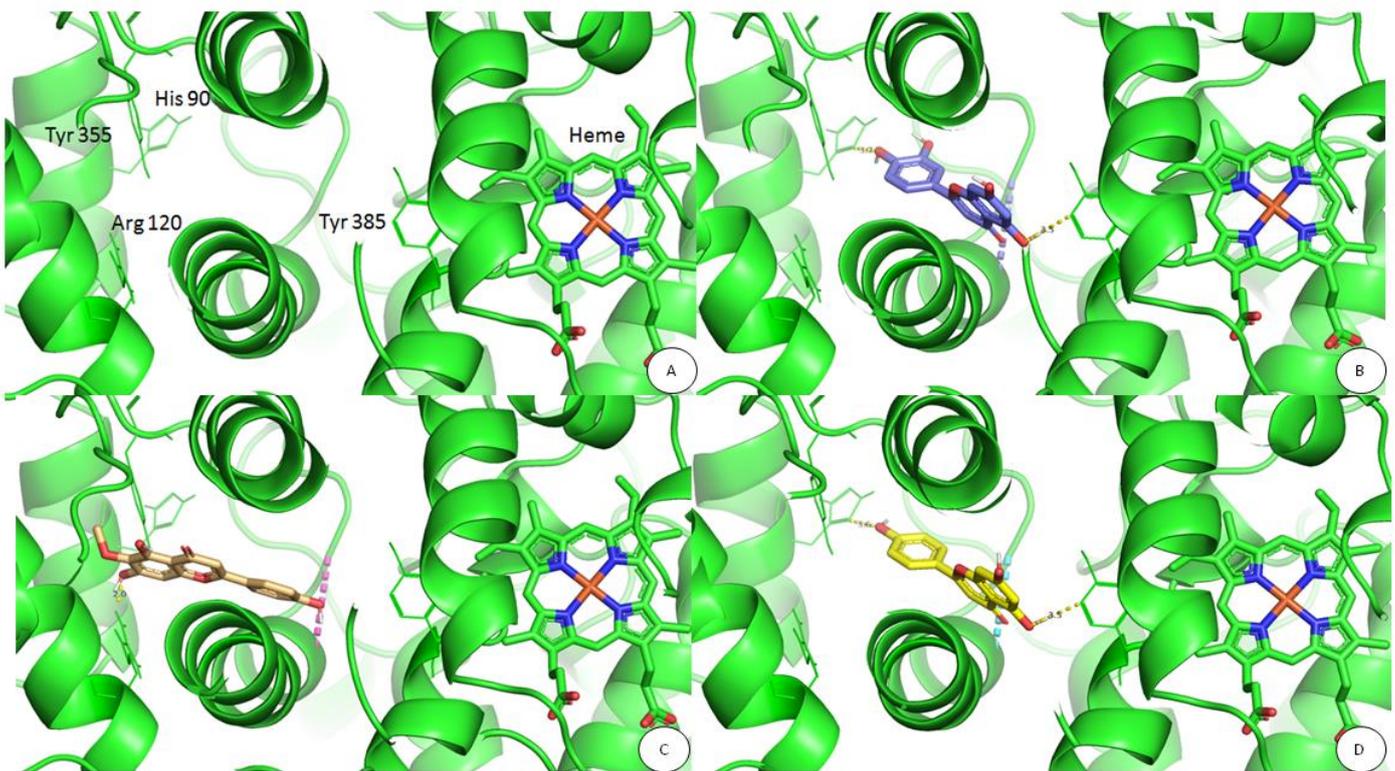
Com o intuito de compreender sobre as propriedades anti-inflamatórias dos flavonoides de *L. camara* e verificar seus mecanismos de ação sobre a enzima COX-2, foi realizada a análise de *docking* molecular utilizando um modelo 3D dessa enzima. O estudo de *docking* revelou que os flavonoides podem interagir por meio de ligações de hidrogênio devido aos grupos hidroxila ou *stacking* com resíduos de aminoácidos ao qual se liga o AA (Arg 120 e Tyr 355) ou com resíduos responsáveis pela transferência de elétrons para o grupo heme (Tyr 385), um grupo prostético no sitio da peroxidase (Tabela 5). Além disso, o estudo de *docking* revelou que luteolina, hispidulina e apigenina foram as substâncias mais promissoras, com energias de ligação e valores de K_i semelhantes ao naproxeno (Figura 1 e Tabela 5).

Tabela 5- Interações dos flavonoides de *L. camara* com os resíduos do sítio ativo da COX-2.

Flavonoide	Energia (Kcal/mol)	Valor de Ki (µM)	Resíduo de aminoácido
Apinenina	-8,7	0,42	His 90 (Ligação de hidrogênio) e Tyr 385 (Ligação de hidrogênio)
Hispidulina	-8,0	1,37	Arg 120 (Ligação de hidrogênio) e Tyr 355 (<i>Stacking</i>)
Isovitexina	-7,0	7,39	Tyr 385 (Ligação de hidrogênio) e Tyr 355 (<i>Stacking</i>)
Lantosídeo	-6,5	17,20	Tyr 385 (<i>Stacking</i>), Tyr 355 (Ligação de hidrogênio), Arg 120 (Ligação de hidrogênio)
Linarosídeo	-6,6	14,53	Tyr 385 (<i>Stacking</i>), His 90 (Ligação de hidrogênio), Arg 120 (Ligação de hidrogênio)
Luteolina	-9,2	0,18	His 90 (Ligação de hidrogênio) e Tyr 385 (ligação de hidrogênio)
Pectolinarigenina	-7,7	2,27	Arg 120 (Ligação de hidrogênio) e Tyr 355 (<i>Stacking</i>)
Pectolinarina	-3,9	1384,39	Tyr 385 (Ligação de hidrogênio), Tyr 355 (Ligação de hidrogênio) e Arg 120 (Ligação de hidrogênio)
Vitexina	-7,9	1,62	Tyr 385 (Ligação de hidrogênio), Arg 120 (Ligação de hidrogênio) e His 90 (Ligação de hidrogênio).
Naproxeno	-8,5	0,59	Arg 120 (ligação de hidrogênio) e Tyr 355 (ligação de hidrogênio)

Legenda: His, Histidina; Arg, Arginina; Tyr, Tirosina.

Figura 1- Interação dos flavonoides de *Lantana camara* com o sítio ativo da COX-2. A) Sítio ativo da COX-2 mostrando os principais resíduos de aminoácidos relacionados com a atividade enzimática (His 90, Arg 120, Tyr 355 e Tyr 385). B) Luteolina interagindo com os resíduos His 90 e Tyr 385 por meio de ligações de hidrogênio. C) Hispidulina interagindo com o resíduo Arg 120 por meio de ligação de hidrogênio e com resíduo Tyr 355 por meio de *stacking*. D) Apigenina interagindo com o resíduo His 90 e Tyr 385 por meio de ligação de hidrogênio.



O mecanismo por meio do qual as duas isoformas da COX promovem a catálise do AA é praticamente o mesmo. A reação de cicloxigenação (bis-oxigenação) converte o AA em prostaglandina G2 (PGG2), e o processo de peroxidação que acontece em seguida, reduz a PGG2 em prostaglandina H2 (PGH2). A catálise da ciclooxygenase, requer que a enzima



seja primeiramente ativada por meio de um processo dependente da peroxidase (ROUZER e MARNETT, 2009).

O início da reação enzimática requer um hidroperóxido, o qual é obtido através da oxidação do grupo heme no sítio da peroxidase por um mecanismo envolvendo óxido nítrico. O grupo heme então oxidado, oxida o resíduo Tyr 385 e o radical tirosinil resultante retira o átomo de hidrogênio no carbono 13 do AA. O aminoácido Arg 120, também tem um papel muito importante nesta catálise, pois serve como “âncora” do AA no sítio ativo, uma vez que se liga ao grupo carboxilato deste por meio de ligações de hidrogênio. Após o início da reação da ciclooxygenase, a peroxidase reduz o 15-hidroperoxi de PGG₂ que foi formado no sítio catalítico devida à catálise do AA a PGH₂ (ROUZER e MARNETT, 2009; UCHÔA, 2004).

Os resultados de *docking* estão de acordo com os dados da literatura. Dash *et al.* (2015) também demonstrou que os flavonoides possuem a capacidade de interagir com os resíduos Arg 120, Tyr 355 e Tyr 385 presentes no sítio ativo da COX-2. Além disso, este mesmo estudo revelou a interação do resíduo His 90 com o grupo hidroxila da luteolina. Um estudo *in silico* realizado por Levita *et al.* (2017) por sua vez, revelou que o fármaco SC-58 (inibidor seletivo para a COX-2) interage com o resíduo His 90, uma interação que também foi visualizada para os flavonoides de *L. camara*.

Desta forma, as análises de *docking* revelaram que os flavonoides de *L. camara* possuem a capacidade de interagir com os resíduos catalíticos da COX-2, podendo vir a ser bons candidatos a fármacos anti-inflamatórios. Além disso, o estudo de *docking* mostrou que as agliconas como luteolina, hispidulina e apigenina teriam maior capacidade de inibir a COX-2 que os flavonoides glicosilados.

CONCLUSÃO

Por meio das análises *in silico* realizadas, podemos concluir que os flavonoides de *L. camara* podem vir a ser bons inibidores da COX-2 devido a interação de seus grupos hidroxilas ou *stacking* com resíduos importantes do sítio catalítico. Além disso, pode-se



sugerir que estes constituintes podem ser administrados por via oral uma vez que a maioria dos flavonoides respeita a regra de Lipinski e apresentam ausência de toxicidade hepática e de potencial mutagênico. Até o momento, podemos concluir que as substâncias estudadas também podem vir a ser usadas como fármacos de uso trans dérmico devido a capacidade de permear pela pele. Entretanto, cabe ressaltar que testes *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar tais informações.

REFERÊNCIAS

AMARAVANI, M.; PRASAD, N.K.; RAMAKRISHNA, V. COX-2 structural analysis and docking studies with gallic acid structural analogues. **Springerplus**, v.1, n.58, p.1-7, 2012.

ALMAZROO, O.A.; MIAH, M.K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clin. Liver Dis.**, v.21, p.1–20, 2017.

ASHAL, T.F.; IFORA, I.; OKTAVIA, S. Potential Anti-inflammatory Effects of *Lantana camara* L.: A Review. **Int. res. j. pharm. med. sci.** v.3, n.6, p. 1-4, 2020.

ASWAD, M.; RAYAN, M.; ABU-LAFI, S.; FALAH, M.; RAIYN, J.; ABDALLAH, Z.; RAYAN, A. Nature is the best source of anti-inflammatory drugs: indexing natural products for their anti-inflammatory bioactivity. **Inflamm. Res.**, v.67, p.67–75, 2018.

BEGUM, S.; WAHAB, A.; SIDDIQUI, B.S. Antimycobacterial activity of flavonoids from *Lantana camara* Linn. **Nat. Prod. Res.** V.22, n. 6, p. 467-470, 2008.

BEZERRA, J.W.A.; COSTA, A.R.; RODRIGUES, F.C.; DUARTE, A.E.; ROCHA, M.I.; BARROS, L.M. Potencial medicinal de *Lantana camara* L. (VERBENACEAE): UMA REVISÃO. **Cad. Cult. Ciênc.**, v.15, n.1, p. 82-92, 2016.

BEGUM, S.; AYUBA, A.; ZEHRAA, S.Q.; SIDDIQUIA, B.S.; CHOUDHARYA, M.I.; SAMREEN. Leishmanicidal Triterpenes from *Lantana camara*. **Chem. Biodivers.**, v.11, p.709-718, 2014.

CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.DS.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anestesiol.**, v.54, n.3, p.448 – 464, 2004.



CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p.7204-7218, 2018.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci. Rep.**, v.7, n.42717, p.1-13, 2017.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Res.**, v.47, n. W1, p.W357–W364, 2019.

DASH, R.; UDDIN, M.M.N.; HOSEN, S.M.Z.; RAHIM, Z.B.; DINAR, A.M.; KABIR, M.S.H.; SULTAN, R.A.; ISLAM, A.; HOSSAIN, M.K. Molecular docking analysis of known flavonoids as dual COX-2 inhibitors in the context of cancer. **Bioinformation (Print)**, v.11, n.12, p.543-549, 2015.

DE ASSIS, P.M.; FÁVERO, A.; MENEGASSO, J. F.; MEINEL, R.S.; MARION, G.M.; NUNES, V. S.P.; GOLIATT, P.V.Z.C.; DA SILVA, A.D.; DUTRA, R.C.; RAPOSO, N.R.B. In silico, in vitro and in vivo studies indicate resveratrol analogue as a potential alternative for neuroinflammatory disorders. **Life Sci.**, v. 249, n.117538, p.1-14, 2020.

FARZAEI, M.H.; SINGH, A.K.; KUMAR, R.; CROLEY, C.R.; PANDEY, A.K.; COY-BARRERA, E.; PATRA, J.K.; DAS, G.; KERRY, R.G.; ANNUNZIATA, G.; TENORE, G.C.; KHAN, H.; MICUCCI, M.; BUDRIESI, R.; MOMTAZ, S.; NABAVI, S.M.; BISHAYEE, A. Targeting Inflammation by Flavonoids: Novel Therapeutic Strategy for Metabolic Disorders. **Int. J. Mol. Sci.**, v.20, n.4957, 2019.

FILIMONOV, D.A.; LAGUNIN, A.A.; GLORIOZOVA, T.A.; RUDIK, A.V.; DRUZHILOVSKII, D.S.; POGODIN, P.V.; POROIKOV, V.V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. **Chem. Heterocycl. Compd. (N Y)**, v.50, n.3, p.444-457, 2014.

FONSECA, A.M.; MENDES, A.M.; MARTINS, V.E.P.; COLARES, R.P.; BRAZ-FILHO, R.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P.R.V.; TEIXEIRA, A.M.R.; PINTO, O.R.O.; ALCÓCER, J.C.A.; CAMPOS, O.S.; MARINHO, E.S. PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF THE FLAVONOID PECTOLINARIN FROM THE LEAVES OF LANTANA CAMARA (VERBENACEAE). **Int. j. res. dev.**, v. 9, n. 9, p. 29604-29609, 2019.

GANDHI, J.; KHERA, L.; GAUR, N.; PAUL, C.; KAUL, R. Role of Modulator of Inflammation Cyclooxygenase-2 in Gammaherpesvirus Mediated Tumorigenesis. **Front. Microbiol.**, v.8, n. 538, p.1-12, 2017.



JUANG, F.C.; CHEN, Y.F.; LIN, F.M.; HUANG, K.F. CONSTITUENTS FROM THE LEAVES OF LANTANA CAMARA (IV). **J. Chin. Med.**, v. 16, n. 2-3, p.149-155, 2005.
KALITA, S.; KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO, K.V.B. A Review on Medicinal Properties of *Lantana camara* Linn. **Res. J. Pharm. Technol.**, v.5, n.6, p.711-715, 2012

KASSEM, L.T.A.E.; MOHAMMED, R.S.; DIN, S.S.E.; ANSARI, A.E.; HAWAS, U.W.; MAHMOUD, K. Flavonoids from the flowers of *Lantana camara* L. with *in vitro* antioxidant activity. **Planta Med.**, v.77, n.12, 2011.

KUMAR, R.; KATIYAR, R.; KUMAR, S.; KUMAR, T.; SINGH, V. *Lantana camara*: An alien weed, its impact on animal health and strategies to control. **J. exp. biol. agric. sci.**, v.4, n.3S, p. 321-337, 2016.

LIU, M.; KALBASI, A.; BEATTY, G.L. Functio Laesa: Cancer Inflammation and Therapeutic Resistance. **J. Oncol. Pract.**, v.13, n.3, p.173-181, 2017.

LEVITA, J.; ROSITAMA, M.R.; ALIAS, N.; KHALIDA, N.; SAPTARINI, N.M.; MEGANTARA, S. Discovering COX-2 Inhibitors from Flavonoids and Diterpenoids. **J. Appl. Pharm. Sci.**, v.7, n.7, p.103-110, 2017.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 46, p. 3- 26. 1996.

MALEKI, S.J.; CRESPO, J.F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chem.**, v.299, p. 1-11, 2019.

MORTELMANS, K; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v.455, n.1-2, p.29- 60, 2000.

PIRES, D.E.V.; BLUNDELL, T.L.; ASCHER, D.B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **J. Med. Chem.** v.58, p.4066-4072, 2015.

PUNCHARD, N.A.; WHELAN, C.J.; ADCOCK, I. "The Journal of Inflammation," **J. Inflamm.** v.1, n.1, p.1-4, 2004.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 31, n.5, p.986-1000, 2011.

ROUZER, C.A.; MARNETT, L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **J. Lipid Res. April Supplement**, 2009.



RUELA, A.L.M.; PERISSINATO, A.G.; LINO, M.E.S.; MUDRIK, P.S.; PEREIRA, G.R. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations.

Brazilian J. Pharm. Sci., v.52, n. 3, p.527-544, 2016.

SOHILAIT, M.R.; PRANOWO, H.D.; HARYADI, W. Molecular docking analysis of curcumin analogues with COX-2. **Bioinformation (Print)**, v.13, n.11, p.356-359, 2017.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; ARROYO, M.T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.24, p.121–132, 2010.

TRIFUNOVI, J.; BOR, V.; GOLO, S.; MIKOV, M. Retention data of bile acids and their oxo derivatives in characterization of pharmacokinetic properties and in silico ADME modeling. **Eur J Pharm Sci.**, v. 92, p.194–202. 2016.

UCHÔA, F.T. **Síntese e avaliação da atividade anti-inflamatória de 5-BENZILIDENO-3-(4-CLOROBENZIL)-TIAZOLIDINA-2,4-DIONAS**. 183f. 2004. Dissertação (Mestrado em biotecnologia de produtos bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife, 2004.

WONGRAKPANICH, S.; WONGRAKPANICH, A.; MELHADO, K.; RANGASWAMI, J. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug Use in The Elderly. **Aging Dis.**, v. 9, n.1, p.143-150, 2018.

ZARGHI, A.; ARFAEI, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iran J Pharm Res.**, v.10, n.4, p.655-683, 2011.