

Inibição de Ciclooxygenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2) por Monoterpenos: um Estudo *in Silico*

Cyclooxygenase 1 (COX-1) and 2 (COX-2) Inhibition by Monoterpenes: an *in Silico* Study

Rafaelle Bonzanini Romero^a; Adriano Lopes Romero^{a*}

^aUniversidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento Acadêmico de Química, PR, Brasil

*E-mail: alromero_dqi@hotmail.com

Recebido: 02 de abril de 2014; Aceito: 11 de junho de 2014

Resumo

Os monoterpenos têm sido reportados na literatura por suas importantes atividades farmacológicas, tais como antitumoral e anti-inflamatória. O processo inflamatório pode ser controlado, por exemplo, pelo uso de substâncias químicas inibidoras de ciclooxigenases. No entanto, apesar de vários trabalhos reportarem sobre a atividade anti-inflamatória de óleos essenciais e/ou monoterpenos isolados, poucos têm estudado se o mecanismo de ação ocorre devido à inibições de enzimas envolvidas no processo inflamatório. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo aplicar abordagens *in silico* para o entendimento das propriedades anti-inflamatórias apresentadas por óleos essenciais ricos em monoterpenos. Para isto, selecionou-se vinte monoterpenos, comuns em óleos essenciais, e realizou-se um estudo *in silico* das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e interações com enzimas ciclooxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2). Os resultados obtidos sugerem que estes produtos naturais possuem características moleculares e propriedades farmacocinéticas (entre elas, absorção no intestino humano, ligação com proteínas plasmáticas e coeficiente de partição sangue-cérebro) adequadas para substâncias bioativas candidatas a fármacos. As propriedades determinadas são condizentes com as atividades que têm sido relatadas para monoterpenos presentes em óleos essenciais e/ou isolados. Além disso, alguns dos monoterpenos avaliados apresentaram interação com as enzimas COX-1 e COX-2, com energia e orientação semelhante ao fármaco ibuprofeno. Entre os monoterpenos avaliados, o geraniol foi o que apresentou maior energia de interação com as enzimas COX-1 e COX-2, estando ancorado na mesma região da enzima que o ibuprofeno. Desta forma, estudos *in silico* adicionais poderão contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de ação de monoterpenos com ação anti-inflamatória.

Palavras-chave: Monoterpenos. Anti-Inflamatórios. Farmacocinética. Química Farmacêutica.

Abstract

The monoterpenes have been reported for their important pharmacological activities such as antitumor and anti-inflammatory. The inflammatory process may be controlled, for example, by the use of cyclooxygenase inhibitors. However, despite many studies on the anti-inflammatory activity of essential oils and/or isolated monoterpenes, few studies have investigated the mechanism of action due to inhibition of enzymes involved in the inflammatory process. Given the above, this study aimed to apply in silico approaches to understand the anti-inflammatory properties of the essential oils rich in monoterpenes. For this, we selected twenty monoterpenes, common in essential oils, and performed an in silico study of the physicochemical and pharmacokinetic properties and interactions with cyclooxygenase 1 (COX-1) and 2 (COX-2) enzymes. The results suggest that these natural products have molecular characteristics and pharmacokinetic properties (including the human intestinal absorption, plasma protein binding, and blood-brain coefficient partition) suitable for bioactive substances drug candidates. The determined properties are consistent with the activities reported for monoterpene in essential and/or isolated oils. Moreover, some of the monoterpenes showed interaction with COX-1 and COX-2 enzymes, with energy and orientation similar to ibuprofen. Among the monoterpenes evaluated, the geraniol showed the greatest interaction energy with the COX-1 and COX-2 enzymes, being anchored in the same region of the enzyme that ibuprofen. Thus, additional in silico studies can contribute to a better understanding of the mechanism of monoterpenes with anti-inflammatory action.

Keywords: Monoterpenes. Anti-Inflammatory Agents. Pharmacokinetics. Chemistry, Pharmaceutica.

1 Introdução

Óleos essenciais, assim como as plantas aromáticas, têm sido utilizados desde os tempos antigos. Entretanto, foi somente no século XX que os óleos essenciais começaram a ser utilizados no tratamento de doenças¹. Atualmente, os óleos essenciais são amplamente utilizados como fragrâncias e sabores nas indústrias de cosméticos, perfumes, medicamentos e alimentos².

Quimicamente, os óleos essenciais são produtos naturais voláteis, constituídos, geralmente, por misturas complexas de terpenos e fenilpropanóides³.

Biologicamente, são produzidos como mecanismo de defesa ou para atração de polinizadores⁴. Várias atividades biológicas/farmacológicas foram comprovadas para diferentes óleos essenciais⁵⁻⁷, tais como anti-inflamatória, inseticida, antimicrobiana, antitumoral, antiviral, imunomoduladora, anticonvulsante, antiespasmódica, ansiolítica, entre outras. A maioria dessas atividades biológicas/farmacológicas são atribuídas aos terpenóides constituintes dos óleos essenciais.

Os terpenóides, a maior família de produtos naturais, possuem vários papéis vitais nas plantas,

incluindo a respiração, a fotossíntese, o crescimento, o desenvolvimento, a reprodução, a defesa e a adaptação às circunstâncias ambientais⁸. Apesar dos terpenóides possuírem esqueletos carbônicos diversificados, todos têm origem com a condensação de precursores que contêm cinco átomos de carbono: difosfato de isopentenila - IPP e difosfato de dimetilalila - DMAPP⁹. Nos vegetais superiores, dois caminhos independentes situados em compartimentos intracelulares separados, estão envolvidos na biossíntese do IPP e do DMAPP. No citosol, o IPP é formado pelo caminho do ácido mevalônico - MVA produzido pela condensação do acetil-CoA, já nos plastídios, o IPP é formado pela condensação de piruvato e gliceraldeído através do caminho do fosfato de metileritritol - MEP^{10,11}. Dados reportados na literatura⁹⁻¹¹ indicam que a condensação de IPP no citosol dá origem ao difosfato de farnesila (FPP, 15 carbonos) e, finalmente, aos sesquiterpenos e aos triterpenos. Por outro lado, a condensação de IPP nos plastídios fornece o difosfato de geranila (GPP, 10 carbonos) e o difosfato de geranylgeranila (GGPP, 20 carbonos) e, finalmente, os monoterpenos, os diterpenos e os tetraterpenos. Entretanto, existem relatos de comunicação entre estes dois caminhos biossintéticos, e as contribuições relativas de cada caminho à biossíntese das várias classes de terpenos permanecem incertas¹².

Entre os terpenóides, os monoterpenos têm sido reportados na literatura por suas importantes atividades farmacológicas. O limoneno e o álcool perílico, por exemplo, previnem a carcinogênese e inibem a proliferação de células cancerígenas¹³. Os monoterpenos 1,8-cineol, borneol, cânfora e α - β -tujona, principais constituintes de *Salvia officinalis* L., são os responsáveis pela atividade anti-inflamatória da infusão de sálvia em fibroblastos gengivais humanos¹⁴. A atividade anti-inflamatória foi avaliada/confirmada para muitos monoterpenos, entre eles pode-se citar o timol¹⁵, carvacrol^{16,17}, linalol e acetato de linalila¹⁸.

A inflamação é uma resposta de proteção, induzida por lesão ou infecção dos tecidos, que tem como objetivo combater os invasores do corpo e remover as células hospedeiras mortas ou danificadas^{19,20}. Na resposta inflamatória, há um aumento de permeabilidade das células de revestimento endoteliais e influxos de leucócitos do sangue para o interstício, *burst* oxidativo, e liberação de citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral alfa, TNF- α). Ao mesmo tempo, há uma indução da atividade de várias enzimas, tais como oxigenases, óxido nítrico sintases e peroxidases. No processo inflamatório, há também a expressão de moléculas de adesão celular, como a molécula de adesão intercelular e a molécula de adesão celular vascular^{21,22}.

Os fenômenos da inflamação são mediados por várias substâncias químicas, entre elas o ácido araquidônico,

um ácido graxo poli-insaturado que é liberado a partir de membranas celulares por fosfolipase A2. O mesmo ácido graxo é metabolizado por ciclooxygenases (COX) e lipoxigenases em diferentes eicosanóides incluindo as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano A2. Duas isoformas de COX, COX-1 e COX-2, são relatadas na literatura. A COX-1 está presente em quase todos os tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins), atuando em diversos efeitos fisiológicos, como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Já a enzima COX-2 é expressa na maioria dos tecidos de mamíferos, em resposta às injúrias físicas, químicas e estímulos biológicos, incluindo a exposição à luz ultravioleta²³.

Alguns monoterpenos isolados ou presentes como constituintes majoritários em óleos essenciais têm sido reportados por inibirem enzimas ciclooxygenases, atuando, desta forma, como substâncias bioativas com propriedade anti-inflamatória. Como exemplo pode-se citar o óleo essencial de *Torreya nucifera*²⁴, constituído majoritariamente por limoneno, δ -3-careno e α -pineno, que apresentou atividade inibitória seletiva para a enzima COX-2, diminuindo significativamente a produção de PGE2. O 1,8-Cineol, um óxido monoterpênico presente em muitos óleos essenciais, inibe a produção de leucotrienos (LTB 4) e prostaglandinas (PGE2), ambos produzidos no metabolismo do ácido araquidônico²⁵.

Recentemente, uma revisão sobre 32 monoterpenos que possuem atividade anti-inflamatória foi publicada²¹. A partir da análise deste trabalho, é possível inferir que, apesar do aumento do número de trabalho avaliando a atividade anti-inflamatória de óleos essenciais, pouco tem sido feito em relação ao entendimento do mecanismo de ação dos constituintes químicos desses produtos naturais.

Neste contexto, o uso de métodos computacionais (*in silico*) tem sido amplamente aplicado na farmacologia para o entendimento do mecanismo de ação de substâncias bioativas. Tais métodos têm sido usados com frequência para a descoberta e otimização de novas moléculas bioativas, a partir do entendimento de propriedades como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Este tipo de abordagem tem contribuído para direcionar o estudo de novos compostos farmacologicamente ativos, diminuindo o tempo e reduzindo custos envolvidos no processo.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo aplicar abordagens *in silico* para o entendimento das propriedades anti-inflamatórias apresentadas por óleos essenciais ricos em monoterpenos. Para isto, selecionou-se 20 monoterpenos (Figura 1), comuns em óleos essenciais, e realizou-se um estudo *in silico* das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e interações com as enzimas ciclooxygenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2).

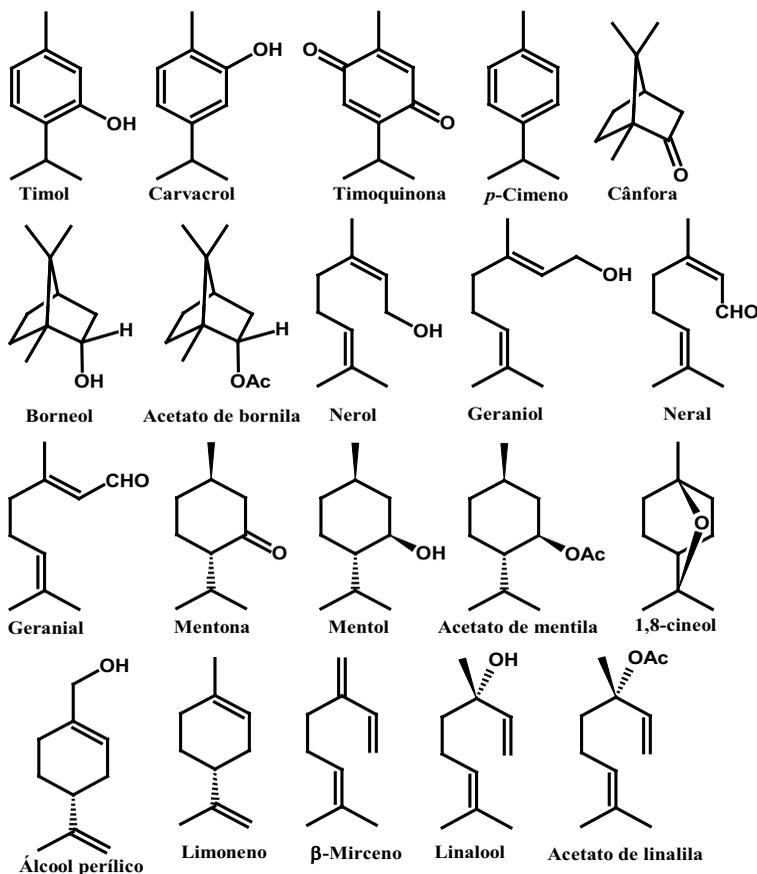


Figura 1: Estrutura molecular dos monoterpenos avaliados neste trabalho.

2 Material e Métodos

As estruturas das enzimas ciclooxygenase 1, de códigos 1HT5, 2OYU e 3N8Z, e ciclooxygenase 2, de códigos 4COX, 6COX e 3LN1, foram obtidas no banco de dados

Protein Data Bank (PDB), que é mantido por pesquisadores das Universidades de Nova Jersey e da Califórnia. As principais características destas enzimas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características das enzimas ciclooxygenases utilizadas neste trabalho.

PDB ID	Cadeias / Comprimento	Ligantes externos	Ligantes naturais
1HT5	A e B / 551 aa	Flurbiprofenato de metila	Protoporfirina IX de ferro, <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glucosamina, \square -octilglucosida
2OYU	P / 600 aa	2-[1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il]- <i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-1-(hidroximetil)propil]acetamida	Protoporfirina IX de ferro, <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glucosamina, \square -octilglucosida, \square - <i>D</i> -manose
3N8Z	A e B / 553 aa	Flurbiprofeno	Protoporfirina IX de ferro, <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glucosamina, \square -octilglucosida, \square - <i>D</i> -manose, \square - <i>D</i> -manose, 2-(acetilamino)-2-deoxi- \square - <i>D</i> -glucopiranosose
4COX	A, B, C e D / 587 aa	Indometacina	Protoporfirina IX de ferro, <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glucosamina
6COX	A e B / 587 aa	1-Fenilsulfonamida-3-trifluorometil-5-parabromofenilpirazol	Protoporfirina IX de ferro, <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glucosamina
3LN1	A, B, C e D / 587 aa	4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]benzenosulfonamida	Protoporfirina IX de ferro, <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glucosamina, β -octilglucosida

aa: aminoácidos. ID: Identificador; PDB: *Protein Data Bank*

As propriedades moleculares dos monoterpenos apresentados na Figura 1 foram calculadas com base em descritores moleculares e analisadas segundo a regra dos

cinco de Lipinski, no servidor *Molinspiration Online Property Calculation Toolkit*, versão 2013.09, desenvolvido pela empresa Molinspiration Cheminformatics, com sede em Nova

Ulica - Eslováquia.

As propriedades farmacocinéticas de absorção no intestino humano - HIA, ligação com proteínas plasmáticas - PPB e coeficiente de partição sangue-cérebro (log BB) foram avaliadas utilizando a ferramenta *ChemSilico*, desenvolvida pela empresa ChemSilico LLC, Tewksbuty - Estados Unidos.

O estudo das interações dos monoterpenos com as enzimas COX-1 e COX-2 foi realizado por *docking* molecular, utilizando duas ferramentas, o servidor *Mcule* (desenvolvido pela incorporação *Mcule*, com sede em Budapeste - Hungria) e o *software iGEMDOCK* (versão 2.1, desenvolvida pelo professor Jinn-Moon Yang da Universidade Nacional Chiao Tung - Taiwan).

A energia de interação das enzimas ciclooxigenase 1 (PDB 1HT5, 2OYU e 3N8Z) e ciclooxigenase 2 (PDB 4COX, 6COX e 3LN1) com os monoterpenos foi avaliada no servidor *Mcule*, utilizando as moléculas com estrutura otimizada pelo *software Marvin Sketch*, versão 6.1.7, desenvolvido pela empresa ChemAxon, com sede em Budapeste - Hungria. Para comparação, realizou-se o mesmo estudo para o fármaco ibuprofeno, que possui estrutura molecular similar aos monoterpenos avaliados.

A estrutura completa das enzimas ciclooxigenase 1 (PDB 3N8Z) e ciclooxigenase 2 (PDB 4COX) foram carregadas, em avaliações independentes, no *software iGEMDOCK 2.1*, utilizando, na seção "*Prepare Binding Site*", a opção "*by bonded ligand*" e um raio de 30,0 Å ao redor da cavidade onde encontra-se ancorado o ligante cristalográfico. Os

arquivos dos ligantes foram carregados em formato ".mol" e as estruturas dos monoterpenos (ligantes) foram previamente otimizadas utilizando o *software Marvin Sketch 6.1.7*. Os parâmetros foram ajustados para: *Standard Docking*, em que a população é definida como 200, as gerações como 70 e o número de soluções como 2. As configurações padrão foram mantidas na seção "*Scoring function*".

3 Resultados e Discussão

A partir dos estudos utilizando *Molinspiration* (Tabela 2), observou-se que todos os monoterpenos avaliados possuem propriedades moleculares desejáveis para fármacos, por estarem de acordo com a regra dos cinco de Lipinski.

A regra de Lipinski, ou "regra dos cinco", é um conjunto de condições empíricas inferidas por Lipinski *et al.*²⁶ num trabalho de análise estatística de propriedades de fármacos conhecidos. Esta regra estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição do perfil de biodisponibilidade oral, que está associada à absorção e a permeabilidade de possíveis fármacos e depende de cinco parâmetros: (a) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (b) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (c) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; (d) coeficiente de partição octanol-água (miLog P) menor ou igual a 5; (e) área de superfície polar topológica (TPSA, do inglês, *Topological Polar Surface Area*) menor ou igual a 140 Å². Moléculas que violam mais do que uma destas regras podem ter problemas de biodisponibilidade.

Tabela 2: Propriedades moleculares calculadas no servidor *Molinspiration* para alguns monoterpenos.

Composto	miLogP	TSPA	MM	nALH	nDLH	nviolações	nrothb	volume
Timol	3,34	20,228	150,221	1	1	0	1	158,572
Carvacrol	3,81	20,228	150,221	1	1	0	1	158,572
Timoquinona	1,90	34,142	164,204	2	0	0	1	161,104
<i>p</i> -Cimeno	3,90	0,000	134,222	0	0	0	1	150,554
β-Mirceno	3,99	0,000	136,238	0	0	0	4	162,240
Limoneno	3,61	0,000	136,238	0	0	0	1	157,296
Álcool perfílico	2,37	20,228	152,237	1	1	0	2	165,555
Nerol	3,20	20,228	154,253	1	1	0	4	175,575
Geraniol	3,20	20,228	154,253	1	1	0	4	175,575
Geranial	3,65	17,071	152,237	1	1	0	4	169,739
Neral	3,65	17,071	152,237	1	0	0	4	169,739
1,8-Cineol	2,72	9,234	154,253	1	0	0	0	166,661
Mentona	3,15	17,071	154,253	1	0	0	1	171,348
Mentol	3,33	20,228	156,269	1	1	0	1	177,210
Acetato de mentila	4,04	26,305	198,306	2	0	0	3	213,722
Cânfora	2,16	17,071	152,237	1	0	0	0	159,858
Borneol	2,35	20,228	154,253	1	1	0	0	165,720
Acetato de bornila	3,05	26,305	196,290	2	0	0	2	202,232
Linalol	3,21	20,228	154,253	1	1	0	4	175,591
Acetato de linalila	3,92	26,305	196,290	2	0	0	6	212,102

miLog P: coeficiente de partição octanol-água; **TPSA:** área de superfície polar topológica; **MM:** massa molecular; **nALH:** número de grupos aceptores de ligação hidrogênio; **nDLH:** número de grupos doadores de ligação hidrogênio; **nviolações:** número de violações à regra dos cinco de Lipinski; **nrothb:** número de ligações rotáveis; **volume:** volume molar da substância.

A área de superfície polar topológica (TPSA) é um descritor que apresenta boa correlação com o transporte molecular passivo através das membranas celulares, podendo ser utilizado para prever a absorção intestinal de substâncias químicas e a penetração na barreira hematoencefálica²⁷. Todos os monoterpenos avaliados mostraram uma TPSA inferior a 140 Å², indicando que devem possuir uma boa absorção no intestino humano, assim como uma boa permeabilidade na barreira hematoencefálica. De acordo com Veber *et al.*²⁸, uma boa biodisponibilidade oral é mais provável para compostos que possuem número de ligações

rotáveis ($nrotb \leq 10$ e $TPSA \geq 140$ Å²). À medida que o número de ligações rotáveis aumenta, a molécula torna-se mais flexível e mais adaptável para uma interação eficiente com um sítio enzimático. Como os monoterpenos possuem estrutura molecular pequena, comparada a outros produtos naturais, o número de ligações rotáveis não segue a regra de Veber *et al.*²⁸.

Algumas propriedades farmacocinéticas, incluindo absorção no intestino humano, ligação com proteínas plasmáticas e coeficiente de partição sangue-cérebro, foram avaliadas utilizando a ferramenta *ChemSilico* (Tabela 3).

Tabela 3: Dados farmacocinéticos calculados no servidor *ChemSilico* para alguns monoterpenos.

Composto	Log BB	HIA (%)	PPB (%)
Timol	0,54 ± 0,12	85,6 ± 4,5	82,2 ± 9,0
Carvacrol	0,55 ± 0,12	85,4 ± 4,5	81,3 ± 9,3
Timoquinona	0,31 ± 0,16	80,4 ± 9,6	40,0 ± 15,1
<i>p</i> -Cimeno	0,67 ± 0,10	80,9 ± 5,9	96,4 ± 4,6
β-Mirceno	0,81 ± 0,15	81,5 ± 8,3	80,2 ± 17,3
Limoneno	0,84 ± 0,14	83,9 ± 8,7	80,6 ± 16,3
Álcool perfílico	0,36 ± 0,16	90,1 ± 6,9	41,8 ± 13,3
Nerol	0,29 ± 0,19	88,6 ± 5,9	48,1 ± 14,6
Geraniol	0,29 ± 0,19	88,6 ± 5,9	48,1 ± 14,6
Geranial	0,40 ± 0,19	85,4 ± 6,5	52,1 ± 17,8
Neral	0,40 ± 0,19	85,4 ± 6,5	52,1 ± 17,8
1,8-Cineol	0,62 ± 0,19	85,9 ± 7,9	63,1 ± 12,1
Mentona	0,64 ± 0,16	82,4 ± 7,7	63,9 ± 13,3
Mentol	0,65 ± 0,16	86,7 ± 6,5	64,1 ± 12,9
Acetato de mentila	0,74 ± 0,19	83,4 ± 5,6	77,6 ± 10,0
Cânfora	0,47 ± 0,15	82,4 ± 7,5	58,0 ± 9,2
Borneol	0,41 ± 0,15	88,4 ± 6,4	53,1 ± 8,6
Acetato de bornila	0,50 ± 0,15	87,8 ± 6,2	64,1 ± 9,2
Linalol	0,40 ± 0,17	87,1 ± 6,0	54,5 ± 11,9
Acetato de linalila	0,63 ± 0,19	82,8 ± 5,4	80,7 ± 10,6

Log BB: coeficiente de partição barreira sangue-cérebro;

HIA: absorção no intestino humano; PPB: ligação com proteínas plasmáticas.

O efeito farmacológico de uma substância bioativa está associado a sua capacidade de atingir a circulação sanguínea e chegar a tecidos ou órgãos específicos²⁸. Para isto, após a administração, a substância bioativa é dissolvida e solubilizada no trato gastrointestinal para que possa ser absorvida no estômago ou através do intestino. A absorção intestinal humana (HIA, do inglês, *Human Intestinal Absorption*) é a primeira barreira que a substância bioativa deve transpor até chegar ao sítio de ação farmacológica.

Segundo dados obtidos da ferramenta *ChemSilico*, todos os monoterpenos avaliados possuem HIA > 80%, confirmando a previsão realizada a partir da análise dos valores de TSPA. Dados da literatura indicam que substâncias com HIA < 30% possuem pequena absorção intestinal, enquanto substâncias que exibem HIA > 70% possuem boa absorção intestinal²⁹.

A ligação às proteínas plasmáticas (PPB, do inglês, *Plasma Protein Binding*) possui papel central no transporte de substâncias bioativas no organismo humano, afetando, de forma significativa, a distribuição, e consequentemente, os efeitos farmacológicos e toxicológicos³⁰. O complexo estabelecido entre as proteínas plasmáticas e a substância bioativa atua como um reservatório na corrente sanguínea, retardando a chegada aos sítios de eliminação e disponibilizando-os no local de ação.

Os monoterpenos avaliados, com exceção do *p*-cimeno, apresentaram PPB < 90%. Segundo a literatura³¹, substâncias bioativas que possuem PPB > 90% apresentam, geralmente, baixa toxidez por não ultrapassarem os índices da faixa terapêutica. A ligação às proteínas plasmáticas tende a reduzir a disponibilidade de uma substância bioativa para difusão ou

transporte no órgão-alvo, visto que, em geral, apenas a forma livre da substância bioativa é capaz de difundir-se através das membranas³². A concentração aumentada de substância bioativa livre pode ter o potencial de produzir efeitos terapêuticos e/ou tóxicos aumentados. Desta forma, faz-se necessário avaliar, além das propriedades farmacocinéticas, possíveis efeitos tóxicos da substância bioativa candidata a fármaco.

O coeficiente de partição sangue-cérebro (log BB, do inglês *Blood-Brain Barrier Partition*) é um parâmetro que avalia a penetração na barreira hematoencefálica. A barreira hematoencefálica é, em essência, um mecanismo que impede a entrada de moléculas de sangue desnecessárias ou substâncias tóxicas no sistema nervoso central, ao mesmo tempo em que permite a circulação de quantidades adequadas de sangue arterial através do tecido cerebral³³.

Normalmente, as moléculas com log BB > 0,3 permeiam a barreira hematoencefálica facilmente, enquanto que os valores inferiores a -1,0 indicam baixa permeação³³. A maioria dos monoterpenos avaliados possui coeficiente de partição sangue-cérebro considerado ideal para substâncias bioativas que atuam no sistema nervoso central³⁴. Esta propriedade pode

ser correlacionada, por exemplo, ao uso popular de plantas medicinais, contendo derivados terpênicos, como sedativas, tranquilizantes e anticonvulsivantes³⁵.

Na sequência avaliou-se a energia de interação dos monoterpenos com as enzimas ciclooxygenase 1 (PDB 1HT5, 2OYU e 3N8Z) e ciclooxygenase 2 (PDB 4COX, 6COX e 3LN1) utilizando o servidor *Mcule* (Tabela 4). Observou-se que todos os monoterpenos avaliados, independente da enzima, possuem energia de interação menor do que a observada para COX-1/COX-2 - ibuprofeno. Para o ibuprofeno, assim como para a maioria dos monoterpenos, observou-se que os valores de energia de interação são similares para as enzimas COX-1 e COX-2. Já para os monoterpenos bicíclicos cânfora, borneol e acetato de bornila observou-se energia de interação maior para as enzimas COX-2 do que para as enzimas COX-1. No entanto, os poucos dados sobre inibição *in vitro* de COX-1 e COX-2 disponíveis na literatura²¹ não permitem que os resultados apresentados na Tabela 4 sejam devidamente explorados. Para o carvacrol, por exemplo, observa-se que os valores de inibição da COX-1 (IC₅₀ = 0,8 µM) e da COX-2 (IC₅₀ = 0,7 µM), reportados na literatura²¹, são concordantes com a relação de energia de interação apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de *docking score* (kcal/mol), obtidos no servidor *Mcule*, para a interação ciclooxygenase-monomerpeno.

Composto	Ciclooxygenase 1				Ciclooxygenase 2			
	1HT5	2OYU	3N8Z	Média	4COX	6COX	3LN1	Média
Ibuprofeno	-7,7	-7,5	-7,0	-7,4	-7,8	-7,3	-7,4	-7,5
Timol	-6,5	-6,2	-6,4	-6,4	-7,2	-6,5	-6,7	-6,8
Carvacrol	-6,9	-6,6	-6,8	-6,8	-6,9	-6,5	-6,7	-6,7
Timoquinona	-6,7	-6,6	-6,5	-6,6	-7,3	-6,7	-6,6	-6,9
<i>p</i> -Cimeno	-6,5	-6,4	-6,8	-6,6	-6,9	-6,3	-6,6	-6,6
β-Mirceno	-5,7	-5,8	-6,0	-5,8	-6,3	-5,5	-6,0	-5,9
Limoneno	-6,4	-6,2	-6,6	-6,4	-6,8	-6,4	-6,6	-6,6
Álcool perfílico	-6,6	-6,4	-6,4	-6,5	-6,8	-6,3	-6,4	-6,5
Nerol	-6,1	-6,0	-6,3	-6,1	-6,4	-6,0	-6,3	-6,2
Geraniol	-6,0	-6,1	-6,0	-6,0	-6,5	-5,9	-6,4	-6,3
Geranial	-6,1	-6,0	-6,1	-6,1	-6,5	-5,9	-6,0	-6,1
Neral	-6,0	-5,8	-6,3	-6,0	-6,5	-6,1	-6,1	-6,2
1,8-Cineol	-6,0	-4,9	-4,9	-5,3	-6,8	-6,2	-6,3	-6,4
Mentona	-6,8	-5,9	-6,0	-6,2	-7,0	-6,5	-6,8	-6,8
Mentol	-6,6	-5,8	-5,9	-6,1	-7,1	-7,1	-6,7	-7,0
Acetato de mentila	-7,4	-6,4	-6,1	-6,6	-7,4	-7,2	-7,3	-7,3
Cânfora	-6,0	-5,0	-5,0	-5,3	-6,5	-6,2	-6,1	-6,3
Borneol	-5,9	-4,5	-5,1	-5,2	-6,3	-6,1	-5,9	-6,1
Acetato de bornila	-6,2	-5,4	-5,4	-5,7	-7,4	-6,9	-6,8	-7,0
Linalol	-6,0	-5,8	-6,3	-6,0	-6,3	-5,9	-6,2	-6,1
Acetato de linalila	-6,6	-6,5	-6,3	-6,5	-6,9	-6,5	-6,7	-6,7

As energias associadas à interação dos monoterpenos com as enzimas ciclooxygenases 1 (PDB 3N8Z) e 2 (PDB 4COX) foram estudadas utilizando o programa *iGEMDOCK* (Tabelas 5 e 6). Observa-se que as energias de interação enzima-

monoterpeno são menores do que a energia de interação enzima-ibuprofeno. Para as duas enzimas, os monoterpenos que apresentaram maior e menor energia de interação foram o geraniol e o acetato de bornila, respectivamente.

Tabela 5: Energias, calculadas no programa *i*GEMDOCK, envolvidas na interação COX-1 (PDB 3N8Z) - monoterpenos.

Composto	Tipos de energia em kcal/mol			
	Total	Interações de van der Waals	Interações de hidrogênio	Eletrostática
Ibuprofeno	-90,11	-78,11	-8,51	-3,49
Geraniol	-75,54	-66,98	-8,56	0,00
Linalol	-73,82	-67,53	-6,29	0,00
Timol	-72,46	-60,57	-11,89	0,00
Carvacrol	-70,75	-63,21	-7,54	0,00
Nerol	-70,49	-61,25	-9,24	0,00
Mentol	-69,07	-65,81	-3,26	0,00
Acetato de mentila	-68,53	-68,53	0,00	0,00
Mentona	-66,17	-62,49	-3,68	0,00
Neral	-63,94	-63,94	0,00	0,00
Geranial	-63,51	-63,51	0,00	0,00
β -mirceno	-63,17	-63,17	0,00	0,00
<i>p</i> -Cimeno	-61,31	-61,31	0,00	0,00
Borneol	-60,70	-50,39	-10,30	0,00
Limoneno	-60,19	-60,19	0,00	0,00
Acetato de linalila	-58,23	-58,23	0,00	0,00
Cânfora	-56,39	-50,69	-5,70	0,00
1,8-cineol	-56,24	-53,74	-2,50	0,00
Acetato de bornila	-50,09	-50,09	0,00	0,00

Tabela 6: Energias, calculadas no programa *i*GEMDOCK, envolvidas na interação COX-2 (PDB 4COX) - monoterpenos.

Composto	Tipos de energia em kcal/mol			
	Total	Interações de van der Waals	Interações de hidrogênio	Eletrostática
Ibuprofeno	-79,23	-75,73	-3,50	0,00
Geraniol	-71,83	-62,49	-9,34	0,00
Timol	-70,94	-67,44	-3,50	0,00
Nerol	-70,85	-65,85	-5,00	0,00
Mentona	-70,29	-59,15	-11,14	0,00
Linalol	-67,48	-55,26	-12,23	0,00
Mentol	-66,37	-62,94	-3,43	0,00
Carvacrol	-65,07	-61,69	-3,38	0,00
Acetato de linalila	-64,80	-64,80	0,00	0,00
Acetato de mentila	-64,16	-64,16	0,00	0,00
β -mirceno	-62,51	-62,51	0,00	0,00
<i>p</i> -Cimeno	-61,81	-61,81	0,00	0,00
Neral	-61,39	-61,39	0,00	0,00
Geranial	-60,74	-60,74	0,00	0,00
Limoneno	-59,36	-59,36	0,00	0,00
1,8-cineol	-59,26	-55,76	-3,50	0,00
Cânfora	-57,18	-52,19	-4,99	0,00
Borneol	-57,03	-47,40	-9,64	0,00
Acetato de bornila	-53,37	-53,37	0,00	0,00

Para a enzima ciclooxygenase 1 (PDB 3N8Z), a análise das sobreposições das interações enzima-monoterpeno revela que há duas regiões onde os ligantes estão ancorados

(denominadas de M1 e M2, Figura 2). Já para a enzima ciclooxygenase 2 (PDB 4COX), existe quatro regiões de ancoragem (denominadas de M1, M2, M3 e M4, Figura 3).

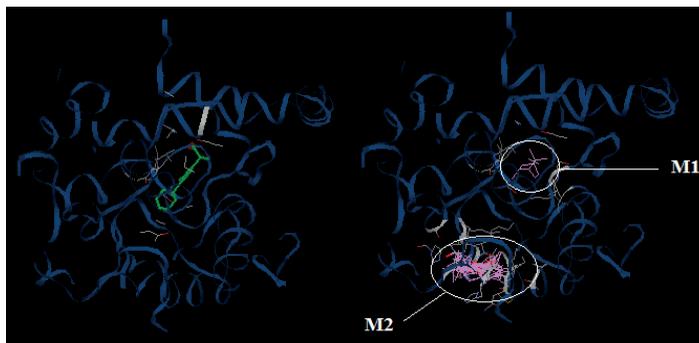


Figura 2: Estrutura tridimensional, obtida a partir de *docking* molecular, utilizando o *software* iGEMDOCK 2.1, da ciclooxigenase 1 (PDB 3N8Z) com: (a) ligante cristalográfico (flurbiprofeno); (b) ibuprofeno (referência) e monoterpenos.

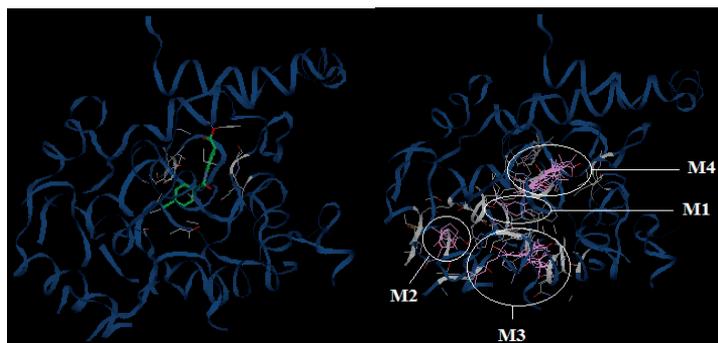
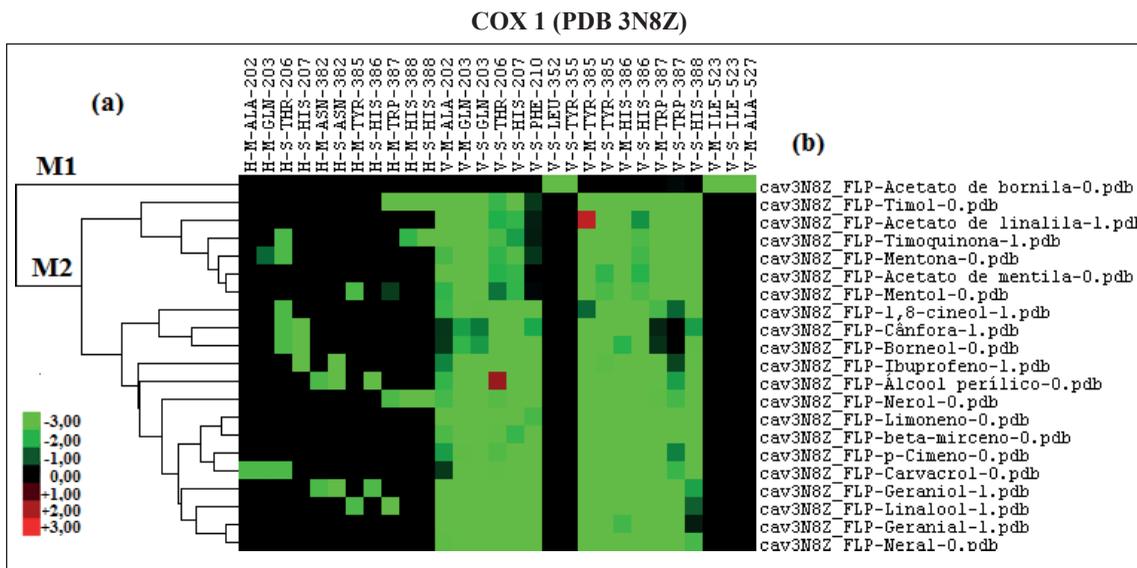


Figura 3: Estrutura tridimensional, obtida a partir de *docking* molecular, utilizando o *software* iGEMDOCK 2.1, da ciclooxigenase 2 (PDB 4COX) com: (a) ligante cristalográfico (indometacina); (b) ibuprofeno (referência) e monoterpenos.

Os resultados obtidos no *iGEMDOCK* foram explorados utilizando análise de agrupamento hierárquico. A partir do dendograma apresentado na Figura 4, observa-se que, para a enzima ciclooxigenase 1 (PDB 3N8Z), os monoterpenos podem ser divididos em dois grupos: **M1** formado por acetato de bornila e **M2** - formado por ibuprofeno e os demais

monoterpenos. Já para a enzima ciclooxigenase 2 (PDB 4COX), os monoterpenos podem ser divididos em quatro grupos: **M1** - formado por carvacrol; **M2** - formado por mentona, geranial, limoneno, β-mirceno, timol e timoquinona; **M3** - formado por 1,8-cineol e cânfora; **M4** - formado por ibuprofeno e os demais monoterpenos.



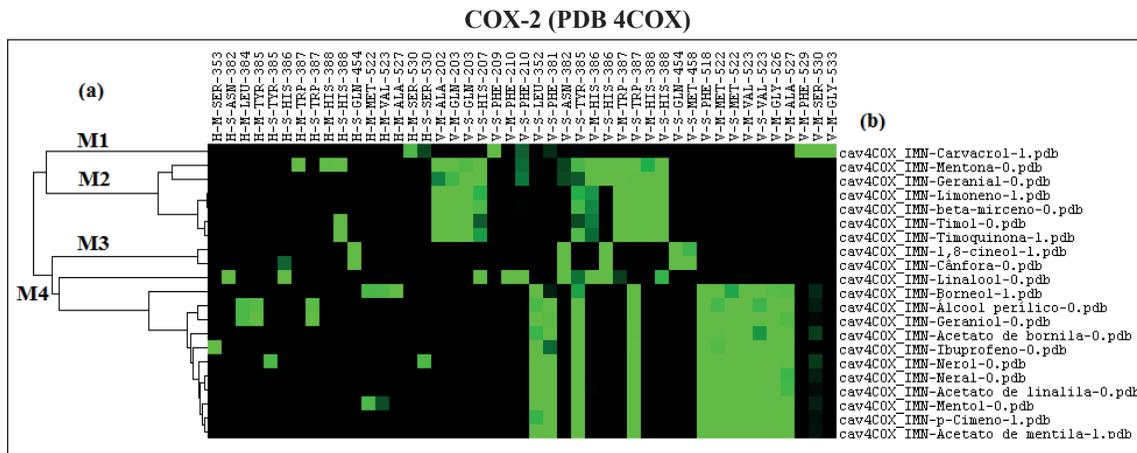


Figura 4: (a) Agrupamento hierárquico do perfil de interação dos monoterpenos por *ranking* farmacológico e de energia. (b) O “gene matriz” exibe perfil de interações dos monoterpenos com a ciclooxigenase, onde H e V representam ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, respectivamente. As interações “V” são coloridas em verde quando a energia for menor que $-4,0$. As ligações de hidrogênio são coloridas em verde, se a energia for inferior a $-2,5$. M e S indicam que o resíduo pertence à cadeia principal ou cadeia lateral, respectivamente.

Segundo estudo³⁶, o centro do sítio ativo da enzima COX-1 é composto pelo resíduo Tyr385, que está situado próximo ao íon ferro da protoporfirina. Nesta região da enzima (canal), os resíduos Arg120, Glu524, Tyr355 e His90 formam uma rede de ligações de hidrogênio que atuam como uma porta para o sítio ativo. Os anti-inflamatórios não esteroidais, geralmente, se ligam entre a porção superior do canal de COX localizado perto Tyr385 e Arg120. Este perfil de interações foi observado para o ibuprofeno e para os monoterpenos avaliados (Figura 4), com exceção do acetato de bornila que estabelece interações de van der Waals com os resíduos Leu352, Tyr355, Ile523 e Ala527.

Para a enzima COX-2 o sítio ativo, devido à presença de um resíduo Val523 (isoleucina em COX-1) e um resíduo Val434 (isoleucina em COX-1), cria um segundo bolso, que é acessível no sítio ativo da COX-2.

Como modelo de inibidor seletivo da COX-2 pode-se citar o composto diarileterocíclico SC-558.³⁷ A atividade inibidora de COX-2 apresentada por este composto está associada às interações com os resíduos de aminoácidos (His90, Arg513, Phe518 e Gln192) que revestem o bolso secundário da enzima. O anel *p*-bromofenil do composto SC-558 está orientada no sítio ativo da COX-2, estabelecendo interações hidrofóbicas com Phe381, Tyr385, Phe513, Trp387 e Leu384. No presente trabalho, observou-se que o ibuprofeno e os demais monoterpenos integrantes do grupo M4 estabelecem interações com resíduos Tyr385, Trp387 e Phe518, que são consideradas importantes para substâncias que apresentam inibição seletiva de COX-2³⁶.

4 Conclusão

O estudo *in silico* de vinte monoterpenos, comuns em óleos essenciais, sugere que estes produtos naturais possuem características moleculares e propriedades farmacocinéticas esperadas para substâncias bioativas candidatas a fármacos.

Além disso, alguns dos monoterpenos avaliados apresentaram interação com as enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e 2 (COX-2), com energia e orientação semelhante ao fármaco ibuprofeno. Desta forma, estudos *in silico* adicionais poderão contribuir para o melhor entendimento do mecanismo de ação de monoterpenos com ação anti-inflamatória.

Agradecimentos

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pelo apoio financeiro.

Referências

1. Saroya AS. Herbalism, phytochemistry and ethnopharmacology. USA: Science Publishers; 2010.
2. Can Baser KH, Buchbauer G. Handbook of essential oils. Boca Raton: CRC; 2010.
3. Simões CM, Spitzer SV. Óleos essenciais. In: Simões CMO, Schenckel EP, Gosmann G, Mello JCP. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS; 2000.
4. Siani AC, Sampaio ALF, de Souza MC, Henriques MGML, Ramos MFS. Óleos essenciais. Biotecnologia Ciênc Desenvolv 2000;3(16):38-43.
5. Leal-Cardoso JH, Fonteles MC. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. An Acad Bras Ci 1999;71(2):207-13.
6. Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. Int J Curr Res 2011;3(2):86-98.
7. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem 2003;10(10):813-29.
8. Roberts SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. Nat Chem Biol 2007;3(7):387-95.
9. Dewik PM. Medicinal natural products. A biosynthetic approach. Chichester: John Wiley & Sons; 2002.
10. Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Trends Plant Sci 2001;6(2):78-84.

11. Rohmer M. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure Appl Chem* 2003;75(2/3):375-87.
12. Bick JA, Lange BM. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch Biochem Biophys* 2005;15(2):146-54.
13. Gould MN. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ Health Perspect* 1997;105(Suppl 4):977-9.
14. Ehrnhöfer-Ressler MM, Fricke K, Pignitter M, Walker JM, Walker J, Rychlik M, *et al.* Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *J Agric Food Chem* 2013;61(14):3451-9.
15. Riella KR, Marinho RR, Santos JS, Pereira-Filho RN, Cardoso JC, Albuquerque-Junior RL, Thomazzi SM. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *J Ethnopharmacol* 2012;143(2):656-63.
16. Lima MS, Quintans-Júnior LJ, Santana WA, Martins Kaneto C, Pereira Soares MB, Villarreal CF. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur J Pharmacol* 2013;699(1-3):112-7.
17. Silva FV, Guimarães AG, Silva ER, Sousa-Neto BP, Machado FD, Quintans-Júnior LJ, *et al.* Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *J Med Food* 2012;15(11):984-91.
18. Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, Moretti MD. Anti-inflammatory activity of linalol and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* 2002;9(8):721-6.
19. Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol* 2001;60(6):404-15.
20. Grangeiro NMGC, Chaves HV, Silva AAR, Graça JRV, Lima V, Bezerra MM. Enzimas ciclooxygenase 1 e 2: inflamação e gastro-cardio proteção. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica* 2008;2(3):13-20.
21. Sá RCS, Andrade LN, Sousa DP. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* 2013;18(1):1227-54.
22. Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules* 2010;15:9252-87.
23. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
24. Yoon WJ, Kim SS, Oh TH, Lee NH, Hyun CG. *Torreya nucifera* essential oil inhibits skin pathogen growth and lipopolysaccharide-induced inflammatory effects. *Int J Pharmacol* 2009;5:37-43.
25. Juergens UR, Stöber M, Schmidt-Schilling L, Kleuver T, Vetter H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes *ex vivo*. *Eur J Med Res* 1998;17:407-12.
26. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;23(1-3):3-25.
27. Zhao Y, Abraham MH, Lee J, Hersey A, Luscombe NC, Beck G, *et al.* Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharm Res* 2002;19:1446-57.
28. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 2002;45:2615-23.
29. Subramanian G, Kitchen DB. Computational approaches for modeling human intestinal absorption and permeability. *J Mol Model* 2006;12(5):577-89.
30. Gleeson MP. Plasma protein binding affinity and its relationship to molecular structure: an in-silico analysis. *J Med Chem.* 2007;50(1):101-12.
31. Wermuth CG. The practice of medicinal chemistry. Great Britain: Academic; 2003.
32. Zlotos G, Bucker A, Kinzig-Schippers M, Sögel F, Holzgrabe U. Plasma Protein Binding of Gyrase Inhibitors. *J Pharm Sci* 1998;87(2):215-20.
33. Kaznessis YN. A review of methods for computational prediction of blood-brain partitioning. *Curr Med Chem* 2005;5(3):185-191.
34. Fung A, Vizcaychipi M, Lloyd D, Wan Y, Ma D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. *Brain Res* 2012;1446:144-55.
35. Passos CS, Arbo MD, Rates SMK, von Poser GL. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Braz J Pharmacogn* 2009;19(1A):140-9.
36. Raol PNP, Knaus EE. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2008;11(2):81s-110s.
37. Kurumbail R, Stevens A, Gierse J, McDonald J, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996;384:644-8.