

**FACULDADE DE CIÊNCIAS HUMANAS, EXATAS E DA SAÚDE DO PIAUÍ
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO VALE DO PARNAÍBA**

**Wanderson da Silva Nery
Luis Fernandes de Sousa Santos
Giovanna Louise Bezerra Lima**

Evaluation of the cardiometabolic activity of norbixin_an *in silico* study

Wanderson da Silva Nery
Luis Fernandes de Sousa Santos
Giovanna Louise Bezerra Lima

Evaluation of the cardiometabolic activity of norbixin_an *in silico* study

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Humanas, Exatas e da Saúde Do Piauí (FAHESP) - Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba (IESVAP), como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Linha de pesquisa: Produtos Naturais;
Farmacologia

Orientador: Thiago de Souza Lopes Araújo

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO	4
MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
RESULTADOS E DISCUSSÃO	5
CONCLUSÃO	15

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CARDIOMETABÓLICA DA NORBIXINA: UM ESTUDO IN SILICO

RESUMO

INTRODUÇÃO: O Cardiometabolismo estuda as interações cardiovasculares decorrentes de alterações metabólicas. Diabetes e hipertensão, grandes contribuintes para a mortalidade global, frequentemente causam essas mudanças. Nessa área, o excesso de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) associadas ao colesterol é reconhecido por efeitos prejudiciais no sistema cardiovascular, incluindo estresse oxidativo, comprometimento da função endotelial, rigidez arterial, pressão arterial elevada e formação de placas ateroscleróticas. As estatinas são agentes farmacêuticos com propriedades redutoras de lipídios e anti-inflamatórias, as quais estão fortemente associadas a melhores prognósticos e qualidade de vida. **OBJETIVOS:** A norbixina, um apocarotenoide, é conhecida por mitigar reações oxidativas, por isso, tal estudo visa examinar os impactos cardiometabólicos da norbixina, comparando seus efeitos com os das estatinas por meio de análise de docking molecular. **METODOLOGIA:** A molécula do composto foi inicialmente obtida no formato SDF do banco de dados Pubchem e posteriormente transformada para o formato SMILES usando o software Discovery. Em seguida, o arquivo resultante foi examinado no site Way2Drugs. As propriedades farmacocinéticas da norbixina foram avaliadas usando o programa online pkCSM no presente estudo. Ao mesmo tempo, as estruturas proteicas dos receptores M1, M2, M3, hCOX, PPARalpha e PPAR gamma foram adquiridas do Banco de Dados de Proteínas. Ligantes e proteínas foram preparados adequadamente para o processo de ancoragem usando AutodockTools. Os critérios de eficácia foram determinados considerando os níveis de energia de ligação que proporcionaram os resultados mais favoráveis durante o curso deste processo. **RESULTADOS E DISCUSSÕES:** Os resultados do estudo revelaram que a norbixina forma ligações de hidrogênio com o aminoácido Glicina526 e facilita cerca de vinte interações hidrofóbicas. As afinidades dos complexos (Norbixina-M1) e (Norbixina-M2) foram mostradas como $-4,8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ e $-3,2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente. O carotenoide norbixina exibiu interações de ligação de hidrogênio com os aminoácidos Asp1020, Arg1145 e Asn80 nas mesmas enzimas. Quanto à interação entre norbixina e o receptor PPARgamma, uma energia de interação de $-5,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ foi descoberta. Na investigação comparativa realizada em fenofibrato e rosuvastatina no receptor PPARgamma, observou-se que ambos os compostos exibiram valores de energia de ligação de $-4,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. **CONCLUSÃO:** A avaliação da norbixina em relação à sua interação com o ligante PPARgamma demonstrou uma energia de ligação semelhante às energias de ligação observadas para fenofibrato e rosuvastatina. A rosuvastatina tem fortes interações com o receptor PPARgamma, influenciando a diferenciação de adipócitos, retardando a progressão da aterosclerose, melhorando a eficácia da insulina e a captação de glicose. Análises computacionais indicam que a norbixina pode proporcionar benefícios cardiometabólicos comparáveis. Mais pesquisas, incluindo experimentos in vitro e modelos animais, são essenciais para compreender e apoiar esses benefícios na prática, contribuindo significativamente para avanços científicos e potencial desenvolvimento de novos medicamentos ou intervenções em cardiometabologia.

Palavras Chaves: Estatinas; Sistema Cardiovascular; Fármacos Cardiovasculares; Plantas Medicinais.

ABSTRACT

Cardiometabolism is a field of study that examines the cardiovascular interactions that occur as a consequence of metabolic alterations. Diseases like diabetes and hypertension, which are well-known for being significant contributors to global mortality rates, frequently cause these changes. In the field of cardiometabolism, it is widely recognized that an excess of low-density lipoproteins (LDL) associated with cholesterol is associated with various detrimental effects on the cardiovascular system. These effects include the promotion of oxidative stress, impairment of endothelial function, arterial stiffness, elevated blood pressure, and the development of atherosclerotic plaques. The term "atheroma" refers to a pathological condition characterized by the formation of fatty deposits. In this context, pharmaceutical agents like statins, which possess lipid-lowering and anti-inflammatory attributes, exhibit a strong association with improved prognostic outcomes and enhanced quality of life among individuals. The compound known as norbixin is an apocarotenoid that has been found to possess the ability to mitigate specific oxidative reactions. Consequently, the aim of this study is to examine the cardiometabolic impacts of norbixin and to conduct a molecular docking analysis to compare its effects with those of statins. The compound molecule was initially acquired in SDF format from the Pubchem database and subsequently transformed into SMILES format using Discovery software. Following this, the resultant file underwent examination on the Way2Drugs website. The pharmacokinetic properties of norbixin were assessed using the online program pkCSM in the present study. Concurrently, the protein structures of the M1, M2, M3, hCOX, PPARalpha, and PPAR gamma receptors were acquired from the Protein Data Bank. The ligands and proteins were adequately prepared for the docking process using AutodockTools. The efficacy criteria were determined by considering the binding energy levels that yielded the most favorable results during the course of this process. The findings of the study revealed that norbixin forms hydrogen bonds with the amino acid Gly526 and facilitates around twenty hydrophobic interactions. The affinities of the complexes (Norbixin-M1) and (Norbixin-M2) were shown to be $-4.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $-3.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. The carotenoid norbixin exhibited hydrogen bonding interactions with the amino acids Asp1020, Arg1145, and Asn80 in the same enzymes. Regarding the interaction between norbixin and the PPARgamma receptor, an interaction energy of $-5.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ was discovered. In the comparison investigation conducted on fenofibrate and rosuvastatin at the PPARgamma receptor, it was observed that both compounds exhibited binding energy values of $-4.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. The evaluation of norbixin in regard to its interaction with the PPARgamma ligand demonstrated a binding energy that is similar to the binding energies observed for fenofibrate and rosuvastatin. It's important to note that rosuvastatin has strong interactions with this receptor, which means it plays a part in changing how adipocytes differentiate, slowing down the progression of atherosclerosis, making insulin work better, and bettering glucose uptake. Within this particular scenario, computational analyses indicate that norbixin may provide cardiometabolic advantages that are comparable to those of rosuvastatin. Because of this, more research needs to be done on this substance, including in vitro experiments and animal models, to support and better understand these benefits in a practical setting. The inclusion of this supplementary research holds the promise of making a substantial contribution to the progression of scientific understanding and, ultimately, the creation of novel medicines or interventions within the realm of cardiometabology.

KEYWORDS: Statins; Cardiovascular System; Cardiovascular Agents; Medicinal Plants

INTRODUÇÃO

O cardiometabolismo refere-se à investigação científica da intrincada interação entre o sistema cardiovascular e os processos metabólicos [1]. Distúrbios cardiometabólicos, incluindo diabetes, obesidade e hipertensão, são os principais contribuintes para a mortalidade global. Uma substância chamada acetil-CoA é usada para iniciar o processo de produção de colesterol. A enzima HMG-CoA redutase ajuda nesse processo e é encontrada em muitas células e tecidos. A conversão de acetil-CoA em mevalonato serve como o passo inicial na via de biossíntese. Posteriormente, através de uma série de eventos consecutivos, o mevalonato passa por transformações adicionais, levando à formação de lanosterol. Finalmente, através de processos enzimáticos adicionais, o lanosterol é convertido em colesterol. A enzima HMG-CoA redutase, na qual alguns fármacos como as estatinas têm como alvo para inibir sua atividade e assim prevenir a síntese de colesterol no fígado, é necessária para a série de eventos descritos. O colesterol passa por processos metabólicos que contribuem para a síntese de várias substâncias essenciais, incluindo hormônios adrenais, gônadas, sais biliares e membranas celulares, além de servir como fonte de energia [2]. As enzimas derivadas da família do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) desempenham um papel crucial nos processos metabólicos associados a essa substância. Especificamente, elas facilitam o transporte de lipídios para o tecido adiposo e contribuem para o metabolismo lipídico intracelular, regulando proteínas envolvidas na conversão de ácidos graxos em ésteres de acetil-CoA, além de facilitar a importação e oxidação de ácidos graxos dentro de peroxissomos e mitocôndrias [2]. Vale ressaltar que, no contexto do cardiometabolismo, existe uma associação inerente entre o metabolismo do colesterol e seu impacto na promoção de danos cardiovasculares. Isso se deve ao fato de que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) servem como uma forma transportadora de colesterol e têm recebido atenção significativa a esse respeito. O epíteto "colesterol ruim" é atribuído à sua capacidade de facilitar o transporte de colesterol do fígado para várias regiões anatômicas do corpo, incluindo o sistema arterial. Nesse contexto, níveis elevados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) estão associados a uma probabilidade aumentada de oxidação do colesterol e subsequente acúmulo nas paredes arteriais. Esse processo desencadeia uma resposta inflamatória caracterizada por disfunção endotelial, potencialmente levando à obstrução luminal, rigidez arterial e desenvolvimento de arteriosclerose [2], [3]. Uma vez iniciado, esse fenômeno resultará em uma elevação na resistência vascular periférica, levando assim a um aumento na pressão sanguínea. A pressão sanguínea elevada tem sido associada a uma variedade de problemas cardiovasculares, incluindo infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca [3]. O Norbixina, representado na Figura 1, é um composto apocarotenóide derivado da planta *Bixa orellana*. Ele serve como corante e antioxidante em uma ampla gama de produtos alimentícios, incluindo produtos lácteos, salsichas, molhos para salada, cereais, refrigerantes, produtos de panificação e licores. Do ponto de vista molecular, pode-se observar que a molécula de norbixina possui características que a tornam susceptíveis à deterioração quando submetidas a várias condições, incluindo, mas não se limitando a luz, baixo pH, oxigênio e altas temperaturas. Consequentemente, a preservação de alimentos contendo norbixina requer cuidados e atenção redobrados. A dose diária recomendada de norbixina é de 0,6 miligramas por quilograma de peso corporal [4]. Em relação às suas capacidades antioxidantes, essa molécula tem a capacidade de mitigar reações oxidativas que contribuem para o desenvolvimento de um sabor rançoso nos alimentos [5]. Consequentemente, ela aumenta a longevidade do produto e preserva suas características organolépticas, tornando-o apropriado para consumo ao longo de um período prolongado [6]. O objetivo deste estudo é realizar uma

análise comparativa dos efeitos cardiometabólicos da norbixina, um composto natural, com aqueles de medicamentos redutores de lipídios e avaliar suas respectivas atividades biológicas usando técnicas de modelagem computacional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, o site Pubchem foi utilizado para recuperar as estruturas químicas dos compostos no formato SDF, que foram subsequentemente transformados no formato grin usando o Discovery Studio Visualizer V21.1.0.20298. Após a conclusão do processo de download, o arquivo contendo imagens smiley foi posteriormente carregado no site way2drugs, hospedado pela Pass Online ©2011 - 2022 • Versão 2.0. Os dados farmacocinéticos associados à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade foram adquiridos através da utilização do servidor web pkCSM [7]. Essas medidas abrangeram lipofilicidade, propriedades físico-químicas, solubilidade em água, potencial de absorção intestinal (HIA), capacidade de absorção de drogas (PCaco2), permeabilidade cutânea (PSkin), capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e potencial de interação com a glicoproteína-P. A avaliação do metabolismo de drogas foi conduzida avaliando a eficácia da operação envolvendo a subfamília CYP450. Além disso, a excreção renal OCT2 foi medida como indicador do OCT2 da droga. O presente estudo tem como objetivo realizar uma avaliação toxicológica focada na hepatotoxicidade. Adicionalmente, um teste composto de toxicidade será realizado. A abreviatura MES será utilizada ao longo do estudo para conveniência. Além disso, as características consideradas neste estudo incluíram a toxicidade das substâncias em investigação, bem como a toxicidade composta associada à categoria específica de toxicidade à qual pertencem [8]. A conformação tridimensional (3D) dos receptores colinérgicos muscarínicos (M1, M2, M3) em humanos, bem como da ciclo-oxigenase humana (hCOX)-1, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPARalfa) e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARGama), foram recuperadas do Banco de Dados de Proteínas (PDB) usando os códigos de identificação PDB respectivos: 5CXV, 3UON, 5ZHP, 6Y3C, 1I7G e 5GTP. Conforme a fonte fornecida [9], o programa Vina AutoDock, acessível no site <https://vina.scripps.edu/>, foi utilizado. A preparação de ligantes e proteínas para cálculos foi conduzida usando o AutoDock Tools (ADT) 1.5.6 [10]. Átomos de hidrogênio foram introduzidos nos receptores e ligantes separadamente. As cargas de Gasteiger foram subsequentemente calculadas usando o software ADT, e os hidrogênios não polares foram incorporados. As dimensões da caixa de grade foram estabelecidas como 25 Å para cada eixo. As caixas de grade foram posicionadas nas coordenadas dos átomos restantes presentes tanto na região do sítio ativo quanto na região da interface. O parâmetro para o número de modos foi configurado para um valor de 50, enquanto o parâmetro para exaustividade foi configurado para um valor de 24. Uma série de dez cálculos de docking molecular foi realizada. O estabelecimento de valores mais precisos para a energia de ligação (ΔG_{bind}) tem sido reconhecido como um fator crucial na avaliação da eficiência das interações [11], [12] e [13].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

É essencial para o organismo que a enzima CYP2J2 converta o ácido araquidônico (AA) em ácidos epoxyeicosatrienoicos (EETs), que são conhecidos por proteger o coração. Em geral, a síntese do ácido eicosapentaenoico (EET) é conhecida por predominar e ter efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular. No entanto, medicamentos competitivos ou não competitivos têm o potencial de prejudicar a síntese de EET, e o metabolismo de medicamentos por CYP2J2 tem o potencial de produzir metabólitos cardiotoxicos no coração ou em outros tecidos

corporais. Além disso, deve-se notar que CYP2J2 desempenha um papel crucial no metabolismo hepático e extra-hepático de numerosos compostos farmacêuticos [14]. A atividade observada da norbixina contra o CYP2J2, com um valor de 0,893 (Tabela 1), sugere um impacto cardioprotetor potencial. Isso ocorre porque o CYP2J2 é conhecido por desempenhar um papel biológico significativo na conversão do ácido araquidônico (AA) em ácidos epoxyeicosatrienoicos (EETs) cardioprotetores. Em geral, a síntese de ácido eicosapentaenoico (EET) predomina e confere efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular. No entanto, a síntese de EET pode ser prejudicada por medicamentos competitivos ou não competitivos, enquanto o metabolismo de medicamentos por CYP2J2 tem o potencial de gerar metabólitos cardiotóxicos no coração ou em outros tecidos corporais [15]. Além disso, deve-se notar que CYP2J2 desempenha um papel fundamental no metabolismo hepático e extra-hepático de numerosos compostos farmacêuticos [16].

A expressão do mRNA de CYP2J2 em humanos é principalmente limitada ao sistema cardiovascular e ao fígado, com uma presença notável no ventrículo direito do coração. No entanto, foram observações desse mRNA também nos rins. Os níveis de expressão de mRNA e proteínas em vários tecidos, incluindo pulmão, cérebro, trato gastrointestinal, pâncreas e certos tecidos cancerosos humanos, são comparativamente mais baixos. Foram observadas diferenças na expressão do mRNA e proteína de CYP2J2 no fígado; no entanto, o impacto na função cardíaca ainda precisa ser determinado. Além disso, a presença de várias bandas imunorreativas foi revelada em análises de Western blot feitas a partir de extratos de fígado e coração de humanos adultos. Existe uma hipótese sugerindo que essas entidades são isoformas não caracterizadas de CYP2J2. Essas isoformas exibem funcionalidades comparáveis ou alternativas à isoforma primária de CYP2J2, justificando assim investigações adicionais [16]. A função precisa de CYP2J2 no metabolismo de drogas cardíacas permanece parcialmente inexplorada, apesar de sua presença elevada no sistema cardiovascular em relação a outros órgãos [18].

A proteína ubiquinol-citocromo c redutase 1 (UQCRC1) é um membro crucial do complexo III mitocondrial. Ela tem 480 aminoácidos e é codificada pelo DNA nuclear. UQCRC1 é composta por oito subunidades, a saber UQCRC1, UQCRC2, UQCRH, UQCRB, UQCRCQ, membro 9, UQCR10 e UQCR11. As mitocôndrias desempenham um papel significativo na cardioproteção, pois são o alvo primário de medicamentos cardioprotetores que visam induzir efeitos cardioprotetores como a isquemia e a pré-condicionamento farmacológico. A regulação para cima de UQCRC1 foi observada para mitigar disfunções mitocondriais, enquanto sua superexpressão foi encontrada para aumentar a atividade do complexo III mitocondrial. A expressão da proteína UQCRC1 foi mostrada como diminuída em ratos que tinham isquemia. Portanto, postula-se que a modulação da expressão dessa proteína por medicamentos cardioprotetores e sua redução durante lesões de isquemia indique sua influência potencial sobre as atividades mitocondriais, semelhante aos seus efeitos cardioprotetores observados [19].

A doença cardíaca isquêmica é reconhecida como a principal causa de mortalidade em escala global. Consequentemente, há um consenso amplamente aceito sobre o envolvimento pivotal das mitocôndrias na cardioproteção. As mitocôndrias são consideradas o foco central para múltiplos mecanismos cardioprotetores, como o pré-condicionamento isquêmico, o pós-condicionamento e o pré-condicionamento farmacológico. Foi estabelecido que a regulação para cima de UQCRC1 leva a uma atividade aumentada do complexo III mitocondrial, enquanto sua regulação para baixo ocorre na presença de disfunção mitocondrial. No contexto da cardioproteção, a expressão de UQCRC1 é diminuída durante a isquemia ou lesão de

reperusão no tecido cardíaco. Portanto, vale a pena investigar o impacto direto de UQCRC1 na função mitocondrial, pois pode desempenhar um papel crucial na proteção do coração contra lesões de isquemia ou reperusão [19].

Table 1. Possível Atividade Biológica para $P_a > 0.8$.

Pa	Pi	Activity (Pa>Pi)
0,893	0,005	CYP2J substrate
0,889	0,007	Ubiquinol-cytochrome-c reductase inhibitor
0,88	0,009	Phobic disorders treatment
0,876	0,008	Saccharopepsin inhibitor
0,876	0,008	Chymosin inhibitor
0,876	0,008	Acrocylindropepsin inhibitor **
0,875	0,01	Testosterone 17beta-dehydrogenase (NADP+) inhibitor **
0,852	0,006	CYP2J2 substrate

Sucropepsina, também conhecida como proteinase A, é uma proteinase aspártica vacuolar presente em leveduras de pão e vinho. Ela desempenha um papel crucial na ativação de muitas hidrolases, incluindo proteinase B e carboxilase Y. A emergência dessa capacidade é acreditada ser resultado da autoativação de seu zimogênio no ambiente ácido do vacúolo fúngico. Esse processo é comparável à ativação da pepsinogênio, que ocorre quando é liberado no lúmen do estômago e encontra o pH ácido do estômago. As proteinases aspárticas são tipicamente observadas em retrovírus, fungos, plantas superiores e mamíferos. A enzima exibe uma substancial similaridade estrutural com proteinases aspárticas mamíferas, incluindo a renina humana. Ela serve como um modelo valioso para investigar inibidores de renina através da aplicação da cristalografia de raios-X. Além disso, ela exibe um nível de especificidade comparável ao da catepsina D e pepsina [20].

Chimosina é uma proteína sintetizada por animais ruminantes, especificamente bovinos e camelos, dentro de suas células gástricas durante o período neonatal. A indústria alimentícia utiliza essa proteína para a produção de produtos lácteos, já que ela desempenha um papel crucial no processo de coagulação do leite, facilitando a formação de coalhadas, queijos e iogurtes. A supressão dessa atividade tem o potencial de perturbar o processo de metabolização do leite nesses animais. Visser et al. (1987) conduziram o estudo [21].

Acrocilindropepsina é um constituinte químico presente na folhagem da *Gymnema sylvestre*, uma espécie de planta classificada na família Asclepiadaceae e tipicamente encontrada em áreas de bosques abertos situadas ao redor da fronteira Índia-Ásia (Kanetkar et al., 2007). A folha em questão possui uma proeminência cultural significativa dentro da região asiática,

especialmente no âmbito da medicina popular. Ela é amplamente reconhecida por sua utilização como remédio natural para distúrbios estomacais, bem como suas propriedades diuréticas. Além disso, é considerada possuir propriedades curativas para o manejo do diabetes. Folhas de *Gymnema sylvestre* têm sido documentadas como contendo flavonoides, quinonas, ácidos fenólicos e saponinas. Esta planta em particular exibe características associadas à hipoglicemia, cardiostimulação, hepatoproteção e uteroproteção [22].

A 17-beta desidrogenase de testosterona, também conhecida como desidrogenases 17-beta-hidroxiesteroides (17 beta-HSDs), são proteínas enzimáticas que desempenham um papel crucial na modulação de androgênios e estrogênios, facilitando seus processos de ativação e inativação. A enzima 17 beta-hidroxiesteroides desidrogenase tipo 1 (17 beta-HSD tipo 1) exibe uma notável afinidade por esteroides C18 e serve como a isoenzima predominante encontrada nas células da granulosa ovariana. O papel principal dessa enzima é catalisar a conversão do esteroide C18 biologicamente inerte, estrona, no estrogênio biologicamente ativo, estradiol. Essa atividade enzimática ocorre especificamente em nível local, onde facilita o estímulo do desenvolvimento folicular [23].

No entanto, um papel adicional dessas enzimas é ajudar na redução do efeito do estradiol no epitélio glandular do endométrio secretor. Isso é realizado pelo desenvolvimento da isoenzima oxidativa tipo 2, que converte o estradiol em estrona, tornando-o assim inativo. A enzima 17 beta-hidroxiesteroides desidrogenase tipo 2 exibe funcionalidade catalítica no processo de conversão de 20-alfa-hidroxiprogesterona em progesterona. Além disso, é digno de nota que ela possui um mecanismo de inativação de andrógenos, desempenhando assim um papel na regulação dos níveis de androgênios e estrogênios que exercem seus efeitos nos tecidos periféricos. O principal local de expressão para o tipo 3 de 17 beta-HSD é o testículo, onde catalisa a conversão do esteroide C19 biologicamente inerte, androstenediona, no hormônio androgênico biologicamente ativo, testosterona. A importância dessa enzima é tal que quaisquer anormalidades no gene responsável por sua produção, HSD17B3, podem levar a uma síntese diminuída de testosterona nos testículos fetais. Consequentemente, isso pode resultar no desenvolvimento de estruturas normais do ducto de Wolff no recém-nascido, acompanhadas por genitália externa feminina [23], [24].

Além disso, essas enzimas têm um papel em outros processos bioquímicos, incluindo a conversão de androstenediona em testosterona, a conversão de di-hidrotestosterona em 5 α -androstanediona, 3 α -androstaniol ou 3 β -androstaniol, e a conversão de 16 α -hidroxiestrone em estriol [23].

Norbixina é um composto químico que pode ser encontrado naturalmente em várias fontes alimentares, incluindo pimentas e páprica. O consumo de alimentos ricos em norbixina tem o potencial de resultar em efeitos deletérios (Tabela 2), incluindo a detecção de sangue oculto nas fezes. Isso é atribuído às propriedades irritantes da molécula de norbixina, que podem levar à irritação do revestimento do trato gastrointestinal [25].

No caso de irritação no revestimento do trato gastrointestinal, existe o potencial para a manifestação de inflamação e subsequente sangramento. Hemorragia pode ocorrer no trato gastrointestinal resultando na presença de sangue nas fezes, porém não necessariamente discernível por observação visual desassistida. O termo médico para esse tipo de sangramento é sangue oculto nas fezes. A detecção de sangue oculto nas fezes pode servir como indicação de vários distúrbios médicos, como úlceras, inflamação dos intestinos, doença de Crohn, colite ulcerativa e câncer de cólon [26].

Portanto, embora a norbixina possa não ser o principal fator etiológico para a detecção de sangue oculto nas fezes, o consumo aumentado de alimentos ricos nesse composto tem o potencial de induzir irritação do epitélio gastrointestinal, contribuindo assim potencialmente para o desenvolvimento de tais doenças. A manutenção de uma dieta equilibrada e diversificada, caracterizada pela moderação no consumo de alimentos que têm o potencial de irritar o sistema gastrointestinal, é de grande importância. No caso de suspeita de sangue nas fezes, é imperativo buscar prontamente aconselhamento médico.

Tabela 2. Possíveis efeitos adversos e tóxicos (a previsão é baseada em manifestações clínicas, que às vezes são observadas em poucos ou mesmo em um único paciente) $P_a > 0.8$.

Pa	Pi	Activity (Pa>Pi)
0.825	0.006	Occult bleeding
0.822	0.015	Sweating
0.81	0.012	Hematemesis

Tabela 3. A substância em questão foi comparada à norbixina pela análise ADMET, levando aos seguintes resultados.

Property	Model Name	Norbixin	Digoxin	Unit
		Predicted Value	Predicted Value	
Absorption	Water solubility	-3.72	-4.01	Numeric (log mol/L)
	Caco2 permeability	1.142	0.614	Numeric (log Papp in 10cm/s)
	Intestinal absorption(human)	100	65.826	Numeric (% Absorbed)
	Skin Permeability	-2.735	-2.736	Numeric (log Kp)
	P-glycoprotein substrate	No	Yes	Categorical (Yes/No)
	P-glycoprotein I inhibitor	No	No	Categorical (Yes/No)
	P-glycoprotein II inhibitor	Yes	No	Categorical (Yes/No)
Distribution	VDss (human)	-1.36	0.211	Numeric (log L/kg)

	Fraction unbound (human)	0.009	0.327	Numeric (Fu)
	BBB permeability	-0.143	-1.448	Numeric (log BB)
	CNS permeability	-2.677	-3.819	Numeric (log PS)
Metabolism	CYP2D6 substrate	No	No	Categorical (Yes/No)
	CYP3A4 substrate	Yes	Yes	Categorical (Yes/No)
	CYP1A2 inhibitor	No	No	Categorical (Yes/No)
	CYP2C19 inhibitor	No	No	Categorical (Yes/No)
	CYP2C9 inhibitor	No	No	Categorical (Yes/No)
	CYP2D6 inhibitor	No	No	Categorical (Yes/No)
	CYP3A4 inhibitor	No	No	Categorical (Yes/No)
Excretion	Total Clearance	0.811	0.479	Numeric (log ml/min/kg)
	Renal OCT2 substrate	No	No	Categorical (Yes/No)
Toxicity	AMES toxicity	No	No	Categorical (Yes/No)
	Max. tolerated dose (human)	-0.519	-3.353	Numeric (log mg/kg/day)
	hERG I inhibitor	No	No	Categorical (Yes/No)
	hERG II inhibitor	No	Yes	Categorical (Yes/No)
	Oral Rat Acute Toxicity (LD50)	2.013	3.981	Numeric (mol/kg)

	Oral Rat Chronic Toxicity(LOAEL)	1.924	2418	Numeric (log mg/kg_bw/day)
	Hepatotoxicity	No	No	Categorical (Yes/No)
	Skin Sensitisation	No	No	Categorical (Yes/No)
	T.Pyriformis toxicity	0.312	0.285	Numeric (log ug/L)
	Minnow toxicity	-0.641	3.08	Numeric (log mM)

A análise ADMET (Tabela 3) revela que a solubilidade da norbixina em água é relativamente baixa. Um valor de log mol/L de -3.72 indica que $10^{-3.72}$ mol de uma substância são necessários para dissolver 1 litro de água a uma temperatura de 25 °C, indicando que a solubilidade da substância em água é extremamente baixa. $1,67 * 10^{-4}$ gramas da substância estão contidos por litro de água. O valor de log Papp para permeabilidade em Caco2 foi de 1.142 a 10 cm/s, indicando que a substância possui alta permeabilidade através da membrana celular epitelial do cólon. Devido à dificuldade que a norbixina enfrenta em atravessar as barreiras hematoencefálica e epidérmica, a substância é mais segura para uso do ponto de vista toxicológico. Outras informações toxicológicas não lançaram dúvidas sobre a segurança da substância questionada.

Os dados relacionados à interação molecular entre o carotenoide Norbixina e as enzimas, especificamente 5CXV, 3UON e 5ZHP (referidas como receptores M1, M2 e M3), bem como 5GTP (o receptor humano PPARgamma), estão apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 2 e 3.

Os valores de afinidade molecular foram derivados da interação entre o ligante norbixina e o receptor muscarínico de acetilcolina M3 (5ZHP), especificamente no sítio ativo de Leu225. A afinidade mostrou ter a menor energia de ligação de -7.5 kcal.mol⁻¹ (Tabela 1; Figura 1). No ligante, interações com os aminoácidos Asn152 e Trp199 do sítio ativo foram detectadas por ligação de hidrogênio. A Figura 1 ilustra a afinidade molecular entre a norbixina e 5ZHP. Em relação ao composto intrincado (Norbixina-5GTP), uma energia de interação de -5.6 kcal.mol⁻¹ foi relatada, enquanto nenhuma interação por ligação de hidrogênio foi detectada.

Os complexos (Norbixina-3UON) e (Norbixina-5CXV) apresentaram uma afinidade de -4.8 kcal.mol⁻¹ e -3.2 kcal.mol⁻¹, respectivamente. O carotenoide norbixina exibiu interações por ligação de hidrogênio com os aminoácidos Asp1020, Arg1145 e Asn80 nas mesmas enzimas.

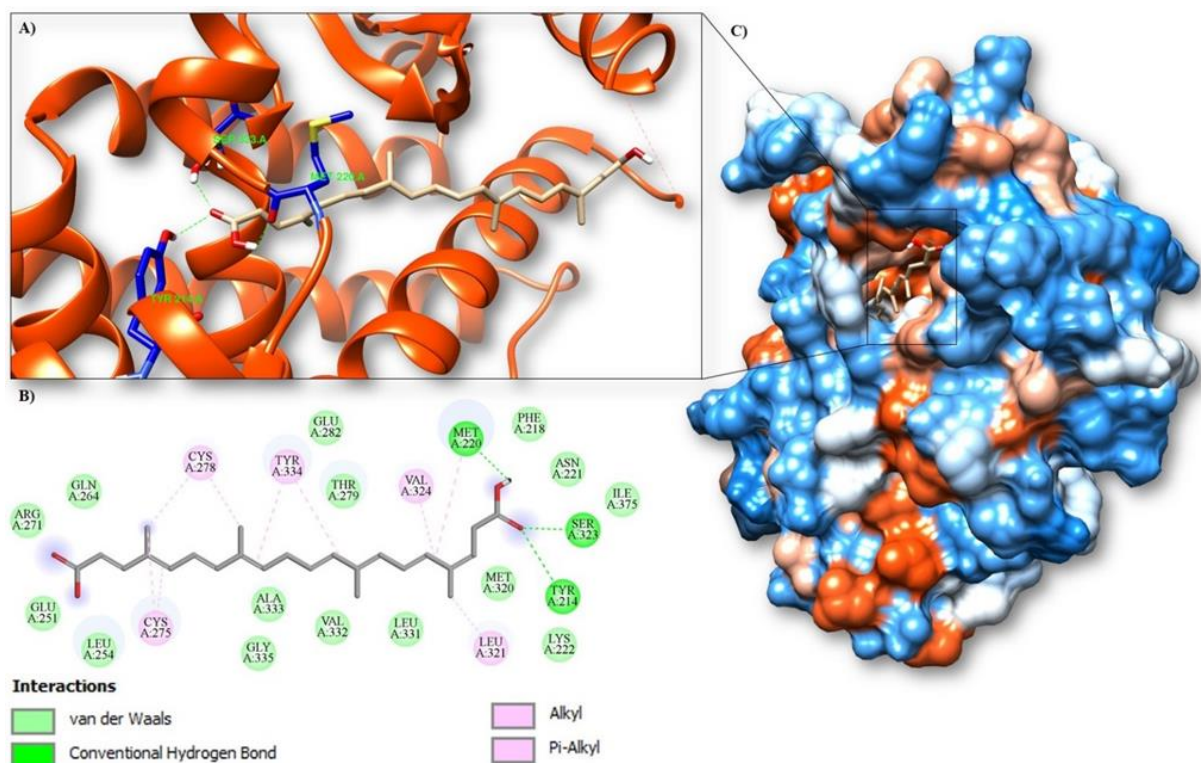
Tabela 4. Parâmetros de afinidade molecular do composto norbixina com proteína 5ZHP.

Complex (Ligand-Protein)	ΔG_{bind}^a (kcal.mol⁻¹)	Amino acids that interact via hydrogen bonding^c	Amino acids that perform hydrophobic interaction ^c
Norbixin- 1I7G/PPRAa	-7.8	Met220, Ser323, Tyr214	Arg271, Gln264, Cys278, Tyr334, Glu282, Thr279, Val324, Phe218, Asn221, Ile375, Lys222, Met320, Leu331, Val332, Ala333, Gly335, Cys275, Leu254, and Glu251
Norbixin- 5ZHP/M3	-7.5	Asn152 e Trp199	(Ile222, Leu225, Trp525, Ser518, Asn513, Val510, Thr231, Tyr148, Tyr506, Trp503, Val155, Ala238 and Ala238).
Norbixin- 6Y3C/hCOX-1	-7.1	Gly526	Phe99, Trp100, Leu357, Met113, Leu359, Leu93, Leu112, Tyr355, Val116, Arg120, Ala527, Val349 Ser353, Leu531, Leu92, Leu115, Leu115, Ser530, Leu352and Trp387
Norbixin- 5GTP/PPRAy	-5.6	-	Lys230, Asp381, Arg234, Asp380, Ser382, Lys216, Tyr219 and Lys231
Norbixin- 3UON/M2	-4.8	Asp1020 e Arg1145	Glu1045, His1031, Leu1032, Glu1011, Gly1030, Thr1026, Gln1105, Phe1104, and Asp1070
Norbixin- 5CXV/M1	-3.2	Asn80	Leu44, Thr76, Ser36, Gly33, Leu37 and Val40
Fenofibrato- 1I7G/PPRAa	-6.7	-	Leu203, Leu410, Ser414, Lys208, Tyr211, Ala207, Ser373, His411, Lys204, andVal407
Fenofibrato- 5GTP/PPRAy	-4.6	-	His217, Lys216, Arg212, Leu423, Leu419, Ser208, Ala209 and Ala213
Rosuvastatin- 1I7/PPRAa	-8.1	Cys275 e Thr279	Met320, Phe218, Met220, Val324, Leu331, Ala333, Val332, Cys278, Tyr334, Glu282, Asn219, Thr283 and Glu286
Rosuvastatin- 5GTP/PPRAy	-4.6	Lys216 and Arg212	Ala213, Leu423, Ser208, Ala209 and Asp210

^a Power bond na melhor conformação; ^b Melhor constante de inibição; ^c Obtido com o ligplot.

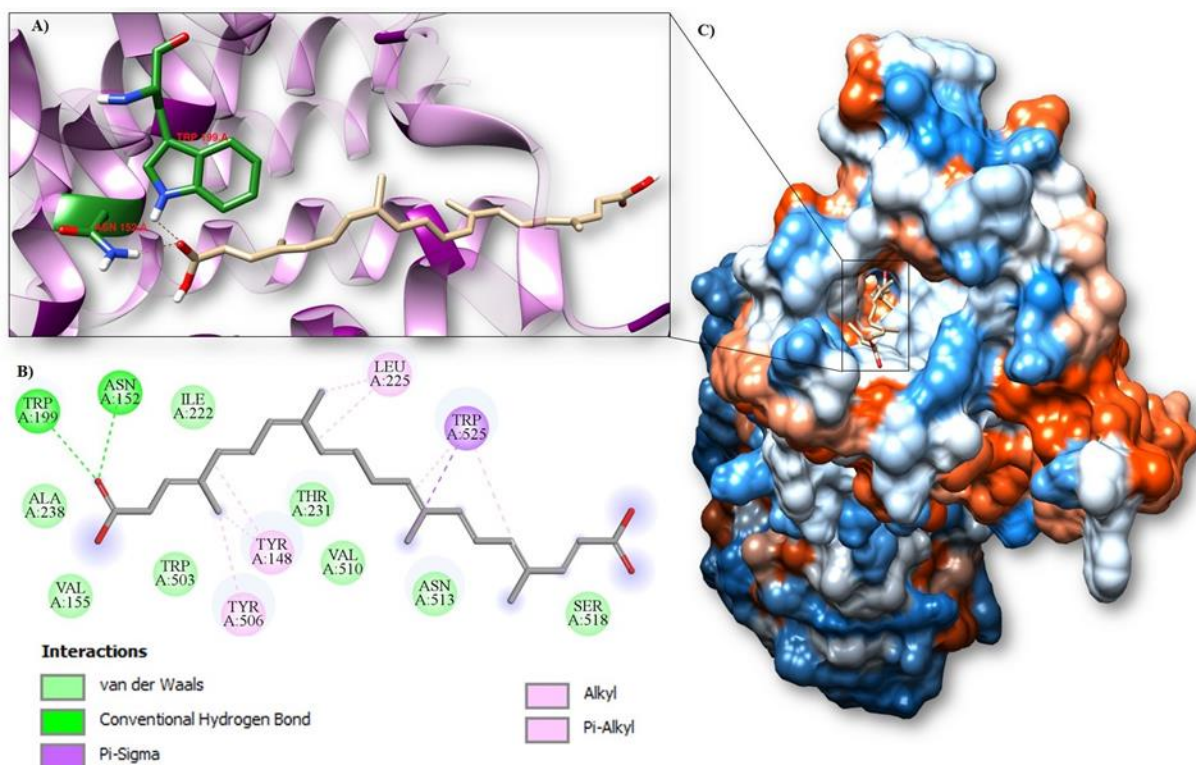
Os parâmetros de afinidade molecular ótima foram derivados investigando a interação entre a enzima PPARalpha e o ligante norbixina dentro do sítio ativo. A afinidade foi observada com uma energia de ligação de $-7.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, como visto na Tabela 4 e na Figura 1. O complexo entre 1I7G e Norbixina exibiu a formação de três ligações de hidrogênio (Met220, Ser323, Tyr214) dentro do sítio ativo da proteína, bem como dezenove interações hidrofóbicas (Arg271, Gln264, Cys278, Tyr334, Glu282, Thr279, Val324, Phe218, Asn221, Ile375, Lys222, Met320, Leu331, Val332, Ala333, Gly335, Cys275, Leu254 e Glu251).

Figura 1 - a) Interação 3D por pontes de hidrogênio (Met220 e Tyr214). b) conformação 3D do sítio de ligação ativa do ligante norbixina com a enzima 1I7G c) esquema 2D mostrando ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas no complexo proteína-ligante (1I7G/Norbixina).



Os parâmetros de afinidade molecular foram derivados da análise de interação entre o ligante norbixina e a proteína 5ZHP. A afinidade do ligante foi determinada como tendo a energia de ligação mais baixa de $-7.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, conforme indicado na Tabela 4 e na Figura 2. A análise do ligante revelou interações com os aminoácidos Trp199 e Asn152 no sítio ativo através de ligações de hidrogênio, bem como oito ligações hidrofóbicas com Ile222, Leu225, Trp525, Ser518, Asn513, Val510, Thr231, Tyr148, Tyr506, Trp503, Val155, Ala238 e Ala238.

Figure 2 - a) Interação 3D por pontes de hidrogênio (Trp199 e Asn152). b) conformação 3D do sítio de ligação ativa do ligante norbixina com a enzima 5ZHP c) esquema 2D mostrando ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas no complexo proteína-ligante (Norbixin/5ZHP)



A enzima ciclo-oxigenase humana (6Y3C) apresentou uma afinidade de ligação de $-7.1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ao interagir com o composto norbixina. Os resultados do estudo indicam que o ligante forma ligações de hidrogênio com o aminoácido Gly526 e participa de vinte interações hidrofóbicas com aminoácidos específicos (Phe99, Trp100, Leu357, Met113, Leu359, Leu93, Leu112, Tyr355, Val116, Arg120, Ala527, Val349, Ser353, Leu531, Leu92, Leu115, Leu115, Ser530, Leu352, Trp387), conforme apresentado na Tabela 4.

O complexo (Norbixina-5GTP) apresentou uma energia de interação de $-5.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$, no entanto, não foram detectadas interações de ligação de hidrogênio. Os complexos (Norbixina-3UON) e (Norbixina-5CXV) exibiram afinidades de $-4.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-3.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente. O carotenoide norbixina exibiu interações de ligação de hidrogênio com os aminoácidos Asp1020, Arg1145 e Asn80 nas mesmas enzimas, conforme mostrado na Tabela 1.

O ligante fenofibrato exibiu parâmetros de afinidade com as enzimas 1I7G/PPRAa e 5GTP/PPRAY em seus sítios ativos. A energia de ligação para a enzima 1I7G/PPRAa foi determinada como $-6.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$, enquanto para a enzima 5GTP/PPRAY, a energia de ligação foi vista como $-4.6 \text{ kcal.mol}^{-1}$. As interações de ligação de hidrogênio estavam ausentes, enquanto as interações hidrofóbicas foram exclusivas, conforme indicado na Tabela 1.

O ligante rosuvastatina exibiu afinidade em relação às enzimas 117G/PPRAa e 5GTP/PPRAy em seus sítios ativos, com energias de ligação de -8.1 kcal.mol⁻¹ e -4.6 kcal.mol⁻¹, respectivamente (conforme mostrado na Tabela 4).

CONCLUSÃO

Estudos in silico revelaram que a norbixina exibe uma energia de interação semelhante à rosuvastatina nos receptores PPAR gama. Este receptor desempenha um papel na diferenciação dos adipócitos, na redução da inflamação promovida pela aterosclerose e na diminuição da resistência à insulina. Além disso, foi observado que a norbixina interage com o CYP2J2, um receptor expresso proeminentemente no coração e no sistema cardiovascular. Consequentemente, a interação entre a norbixina e este receptor tem o potencial de conferir vantagens cardioprotetoras. A norbixina também demonstrou potencial para inibir a sacropepsina, uma substância química estruturalmente semelhante à renina, sugerindo um possível papel da norbixina no controle dos níveis de pressão sanguínea.

Portanto, é imperativo conduzir investigações adicionais sobre este composto, pois a eficácia notável da norbixina a torna um candidato potencial para exames in vitro relacionados ao manejo da dislipidemia. Tais esforços de pesquisa podem potencialmente aumentar a longevidade de indivíduos afetados por distúrbios cardiometabólicos e oferecer uma opção terapêutica alternativa para aqueles que apresentam intolerância aos estatinas e fibratos.

REFERÊNCIAS

- [1] Oliveira VP, Dias M da S, Lima NP, Horta BL. Birth conditions nutritional status in childhood associated with cardiometabolic risk factors at 30 years of age: a cohort study. *Cadernos de Saúde Pública* [Internet]. 2023 Jun 26 [cited 2023 Nov 13];39:e00215522. <https://doi.org/10.1590/0102-311XEN215522>
- [2] Botta M, Audano M, Sahebkar A, Sirtori C, Mitro N, Ruscica M. PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Apr 14;19(4):1197. <https://doi.org/10.3390/ijms19041197>
- [3] Reis SC. Uma revisão bibliográfica sobre aterosclerose. *Revista Eletrônica Acervo Científico*. 2019 Feb 4;3:e444. <https://doi.org/10.25248/reac.e444.2019>.
- [4] Silva AH da, Alves NV, Botelho AF, Padilha JB, Furtado BS, Oliveira MAC de A, et al. Dieta Hiperlipídica e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS): revisão sistemática sobre os fatores de risco. *Revista Científica UNIFAGOC - Saúde* [Internet]. 2021 Mar 26;5(2):17–29. Available from: <https://revista.unifagoc.edu.br/index.php/saude/article/view/601>
- [5] Diego Santiago Tupuna-Yerovi, Paese K, Simone Hickmann Flôres, Sílvia Stanisçuaski Guterres, Alessandro. Addition of norbixin microcapsules obtained by spray drying in an isotonic tangerine soft drink as a natural dye. *Journal of Food Science and Technology* [Internet]. 2019 Oct 22 [cited 2023 Nov 13];57(3):1021–31. Available from: <https://doi.org/10.1007%2Fs13197-019-04135-4>

[6] Garcia CER, Bolognesi VJ, Dias J de FG, Miguel OG, Costa CK. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciência Rural*. 2012 Aug;42(8):1510–7.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800029>

[7] Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2015 Apr 22;58(9):4066–72.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

[8] Anisodontus C, Arg M. UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI -URCA CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE -CCBS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA-BIOLÓGICA -PPQB [Internet]. 2022 [cited 2023 Jul 14]. Available from: <http://www.urca.br/ppqb/wp-content/uploads/sites/7/2023/01/TS-Freitas-SINTESE-ESPECTROSCOPIA-ESTUDOS-In-Vitro-E-In-Silico-DE-ATIVIDADE-ANTIBIOTICA-E-INIBICAO-DE-BOMBA-DE-EFLUXO.pdf>

[9] BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids. Res.*, v.28, p. 235–242, 2000

[10] Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009, 30, 2785–2791.

[11] Ouyang D, Zhang R, Yi L, Xi Z. A synergistic effect of Cu²⁺ and norbixin on DNA damage. *Food and Chemical Toxicology*. 2008 Aug;46(8):2802–7.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.021>

[12] Rocha, J.A.; Rego, N.C.S.; Carvalho, B.T.S.; Silva, F.I.; Sousa, J.A.; Ramos, R.M. et. Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. *Plos. One*. 2018, 13, e0198476.

[13] Romulo O. Barros, Fabio L. C. C. Junior, Wildrimak S. Pereira, Neiva M. N. Oliveira, and Ricardo M. Ramos. Interaction of Drug Candidates with Various SARS-CoV-2 Receptors: An in Silico Study to Combat COVID-19. *Journal of Proteome Research* 2020 19 (11), 4567-4575. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c0032.

[14] Solanki M, Pointon A, Jones B, Herbert K. Cytochrome P450 2J2: Potential Role in Drug Metabolism and Cardiotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018 Apr 25;46(8):1053–65.

<https://doi.org/10.1124/dmd.117.078964>

[15] Michaud V, Frappier M, Dumas MC, Turgeon J. Metabolic Activity and mRNA Levels of Human Cardiac CYP450s Involved in Drug Metabolism. Zanger UM, editor. *PLoS ONE*. 2010 Dec 14;5(12):e15666.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015666>

[16] Xu M, Ju W, Hao H, Wang G, Li P. Cytochrome P450 2J2: distribution, function, regulation, genetic polymorphisms and clinical significance. *Drug Metabolism Reviews*. 2013 Jul 19;45(3):311–52.

<https://doi.org/10.3109/03602532.2013.806537>

[17] Sisignano M, Steinhilber D, Parnham MJ, Gerd Geißlinger. Exploring CYP2J2: lipid mediators, inhibitors and therapeutic implications. *Drug Discovery Today*. 2020 Sep 1;25(9):1744–53.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.002>

[18] Zhang Y, Gao L, Yao B, Huang S, Zhang Y, Liu J, et al. Role of epoxyeicosatrienoic acids in cardiovascular diseases and cardiotoxicity of drugs. *Life Sciences*. 2022 Dec;310:121122.

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121122>

[19] Yi T, Wu X, Li H. Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 overexpression protects H9c2 cardiac cells against mimic ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt/GSK-3 β pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020 Sep 1;529(4):904–9.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.089>

[20] Cronin NB, Badasso MO, Tickle IJ, Dreyer T, Hoover DJ, Rosati RL, et al. X-ray structures of five renin inhibitors bound to saccharopepsin: exploration of active-site specificity 1 1Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*. 2000 Nov;303(5):745–60.

<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4181>

[21] Ansari SM, Jesper Givskov Sørensen, Schiøtt B, David Scott Palmer. On the effect of mutations in bovine or camel chymosin on the thermodynamics of binding κ -caseins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2017 Nov 8;86(1):75–87.

<https://doi.org/10.1002/prot.25410>

[22] Gulab S. Thakur. *Gymnema sylvestre*: An Alternative Therapeutic Agent for Management of Diabetes. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012 Dec 29

<http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2012.21201>

[23] Andersson S, Moghrabi N. Physiology and molecular genetics of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids*. 1997 Jan;62(1):143–7. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(96\)00173-0](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(96)00173-0)

[24] Poirier D. Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Current Medicinal Chemistry*. 2003 Mar 1;10(6):453–77. <https://doi.org/10.2174/0929867033368222>

[25] GOMES, Ana Maria Lins; Homeopata uma Visão do Alergista. Centro Alpha de Ensino. Associação Paulista de Homeopatia. 2014.

[26] Brum F. Exames de rastreamento para detecção precoce do câncer colorretal : uma revisão narrativa da literatura. lumeufrgsbr [Internet]. 2021 [cited 2023 Jul 14]; Available from: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/225684>