



ATIVIDADE ANTI-COLESTEROLÊMICA DO EXTRATO AQUOSO DE *MITRACARPUS FRIGIDUS*: UM ESTUDO *IN SILICO*

*Anti-cholesterolemic activity of the aqueous extract of *Mitracarpus frigidus*: an in silico study*

Natasha Silva Mayrink¹, Ari Sérgio de Oliveira Lemos¹, Lara Melo Campos¹, Karollina Chaves Ferreira¹, Laura Morais de Oliveira¹, Rodrigo Luiz Fabri*¹

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

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

RESUMO

A HMG-CoA-redutase (HMGR) é uma enzima relacionada à síntese do colesterol, sua inibição é uma estratégia no tratamento da hipercolesterolemia. Com o aumento da pesquisa por plantas medicinais com propriedades de interesse, as propriedades antilipêmicas vêm sendo correlacionadas com as substâncias fenólicas. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in silico*, as propriedades antilipêmicas do extrato aquoso das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (MFAq) frente à HMGR. Após a caracterização química por *UFLC-QTOF-MS*, foram avaliadas as propriedades farmacocinéticas e alvos farmacológicos das substâncias presentes em MFAq. As substâncias encontradas (ácido clorogênico, rutina, caempferol-3O-rutinosídeo e 2-azaantraquinona) demonstraram ausência de hepatotoxicidade, baixa promiscuidade às proteínas do CYP450, mitocôndria como alvo molecular e propriedades antilipêmicas. Em seguida, as substâncias foram utilizadas para o estudo de *docking* molecular com a HMGR por meio do software *Auto Dock Vina*[®]. A atorvastatina foi usada como controle positivo. A enzima também foi avaliada quanto ao seu perfil eletrostático e apresentou paredes do sítio ativo com perfil eletrostático positivo, e seu interior negativo. A análise de *docking* molecular mostrou que os flavonoides rutina e caempferol-3O-



rutinosídeo apresentaram energias de inibição para HMGR semelhantes à atorvastatina, que pode ser atribuído à sua capacidade de realizar ligações de hidrogênio com os resíduos do sítio ativo e por serem atraídas pelas paredes do sítio. Desta forma, os resultados encontrados para as substâncias de MFAq são promissores e descrevem o potencial antilipêmico dos flavonoides. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o potencial antilipêmico das substâncias identificadas em MFAq.

Palavras-chave: metabolismo; lipídeos; extrato; *docking*; HMG-CoA.

ABSTRACT

HMG-CoA-reductase (HMGR) is an enzyme related to cholesterol synthesis; its inhibition is a strategy in the treatment of hypercholesterolemia. With the increase in research for medicinal plants with properties of interest, antilipemic properties have been correlated with phenolic substances. The aim of this study was to evaluate, *in silico*, the antilipemic properties of the aqueous extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* (MFAq) against HMGR. After chemical characterization by UFLC-QTOF-MS, the pharmacokinetic properties and pharmacological targets of the substances present in MFAq were evaluated. The substances found (chlorogenic acid, rutin, kaempferol-3*O*-rutinoside and 2-azaanthraquinone) demonstrated absence of hepatotoxicity, low promiscuity to CYP450 proteins, mitochondria as a molecular target and antilipemic properties. Then, the substances were used for the study of molecular docking with the HMGR through the Auto Dock Vina[®] software. Atorvastatin was used as a positive control. The enzyme was also evaluated for its electrostatic profile and showed active site walls with a positive electrostatic profile, and its interior negative. Molecular docking analysis showed that the flavonoids rutin and kaempferol-3*O*-rutinoside had inhibition energies for HMGR similar to atorvastatin, which can be attributed to their ability to perform hydrogen bonds with active site residues and to being attracted by the walls of the site. Thus, the results found for MFAq substances are promising and describe the antilipemic potential of flavonoids. However, further studies are needed to assess the antilipemic potential of substances identified in MFAq.

Keywords: metabolism; lipids; extract; docking; HMG-CoA.



INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são uma das causas mais relevantes de mortalidade em todo o mundo e estão estritamente relacionadas ao aumento do colesterol na circulação do organismo humano. Isto acontece, pois, a hipercolesterolemia pode acelerar o desenvolvimento da aterosclerose, resultando em um acúmulo de lipídeos nas paredes dos vasos sanguíneos, que por sua vez, conduz a um quadro de cardiopatia isquêmica (MAHDAVI *et al.*, 2020; RAM *et al.*, 2020). Essas placas ateroscleróticas podem obstruir os vasos sanguíneos do coração e esse bloqueio pode resultar em doenças cardiovasculares (HARTANTI *et al.*, 2019).

O aumento do nível de colesterol é causado, em parte, pelo excesso de sua síntese por meio da HMG-CoA redutase (HMGR), que converte a acetil-coenzima A (acetil-coA) em mevalonato, uma das substâncias precursoras do colesterol (HARTANTI *et al.*, 2019). Tal enzima é alvo de tratamento farmacológico de medicamentos, denominado inibidores da HMGR, as estatinas (HARTANTI *et al.*, 2019). Esses fármacos inibem competitivamente a HMGR e são eficientes na redução dos níveis séricos de colesterol. No entanto, o consumo em longo prazo destes medicamentos causa efeitos colaterais graves, como danos ao fígado e músculos (SALVAMANI *et al.*, 2016).

Nos últimos anos têm crescido o interesse na busca por novos tratamentos de origem natural para diversas patologias, dentre elas a hipercolesterolemia (SUGANYA *et al.*, 2017; MAHDAVI *et al.*, 2020). Neste contexto, destaca-se a espécie *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Roem. & Schult.) K. Schum., uma planta encontrada na América do Sul, incluindo o Brasil (PEREIRA *et al.*, 2006). Essa espécie tem sido amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa e vem apresentando potencial terapêutico para diversas bioatividades, dentre elas, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, entre outras (FABRI *et al.*, 2013; FABRI *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2019; CAMPOS *et al.*, 2020; FABRI *et al.*, 2020a; FABRI *et al.*, 2020b).

No entanto, a maioria dos trabalhos descritos para essa espécie concentra-se no extrato metanólico (MFM) das partes aéreas. O extrato aquoso, foco do nosso estudo, ainda



é pouco explorado. Diante disto, com o intuito de alavancar a compreensão das bioatividades desse extrato, utilizamos neste trabalho técnicas de bioinformática, ferramentas que fornecem informações essenciais para compreender o mecanismo de ação dos fármacos com seus alvos, e também, para selecionar as melhores substâncias para posterior validação experimental (SUGANYA *et al.*, 2017). Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química do extrato aquoso das partes aéreas de *M. frigidus* e realizar análises *in silico*, com intuito de investigar seu potencial anti-hipercolesterolêmico por meio da inibição da HMGR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* foram coletadas em Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil, em maio de 2011 nas coordenadas geográficas -43.38223 , -21.78073 . Um exemplar da espécie (CESJ 46076) foi depositado no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme licença número A032F41-23 SISGEN/BRASIL.

Preparação do extrato aquoso das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (MFAq)

As partes aéreas de *M. frigidus* previamente pulverizadas (1 Kg) foram submetidas à infusão em água destilada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Após a extração, a solução foi separada, liofilizada durante 24 horas para remoção do solvente e mantida em frascos vedados sob refrigeração para posterior realização da caracterização química. O material foi denominado MFAq e apresentou rendimento de 12,6% em relação ao material vegetal seco (126 g).

Condições cromatográficas

MFAq foi analisado por cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a espectrometria de massa (*UFLC-QTOF-MS*) no modo positivo $[M + H]^+$ usando um aparelho da marca



Shimadzu UFLC (modelo Nexera) e um espectrômetro de massa Bruker (modelo *QTOF Compact*) com ionização por fonte *eletrospray*. A fase móvel utilizada foi constituída por água acidificada, pH = 3, com ácido fórmico (fase A) e metanol (fase B). O fluxo de injeção foi ajustado para 0,4 mL/min e o tempo de execução, para 12 minutos. A coluna usada foi a Kinetex 2,6 µm - C18 - 100A, comprimento 100 mm X 3,0 mm. A corrida cromatográfica começou com 40% da fase B em 0,01 minuto, atingindo até 70% da fase B em 8,20 minutos e 95% da fase B em 9,70 minutos, com um retorno subsequente para 40% da fase B em 10,20 minutos, a execução terminou em 12 minutos. As condições de ionização foram definidas da seguinte forma: voltagem da fonte de íons *eletrospray* de 40 V, voltagem capilar de 4500 V e temperatura capilar de 220 °C. A aquisição dos fragmentos de massa foi realizada por varredura na faixa de 100 a 1000 *m/z*.

Predições *in silico* de bioatividades e do perfil farmacocinético

Após a caracterização química de MFAq, as estruturas das substâncias elucidadas foram projetadas no *software online molinspiration*[®]. Em seguida, as bioatividades relacionadas à regulação ou biossíntese lipídica e propriedades farmacocinéticas foram avaliadas nas plataformas online, *PASS online*[®] (FILIMONOV *et al.*, 2014), *ADMET LMMD*[®] (CHENG *et al.*, 2012) e *PKCSM*[®] (PIRES; BLUNDELL e ASCHER, 2015). Os valores da capacidade de “possuir atividade” (Pa) e de “não possuir atividade” (Pi) foram tabelados após a predição respeitando o ponto de corte de 30% (0,30).

Seleção e preparação da HMGR para *docking*

A estrutura da enzima HMGR foi preparada de acordo com a metodologia de Lin *et al.*, (2015a). A estrutura cristalizada da HMGR, PDB ID = 1hwk.pdb, contendo a estrutura da atorvastatina (controle positivo) foi selecionada para os estudos de *docking*. Para a preparação da proteína alvo, as moléculas de água foram excluídas da estrutura e todas as



cargas e hidrogênios dos resíduos de aminoácidos foram adicionados e utilizando o *software Auto Dock Tools 1.5.6*[®]

Estudos de *docking*

As análises de *docking* molecular foram realizadas de acordo com De Assis *et al.* (2020) seguida de algumas modificações. A estrutura 2D das substâncias elucidadas em *M. frigidus* foram projetadas no software *Chem Sketch*[®] e suas estruturas 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 essa etapa, os arquivos *pdbqt* foram gerados. A atorvastatina na cadeia B da estrutura cristalizada da proteína HMGR foi utilizada como controle positivo e para realizar o *redocking* por meio do cálculo do RMSD (desvio padrão quadrático médio). O programa *AutoDock Vina*[®] foi utilizado para estudos de *docking* molecular. A *grid box* usada foi: centro da caixa com dimensões de $22 \times 22 \times 22$, coordenadas de $X = 2,435$, $Y = -9,837$ e $Z = -10,024$, e espaçamento de $0,375 \text{ \AA}$. 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 HMGR e as substâncias.

Estudo do perfil eletrostático

Para compreender as interações entre os ligantes e o sítio ativo da HMGR, analisamos o perfil eletrostático desta enzima usando os programas *PDB2PQR v1.9*[®] e *APBS v1.4.1*[®] (JURRUS *et al.*, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil químico por *UFLC-QTOF-MS*

De acordo com o perfil cromatográfico obtido por *UFLC-QTOF-MS* para MFAq, quatro substâncias foram identificadas quando comparados os perfis de fragmentação de massas obtidos com os dados disponíveis na literatura (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados de MS no modo (+) obtidos por ESI e os resultados da identificação das substâncias bioativas no extrato aquoso de partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* por *UFLC-QTOF-MS*.

Substâncias	Principais fragmentos de massa (<i>m/z</i>)	Tempo de retenção (min)	Referências
Ácido clorogênico	355, 1003 [M+H] ⁺ ; 163, 0413 [M+H-ácido quínico] ⁺	1.3	Lin <i>et al.</i> , 2015b
Rutina	611, 1599 [M+H] ⁺ ; 465, 1016 [M+H-raminose] ⁺ ; 303, 0486 [M+H-raminose-glucose] ⁺	4.0	Rey <i>et al.</i> , 2018.
Caempferol-3O-rutinosideo	595.1686 [M+H]; 449.1101 [M+H-raminose] ⁺ ; 287.0567 [M+H-raminose-glucose] ⁺	4.9	Jang <i>et al.</i> , 2018.
2-Azaantraquinona	441, 2447 [2M+Na] ⁺ ; 210, 0535 [M+H] ⁺	8.8	Gbaguidi, 2005; Okunade <i>et al.</i> , 1999

Legenda- ESI, Fonte de ionização do tipo *eletrospray*.

Atualmente há um aumento na busca por substâncias naturais, onde a pesquisa de substâncias biologicamente ativas auxilia na descoberta de novas moléculas (JOHNSON *et al.*, 2019). Por meio de *UFLC-QTOF-MS*, quatro substâncias foram caracterizadas em MFAq quando comparados os fragmentos de massa com os dados da literatura (OKUNADE, 1999; GBAGUIDI, 2005; LIN, 2015; REY, 2018; JANG, 2018). Após a caracterização química, essas substâncias foram utilizadas no processo de triagem *in silico*.

Predições de bioatividades *in silico*

As análises de bioatividade *in silico* foram realizadas para investigação das propriedades farmacológicas das substâncias identificadas em MFAq antes de inicializar os estudos de *docking* (Tabela 2). Valores de $Pa > 30\%$ (probabilidade de “possuir atividade”) foram considerados como bioatividades promissoras. A melhor correlação encontrada para todos os fitocompostos (ácido clorogênico, rutina, caempferol-3*O*-rutinosídeo e 2-azaantraquinona) foi a regulação do metabolismo lipídico. A atorvastatina, conforme esperado, apresentou propriedades hipolipêmicas, anti-hipercolesterolêmico, inibidor da síntese do colesterol, inibidor da HMGR e regulador do metabolismo lipídico.

Tabela 2 – Resultados das predições de bioatividades *in silico* das substâncias identificadas em MFAq realizada pela plataforma *PASS online*[®].

Bioatividades	Atorvastatina		Ácido clorogênico		Rutina		Caempferol-3 <i>O</i> -rutinosídeo		2-azaantraquinona	
	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>
Hipolipêmico	0,860	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-hipercolesterolêmico	0,511	0,020	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor da síntese de colesterol	0,467	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-
Inibidor da HMG-CoA-redutase	0,399	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-
Regulador do metabolismo lipídico	0,346	0,117	0,565	0,027	0,468	0,060	0,479	0,055	0,465	0,061

Legenda- *Pa*, probabilidade de “possuir atividade”. *Pi*, probabilidade de “não possuir atividade”.

O metabolismo lipídico está relacionado não apenas com o aparecimento de diversas doenças, mas também, influencia no envelhecimento e expectativa de vida. Desta forma, sua regulação pode auxiliar na melhora da qualidade de vida e evitar o surgimento de doenças. Logo, pesquisas por novas substâncias que possuam menos efeitos adversos e que ajudem a regular esse metabolismo torna-se essencial. Por meio da pesquisa de alvos/atividades farmacológicas, as substâncias, ácido clorogênico, rutina, caempferol-3*O*-rutinosídeo e 2-azaantraquinona, mostraram bioatividades promissoras como reguladores do metabolismo

lipídico, sugerindo que essas substâncias podem vir a ser uma estratégia em potencial para a regulação desse metabolismo (JOHNSON *et al.*, 2019).

Propriedades farmacocinéticas

As propriedades farmacocinéticas das substâncias de MFAq e da atorvastatina foram avaliadas pelas plataformas online ADMET LMMD[®] e PKCSM[®]. As análises mostraram que os fitoconstituintes não apresentam toxicidade hepática e têm a mitocôndria como organela alvo (Tabela 3). Todos os constituintes, com exceção da 2-azaantraquinona, não apresentam ação inibitória ou são substratos para as diferentes enzimas do CYP450, fato que corrobora com os resultados de “promiscuidade” para as enzimas do CYP450, onde foi encontrada uma baixa capacidade para todas as substâncias. Também foi avaliada as propriedades farmacocinéticas da atorvastatina, no qual foi possível observar um efeito hepatotóxico e alta promiscuidade com as enzimas do CYP450 para esse fármaco.

Tabela 3- Propriedades farmacocinéticas das substâncias promissoras de MFAq avaliadas pelas plataformas ADMET LMMD[®] e PKCSM[®].

Propriedades farmacocinéticas	Atorvastatina	Ácido clorogênico	Rutina	Caempferol-3O-rutinosídeo	2-Azaantraquinona
Hepatotoxicidade	Sim	Não	Não	Não	Não
Organela alvo	Mitocôndria	Mitocôndria	Mitocôndria	Mitocôndria	Mitocôndria
CYP450 2C9 Substrato	NS	NS	NS	NS	NS
CYP450 2D6 Substrato	NS	NS	NS	NS	NS
CYP450 3A4 Substrato	S	NS	NS	NS	NS
CYP450 1A2 Inibidor	NI	NI	NI	NI	I
CYP450 2C9 Inibidor	NI	NI	NI	NI	NI
CYP450 2D6 Inibidor	NI	NI	NI	NI	NI
CYP450 2C19 Inibidor	NI	NI	NI	NI	I
CYP450 3A4 Inibidor	NI	NI	NI	NI	I
Promiscuidade com as enzimas do CYP	HP	BP	BP	BP	BP

Legenda- S, substrato. NS, não substrato. I, inibidor. NI, não inibidor. AP, alta promiscuidade. BP, Baixa promiscuidade.

As enzimas da família CYP450 são mono-oxigenases que catalisam reações ligadas a metabolismo de diferentes drogas e também estão presentes na síntese de colesterol,



esteroides e outros lipídeos (ZANGER *et al.*, 2013). As estatinas são substratos da CYP3A4 e o seu uso concomitante com medicamentos que inibem/induzem essa enzima pode levar a variações das concentrações plasmáticas desses fármacos, causando assim, toxicidade (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2021).

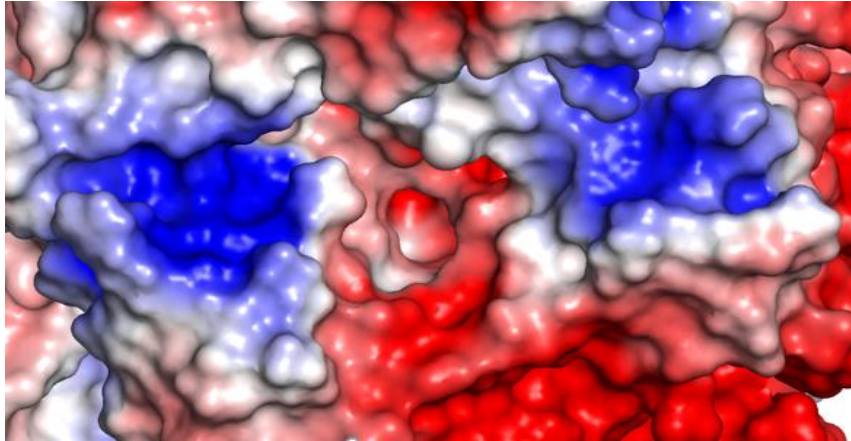
Em relação às propriedades farmacocinéticas avaliadas nesse estudo, todas as substâncias identificadas apresentaram ausência de hepatotoxicidade e possuíram a mitocôndria como organela alvo. Com exceção da 2-azaantraquinona, as substâncias também não demonstraram propriedades inibitórias ou foram substrato para diferentes enzimas do CYP450, o que corrobora com os baixos índices de promiscuidade para essas enzimas. Comparativamente, a atorvastatina apresentou hepatotoxicidade e alta taxa de promiscuidade para as enzimas do CYP450. Esses resultados sugerem que as substâncias presentes em MFAq podem induzir baixos efeitos tóxicos e que são seguras para o tratamento da hipercolesterolemia.

Docking molecular para a HMGR

Perfil eletrostático do sítio ativo da HMGR e redocking da atorvastatina

No primeiro momento, foi avaliado o perfil eletrostático do sítio ativo da HMGR (Figura 1). Esta análise forneceu observações importantes sobre a carga dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima. As paredes do sítio ativo apresentaram um perfil eletrostático positivo, enquanto que o interior do sítio se apresentou carregado negativamente.

Figura 1- Imagem do perfil eletrostático do sítio ativo da HMGR.



Legenda- Coloração azul indica resíduos com carga positiva, enquanto que coloração vermelha indica resíduos com carga negativa.

Após avaliação do perfil eletrostático do sítio ativo, foi construído a *grid box* e, para isso, realizou-se o *redocking* da atorvastatina. A atorvastatina foi retirada do arquivo pdb da proteína HMGR e foi novamente realizado o seu *docking*, para que dessa forma, pudesse ser feito o cálculo do RMSD (desvio padrão quadrático médio). O valor do RMSD no *redocking* da atorvastatina foi 0,806.

O estudo do perfil eletrostático é importante para facilitar a compreensão da aproximação ou repulsão de moléculas por meio de forças eletrostáticas, sendo assim, utilizado para analisar as interações intermoleculares. Moléculas com cargas opostas irão possuir forças atrativas enquanto que moléculas com cargas iguais possuíram forças repulsivas, (LI *et al.*, 2017; SHASHIKALA *et al.*, 2019). Nossos resultados demonstraram que, o sítio ativo da HMGR apresenta paredes carregadas positivamente e o interior mais eletronegativo, sugerindo que substâncias com grupos orgânicos mais eletronegativos terão uma afinidade maior pelas paredes do sítio ativo, enquanto que substâncias com grupos carregados positivamente serão atraídas para o interior do sítio ativo. Já para a validação da *grid box*, foi realizado o *redocking* da atorvastatina por meio do cálculo do RMSD. Uma *grid box* adequada deve ter um valor de RMSD menor que 2 (TORRES *et al.*, 2019). Logo,

a *grid box* criada foi promissora, pois apresentou valor de RMSD adequado, demonstrando que houve uma boa sobreposição entre a molécula antes e depois do *redocking*.

Resultados de docking para as substâncias de MFAq

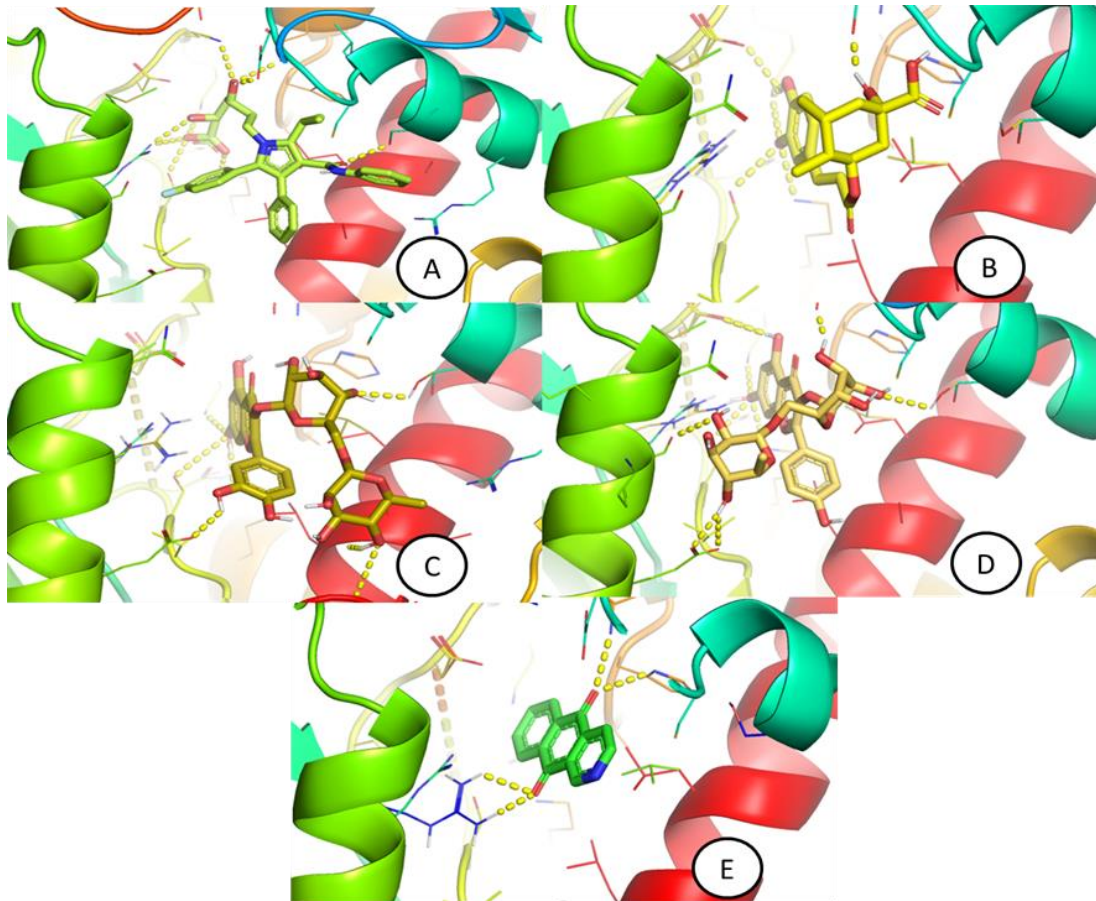
As substâncias identificadas em MFAq foram utilizadas para realizar o *docking* molecular no sítio ativo da HMGR. As análises mostraram que as substâncias possuem maior capacidade de fazer ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com os resíduos do sítio catalítico da HMGR (Tabela 4 e Figura 2).

Tabela 4- Resultados de *docking* para as substâncias identificadas em MFAq.

Substância	Energia (kcal/mol)	Ligações de hidrogênio	Interações hidrofóbicas	Interações π -Cátion	Pontes salinas
Atorvastatina	- 9,0	SER 565A (2,48Å) SER 684B (2,06Å) LIS 691B (2,65Å) LIS 692B (2,88Å) ALA 751A (2,28Å) ASN 755A (2,15Å) SER 661B (2,20Å) GLU 665B (3,28Å)	ALA 564A (3,93Å) VAL 683B (3,91Å) HIS 752A (3,51Å) LEU 853A (3,62Å) ALA 856A (3,82Å) LEU 857A (3,72Å)	-	ARG 590B (4,83Å) LIS 692B (4,05Å) LIS 735A (2,90Å)
Ácido clorogênico	- 6,9	SER 684B (2,54Å) ASP 690B (2,42Å) LIS 692B (2,64Å) LIS 735A (1,81Å) ALA 751A (2,51Å) SER 565A (3,76Å) ARG 590B (1,14Å) MET 657B (2,30Å)	LEU 853A (2,77Å) LEU 857A (3,66Å)	ARG590B (4,72Å)	-
Rutina	-8,2	MET 657B (2,30Å) ASN 658B (1,83Å) SER 661B (1,98Å) GLUC 665B (2,06Å) ASN 686B (3,15Å) LIS 735A (2,06Å) ALA 856A (2,12Å) CYS 561A (2,88Å) SER 565A (3,27Å)	LEU 853A (2,27Å) ALA 856A (3,23Å) LEU 857A (3,84Å)	-	-
Caempferol-3O-rutinosideo	-7,6	ASN 658B (2,46Å) ASN 658B (2,29Å) SER 661B (2,80Å) SER 684B (2,63Å) LIS 692B (2,36Å) LIS 735A (2,33Å)	-	ARG 590 B (1,39Å)	-
2-azaantraquinona	- 6.9	ARG 590B (3,54Å) ASN 755A (2,54Å)	HIS 752A (3,56Å) LEU 853A (3,40Å)	-	-

Legenda- Å, distância em angstroms.

Figura 2 - *Docking* molecular das melhores poses das substâncias de MFAq e da atorvastatina no sítio ativo da HMGR.



Legenda- A, atorvastatina. B, Ácido clorogênico. C, Rutina. D, Caempferol-3O-rutinosideo. E, 2-azaantraquinona. Linhas amarelas pontilhadas indicam ligações de hidrogênio.

O sítio ativo da HMGR pode ser dividido entre a porção Coa e a porção HMG. A porção CoA encontra-se em uma região de superfície da enzima e apresenta resíduos carregados positivamente (Ser565, Asn567, Arg568, Lis722, Ser865, His866 e Tyr479) (GESTO *et al.*, 2020). Nesta região, a cadeia lateral do resíduo Tyr479 se liga a base nitrogenada Adenina presente no HMG-CoA por meio de interação de van de Waals, enquanto que a hidroxila desse aminoácido faz uma ligação de hidrogênio com o grupo 3'-fosfato da porção ribose dessa mesma substância (ISTVAN *et al.*, 2000). Já a porção HMG



se encontra no meio de duas subunidades da HMGR, ele é formado pelos resíduos Arg590, Ser684, Asp690, Lis691, Lis692 e Asp767 de uma subunidade e os resíduos Glu559, Lys735, Asn755, Leu853 e His866 da outra subunidade (GESTO *et al.*, 2020).

A inibição da HMGR é feita quando a porção hidrofóbica das estatinas bloqueia o acesso da HMG-CoA no sítio de ligação da enzima (GESTO *et al.*, 2020). Esse bloqueio ocorre devido a uma mudança de conformação na estrutura da enzima após a ligação com a estatina. Todas as estatinas ligam-se aos resíduos Arg590, Lis691 e Asp690 (ISLAM *et al.*, 2015; BANSAL *et al.*, 2021). Essa inibição acontece porque as estatinas possuem estrutura similar ao HMG-CoA, apresentando uma ligação covalente com um grupo hidrofóbico em sua estrutura (GESTO *et al.*, 2020). Os resultados encontrados nos testes de *docking* confirmaram as informações descritas anteriormente. A atorvastatina apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos Ser565, Lis691, Lis692 e Asn755, interações hidrofóbicas com o resíduo Leu853 e ligações do tipo pontes salinas com os resíduos Arg590, Lis692 e Lis735. Todos os resíduos descritos são característicos do sítio catalítico da HMGR (ISLAM *et al.*, 2015; GESTO *et al.*, 2020, ISTVAN *et al.*, 2000).

As substâncias presentes em MFAq também apresentaram interações com resíduos descritos como característicos do sítio catalítico da enzima. O ácido clorogênico apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos Ser684, Asp690, Lis692 e Lis735, e interação hidrofóbica com o resíduo Leu853. A rutina apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos Ser565 e Lis735, e interação hidrofóbica com o resíduo Leu853. O caempferol-3O-rutinosideo apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos Ser684, Lis692 e Lis735. A 2-azaantraquinona apresentou ligações de hidrogênio com o resíduo Asn755 e interações hidrofóbicas com o resíduo Leu853. Além desses resíduos, as substâncias também apresentaram interações com resíduos característicos de ligação para estatinas (ISTVAN *et al.*, 2000; GESTO *et al.*, 2020), como ligações de hidrogênio com Asp690 e interação π -cátion com Arg590 para o ácido clorogênico, interação hidrofóbica com Arg590 para a rutina, interações π -cátion com Arg590 para o caempferol-3O-rutinosideo e ligações de hidrogênio com Arg590 para a 2-azaantraquinona.



Os estudos realizados para as substâncias identificadas em MFAq estão condizentes com os dados da literatura. Estudos apontam que o ácido clorogênico tem efeitos protetores no fígado devido ao seu potencial regulador do metabolismo lipídico com redução dos níveis de triglicerídeos, ácidos graxos e colesterol. Estes trabalhos também revelaram que essa substância regula o metabolismo dos ácidos graxos, estimula as proteínas quinases ativadas por AMP e modula o nível de ácidos graxos hepáticos (ZHOU *et al.*, 2016). A rutina, por sua vez, já foi citada como componente bioativo no tratamento da hiperlipidemia e doenças cardiovasculares (HUSSAIN *et al.*, 2021). Além disso, trabalhos *in vivo* utilizando animais mostraram redução do tamanho dos adipócitos, redução de peso e níveis mais baixos de triglicerídeos, colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade após tratamento com esse flavonoide (YANG *et al.*, 2020).

Ainda com relação à rutina, um estudo de *docking* molecular utilizando a HMGR demonstrou sete interações moleculares do tipo ligações de hidrogênio entre a enzima e essa substância (SUGANYA *et al.*, 2017). O caempferol é outro flavonoide que vem apresentando propriedades antihiperlipidêmicas e anti-obesidade, diminuindo o ganho de peso e auxiliando na regulação do metabolismo lipídico, diminuindo adipócitos, colesterol e triglicerídeos (CHANG *et al.*, 2011). Esse composto também pode se ligar no mesmo local que as estatinas e o HMG-CoA devido às posições de suas hidroxilas, que são adequadas para realizar ligações de hidrogênio ao local de ligação do substrato, podendo inibir a HMGR por impedimento estérico (ISLAM *et al.*, 2015). Já a 2-azaantraquinona, é um alcaloide, e pode ter a inibição enzimática relacionada a propriedades características dessa classe de substâncias, no entanto, faltam dados que elucidem seus mecanismos (OKUNADE *et al.*, 1999; REDDY *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

Comparando os resultados obtidos das substâncias identificadas no extrato aquoso de *M. frigidus* com os resultados da atorvastatina, é possível inferir a bioatividade relacionada a regulação do metabolismo lipídico dessas substâncias. Além disso, os



constituintes analisados apresentaram-se seguros, menos tóxicos e com menor probabilidade de efeitos adversos. Por meio da análise de *docking* molecular, as substâncias avaliadas apresentaram ligações com vários resíduos do sítio ativo da HMGR, além de interações com pelo menos um dos resíduos característicos das ligações das estatinas com a enzima (ASP690 e ARG590). Esses resultados são relevantes para indicar que essas substâncias podem ser inibidores da HMGR, sendo uma estratégia terapêutica no tratamento de hiperlipidemias tanto na forma isoladas quanto associadas no extrato aquoso de *M. frigidus*.

REFERÊNCIAS

AMORIM, A.C.L.; HOVELL, A.M.C.; PINTO, A.C.; EBERLIN, M.N.; ARRUDA, N.P.; PEREIRA, E.J.; BIZZO, H.R.; CATHARINO R.R.; FILHO, Z.B.M.; REZENDE, C.M. Green and Roasted Arabica Coffees Differentiated by Ripeness, Process and Cup Quality via Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. **Braz Chem Soc**, v. 20, p. 313-321, 2009.

AUDOIN, C.; ZAMPALÉGRÉ, A.; BLANCHET, N.; GIULIANI, A.; ROULLAND, E.; LAPRÉVOTE, O.; GENTA-JOUE, G. MS/MS-Guided Isolation of Clarinoside, a New Anti-Inflammatory Pentalgin Derivative. **Molecules**, v. 23, p. 1-9, 2018.

BALASUBRAMANIAN, R.; MAIDEEN, N.M.P. HMG-CoA Reductase Inhibitors (Statins) and their Drug Interactions Involving CYP Enzymes, P-glycoprotein and OATP Transporters-An Overview. **Curr. Drug Metab.** v. 22, n.5, 2021.

BANSAL, A.B.; CASSAGNOL, M. HMG-CoA Reductase Inhibitors. In: StatPearls. **Treasure Island** (Fl). 2021. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542212/>

BARROS, L.; PEREIRA, E.; CALHELHA, R.C.; DUEÑAS, M.; CARVALHO, A.M.; BUELGA, C.S.; FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **J Funct Foods**, v. 5: p. 1732-1740, 2013.

CAMPOS, L.M.; LEMOS, A.S.O.; CRUZ, L.F.; ARAUJO, M.G.F.; BOTTI, G.C.R.M.; REIS JUNIOR, J.L.; ROCHA, V.N.; DENADAI, A.M.L.; SILVA, T.P.; TAVARES, G.D.; SCIO, E.; FABRI, R.L.; PINTO, P.F. Development and in vivo evaluation of chitosan-gel containing *Mitracarpus frigidus* methanolic extract for vulvovaginal candidiasis treatment. **Biomed. Pharmacother.** v.130, p.1-10, 2020.



CAMPOS, L. M.; LEMOS, A.S.O.; SILVA, T. P.; NASCIMENTO, A.L.; CARVALHO, J.; MORAES, A.C.N.; ROCHA, V. N.; AGUIAR, J.A.K.; SCIO, E.; APOLÔNIO, A.C.M.; MELO, R.C.N.; FABRI, R.L. *Mitracarpus frigidus* is active against *Salmonella enterica* species including the biofilm form. **Ind. Crop. Prod.** v.141, p.1-8, 2019.

CHANG, C. J.; TZENG, T.F.; LIOU, S.S.; CHANG, Y.S.; LIU, I. Kaempferol regulates the lipid-profile in high-fat diet-fed rats through an increase in hepatic PPAR levels. **Planta Med.**, v. 77, n. 17, p. 1876–1882, 2011.

CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; LEE, P.W.; TANG, Y. admetsAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. **J. Chem. Inf. Model.** v.52, n.11, p.3099-3105, 2012.

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.

FABRI, R.L.; ARAGÃO, D.M.O.; FLORÊNCIO, J.R.; PINTO, N.C.C.; MATTOS, A.C.A.; COELHO, P.M.Z.; CASTAÑÓN, M.C.M.N.; VASCONCELOS, E.G., PINTO, P.F.; SCIO, E. Chromatographic Fingerprint Analysis and Effects of the Medicinal Plant Species *Mitracarpus frigidus* on Adult *Schistosoma mansoni* Worms. **Biomed Res Int.** p.1-10, 2014.

FABRI, R.L.; CAMPOS, L. M.; FLORÊNCIO, J.R.; OLIVEIRA, L.G.; ARAGÃO, D.O.; FERREIRA, A.; AGUIAR, J.A.K.; APOLÔNIO, A.C.M.; ALVES, M.S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) inhibits inflammatory and oxidative stress mediators in *Salmonella* sp. mouse infection. **J. Pharm. Pharmacol.** v.73, n.1, p. 82–92, 2020a

FABRI, R.L.; CUNHA, P.S.; CAMPOS, L.M.; LEMOS, A. S.O.; COIMBRA, E.S.; SCIO, E. Potencial antimicrobiano, citotóxico e leishmanicida do extrato diclorometano das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae). **Rev. eletrônica farm.** v.17, n.1, p.1-9, 2020b.

FABRI, R.L.; GARCIA, R.A.; FLORÊNCIO, J.R.; PINTO, N.C.C.; OLIVEIRA, L.G.; AGUIAR, J.A.K.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. **J. Pharm. Pharmacol.** v.66, n.5, p.722–732, 2013.

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.**, v.50, n.3, p.444-457, 2014



GBAGUIDI, F.; MUCCIOLI, G.G.; ACCROMBESSI, G.; MOUDACHIROU, M.; LECLERCQ, J.Q. Densitometric HPTLC Quantification of 2-Azaanthraquinone Isolated from *Mitracarpus scaber* and Antimicrobial Activity against *Dermatophilus congolensis*. **JPC- J Planar Chromat**, v. 18, p. 377-379, 2005.

GESTO, D.S.; PEREIRA, C.M.S.; CERQUEIRA, N.M.F.S.; SOUSA, S.F. An Atomic-Level Perspective of HMG-CoA-Reductase: The Target Enzyme to Treat Hypercholesterolemia. **Molecules**, v. 25, n. 3891, 2020.

GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; DUEÑAS, M.; CARVALHO, A.M.; QUEIROZ, M.J.R.P.; BUELGA, C.S.; FERREIRA, I.C.F.R. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. **Food Chem**, v. 141, p. 3721-3730, 2013.

HARTANTI, L.; YONAS, S.M.K.; MUSTAMU, J.J.; WIJAYA, S.; SETIAWAN, H.K.; SEOGIANTO, L. Influence of extraction methods of bay leaves (*Syzygium polyanthum*) on antioxidant and HMG-CoA Reductase inhibitory activity. **Heliyon**, v. 5, p.1-15, 2019.

HUSSAIN, A.; CHO, J.S.; KIM, J.S.; LEE, Y.I. Protective Effects of Polyphenol Enriched Complex Plants Extract on Metabolic Dysfunctions Associated with Obesity and Related Nonalcoholic Fatty Liver Diseases in High Fat Diet-Induced C57BL/6 Mice. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 2, p. 1–14, 2021.

ISLAM, B.; SHARMA, C.; ADEM, A.; ABURAWI, E.; OJHA, S. Insight into the mechanism of polyphenols on the activity of HMGR by molecular docking. **Drug Des Devel Ther**, v. 9, p. 4943–4951, 2015.

ISTVAN, E.S.; DEISENHOFER, J. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1529, n. 1–3, p. 9–18, 2000.

JANG, G.H.; KIM, H.W.; LEE, M.K.; JEONG, S.Y.; BAK, A.R.; LEE, D.J.; KIM, J.B. Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the *Prunus* genus by UPLC-DAD-QTOF/MS. **Saudi J Biol Sci**, v. 25, p. 1622–1631, 2018.

JOHNSON, A.A.; STOLZING, A. The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. **Aging Cell**, p. 1-26, 2019.

JURRUS, E.; ENGEL, D.; STAR, K.; MONSON, K.; BRANDI, J.; FELBERG, L.E.; BROOKES, D.H.; WILSON, L.; CHEN, J.; LILES, K.; CHUN M, L.I. P.; GOHARA, D.W, DOLINSKY, T.; KONECNY, R.; KOES, D.R.; NIELSEN, J.E.; HEAD-GORDON, T.; GENG, W.; KRASNY, R.; WEI, G.W.; HOLST, M.J.; MCCAMMON, J.A.; BAKER,



N.A. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Sci.** v.27, n.1, p.112-128, 2018.

LI, L.; CHAKRAVORTY, A.; ALEXOV, E. DelPhiForce, a tool for electrostatic force calculations: Applications to macromolecular binding. **J Comput Chem.**, v. 38, n.9, p. 584-593, 2017.

LIN, L.Z.; HARNLY, J.M.; CORRALES, M.S.P; LUTHRIA, D.L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chem.**, v. 107, p. 399–410, 2008.

LIN, S.H.; HUANG, K.J.; WENG, C.F.; SHIUAN, D. Exploration of natural product ingredients as inhibitors of human HMG-CoA reductase through structure-based virtual screening. **Drug Des Devel Ther.**, v.9, p. 3313-3324, 2015a.

LIN, Y.; XU, W.; HUANG, M.; XU, W.; LI, H.; YE, M.; ZHANG, X.; CHU, K. Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Iridoid Glycosides in Yinhua Kanggan Tablet by UPLC-QqQ-MS/MS. **Molecules**, v. 20, p. 12209-12228, 2015b.

MAHDAVI, A.; BAGHERNIYA, M.; FAKHERAN, O.; REINER, Z.; XU, S.; SAHEBKAR, A. Medicinal plants and bioactive natural compounds as inhibitors of HMG-CoA reductase: A literature review. **Biofactors**, p.1–21, 2020.

OKUNADE, A. L.; CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; OGUNTIMEIN, B.O. Azaanthraquinone: An antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*. **Planta Med.**, v. 65, n. 5, p. 447–448, 1999.

PEREIRA, Z.V.; CARVALHO-OKANO, R.M.; GARCIA, F.C.P. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata de Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v.20, n.1, p.207-222, 2006.

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.

RAM, H.; JAIPAL, N.; CHARAN, J.; KASHYAP, P.; KUMAR, S.; TRIPATHI, R.; SINGH, B.P.; SIDDAIAH, C.N.; HASHIM, A.; TABASSUM, B.; ABDALLAH, E.F. Phytoconstituents of an ethanolic pod extract of *Prosopis cineraria* triggers the inhibition of HMG-CoA reductase and the regression of atherosclerotic plaque in hypercholesterolemic rabbits. **Lipids Health Dis.**, v.19, n.6, p.1-11, 2020.



REDDY, P.V.; UROOJ, A. Inhibition of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase (Ex Vivo) by *Morus indica* (Mulberry). **Chin. j. biol.** v. 2014, p. 1–5, 2014.

REY, B.G.D.; GUIMARAES, L.L.; TOLEDO, M.S. de; TAKAHASHI, H.K.; STRAUS, A.H.; FREITAS, M.S.; HATTEBERGER, B.; SILVA, C.M.M.; CARVALHO, M.R. de; TOMA, W. The antiulcer and antioxidant mechanisms of the butanolic fraction extract obtained from *Bauhinia forficata* leaves: A medicinal plant frequently used in Brazilian folk medicine. **J Med Plants Res**, v. 12, p. 69-76, 2018.

SALVAMANI, S.; GUNASEKARAN, B.; SHUKOR, Y.; SHAHARUDDIN, N.A.; SABULLAH, M.K.; AHMAD, S.A. Anti-HMG-CoA Reductase, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of *Amaranthus viridis* Leaf Extract as a Potential Treatment for Hypercholesterolemia. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 2016, p.1-10, 2016.

SHASHIKALA, H.B.M.; CHAKRAVORTY, A.; ALEXOV, E. Modeling Electrostatic Force in Protein-Protein Recognition. **Front. Mol. Biosci.**, v. 6. p. 1-11, 2019.

SUGANYA, S.; NANDAGOPAL, B.; ANBARASU, A. Natural Inhibitors of HMG-CoA Reductase - An In silico Approach Through Molecular Docking and Simulation Studies. **J. Cell. Biochem.**, v.118, p. 52–57, 2017.

TORRES, P. H. M.; SODERO, A.C.R.; JOFILY, P.; SILVA, F.P.J. Key topics in molecular docking for drug design. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 18, p. 1–29, 2019.

YANG, J.; LEE, J.; KIM, Y. Effect of deglycosylated rutin by acid hydrolysis on obesity and hyperlipidemia in high-fat diet- induced obese mice. **Nutrients**, v. 12, n. 5, 2020.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacol. Ther.**, v. 138, n. 1, p. 103–141, 2013.

ZHOU, Y.; RUAN, Z.; WEN, Y.; YANG, Y.; MI, S.; ZHOU, L.; WU, X.; DING, S.; DENG, Z.; WU, G.; YIN, Y. Chlorogenic acid from honeysuckle improves hepatic lipid dysregulation and modulates hepatic fatty acid composition in rats with chronic endotoxin infusion. **J Clin Biochem Nutr.**, v. 58, n. 2, p. 146–155, 2016.