

## XXII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

### TRIAGEM *IN SILICO* E *IN VITRO* PARA IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL EFEITO INIBIDOR FRENTE A GLUTATIONA S- TRANSFERASE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

**Gabriel Lima Soares Rezende<sup>1</sup>; Mariana Borges Botura<sup>2</sup>; Amanda Ponce Morais  
Cerqueira<sup>3</sup>; Rodrigo Souza Conceição<sup>4</sup>; Manoelito Coelho dos Santos Junior<sup>5</sup>**

1. Gabriel Lima Soares Rezende, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: gabriel.rezend27@gmail.com
2. Mariana Borges Botura, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mbbotura@hotmail.com
3. Amanda Ponce Morais, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amandaponcedeleon@gmail.com
4. Rodrigo Souza Conceição, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: rodrigoszcz@gmail.com
5. Manoelito Coelho dos Santos Junior, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mc2500@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** Ocotea; carrapato; glutaciona S-transferase.

### INTRODUÇÃO

A ectoparasitose causada pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* têm sido um importante fator limitante na bovinocultura, devido a redução da produção de leite, perda de peso, aumento da mortalidade, perda da qualidade do couro e transmissão de agentes patogênicos. A principal medida de controle do *R. (B.) microplus* é a utilização de acaricidas sintéticos nos animais infestados, porém a seleção de cepas de carrapatos resistentes aos diferentes grupos químicos disponíveis no mercado, associado ao risco à saúde pública causado pela presença de resíduos de carrapaticidas em alimentos e no meio ambiente tem incentivado a busca de novos princípios ativos, incluindo produtos de origem vegetal (BANUMATHI et al., 2017).

Um promissor alvo molecular para o desenvolvimento de novos carrapaticidas é a glutaciona-S-transferase (GST), enzima responsável pelo metabolismo de xenobóticos no carrapato (ENAYATI et al., 2005). Este estudo teve como objetivos avaliar a atividade carrapaticida *in silico* e *in vitro* de composto isolado de *Ocotea aciphylla*,  $\beta$ -sitosterol.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Estudos *in silico*

A Construção do modelo 3D homólogo da enzima GST foi realizada utilizando-se o programa MODELLER e a qualidade do modelo foi avaliada utilizando o programa PROCHECK v.3.5.4, o servidor *Atomic Non-Local Environment Assessment* (ANOLEA) e o servidor ProSA-Web. Para os estudos de acoplamento molecular foi utilizado o programa DOCK 6.8 e acessórios, que aplica o método sistêmico, com função de pontuação baseados no campo de força de mecânica molecular.

As propriedades moleculares para a região de acoplamento molecular foram calculadas pelo programa GRID em sua configuração padrão. Para pontuação da



## XXII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

molécula foi utilizada a função GridScore. A análise das interações intermoleculares, foram realizadas no programa PLIP.

### Ensaio *in vitro*

O teste de imersão de larvas foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Sindhu et al. (2012) com modificações. As larvas de *R. microplus* foram acondicionados em seringas plásticas de 3 mL (aproximadamente 100 larvas/seringa). Cada grupo de larvas foi imerso nas soluções da substância teste ( $\beta$ -sitosterol isolado de *O. aciphylla*) ou controles (negativo: etanol a 70% e positivo: fipronil) durante 5 minutos. Após a imersão, foi retirado o líquido excedente da seringa e mantida em temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, foi realizada a contagem das larvas vivas e mortas através da avaliação da motilidade. Os percentuais de mortalidade foram calculados utilizando-se a seguinte fórmula: % mortalidade = número de larvas mortas / (número de larvas mortas + número de larvas vivas) x 100.

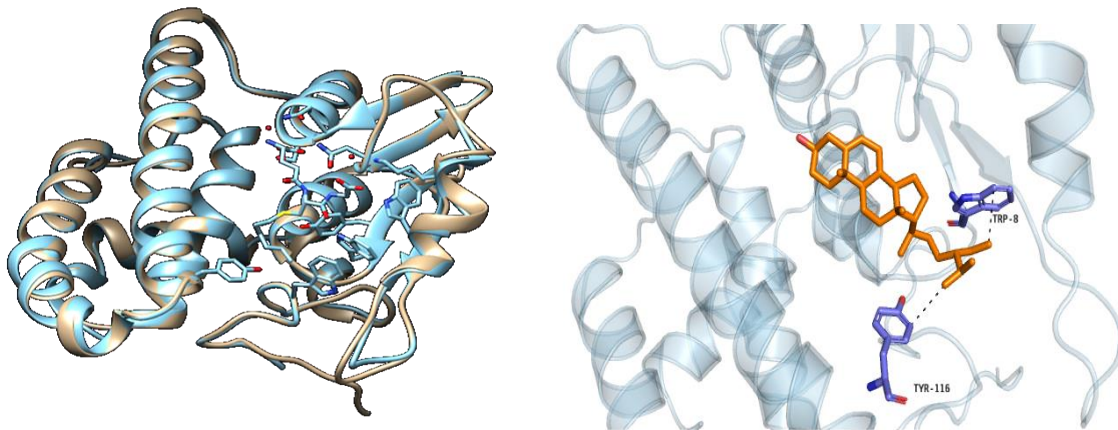
Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e avaliados por análise de variância de uma via (one way ANOVA) seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa estatístico Graphprism (versão 5.0).

### RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO

Como ainda não existe na literatura e em bancos de dados um modelo 3D da enzima glutationa S-transferase (GST) do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, foi necessário a criação de um modelo homólogo. Para a construção de um modelo fidedigno é preciso ter a sequência de nucleotídeos, então foi selecionado a sequência em FASTA do banco de proteínas do NCBI, cujo código de acesso é ADQ01067.1. Com a sequência da GST de *Rhipicephalus (B.) microplus* foi executado o BLAST, sendo encontrados 223 sequências de proteínas que continham alinhamento significativo. Destas sequências foi selecionado como molde a 1GSU, pois esta apresentou uma resolução de 1.94Å, 57.07% de identidade e 91% de cobertura da GST.

A construção do modelo no MODELLER, forneceu 5 modelos diferentes, e foi selecionada a melhor conformação conforme o critério de menor índice de proteínas discretas (DOPE), que correspondeu a -1.07. A sobreposição da estrutura escolhida com o modelo (1GSU) resultou em um RMSD de 0.258 Å (Figura 1), indicando que o modelo gerado detém o seus sítios ativo e alostérico conservados.

A análise do modelo criado pelo gráfico de Ramachandran RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; SASISEKHARAN, 1963) apontou que 93.4% dos resíduos se encontram em regiões favoráveis, 5.1% em regiões permitidas, 1,5% em regiões generosamente permitidas e nenhum resíduo em regiões não permitidas. Estes dados indicam que o modelo criado apresenta alta qualidade estérica, já que, modelos que possuem mais de 90% dos seus resíduos em regiões favoráveis e permitidas são apontados como excelentes (WHITEHEAD, 2006). A análise de energia na estrutura proteica realizada no servidor ANOLEA revelou que a maioria dos valores de energia foram negativos (88.35% dos aminoácidos), configurando assim uma alta qualidade energética para o modelo. Segundo Melo e Feytmans (1997), valores negativos são representativos de um ambiente energeticamente favorável e os valores positivos, ambiente desfavorável.

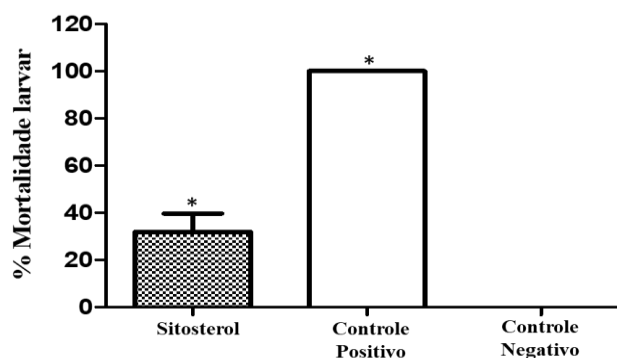
**XXII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS**  
**SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

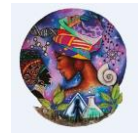
**Figura 1:** Sobreposição do modelo 1GSU (azul) e do modelo criado no MODELLER (bege). Em destaque ao lado, o ligante em interação com o sítio ativo da proteína que foi gerada.

A qualidade global do modelo foi avaliada no programa QMEAN6 (BENKERT et al., 2009), comparando-o com outras estruturas de tamanho semelhante, que gerou um valor de Z-SCORE de -1,33. Na literatura Benkert et al. (2009) afirmam que quando o parâmetro de Z-SCORE é menor que 1 a estrutura pode ser considerada de alta qualidade.

A análise do acoplamento molecular do modelo homólogo da enzima GST com o  $\beta$ -sitosterol demonstrou um valor de Gridscore equivalente a -44.70 kcal/mol. As interações intramoleculares geradas por esse complexo foram identificadas como interações hidrofóbicas entre o C61 da proteína com o Trp 8A e o H945 com a Tyr 116A. Sendo que, as duas interações ocorrem dentro da fenda do sítio alostérico.

A avaliação atividade carrapaticida *in vitro* do  $\beta$ -sitosterol frente a larvas de *R. (B.) microplus* revelou que este composto (3 mg/mL) promoveu uma média de 31,9% de mortalidade larval, diferindo estatisticamente do controle negativo ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). Em estudo realizado por Moawad, Mohammed, Arafa (2017), o  $\beta$ -sitosterol causou elevada taxa de mortalidade *in vitro* de estágios adulto (86,7%) e larval (91,7%) de outra espécie de carrapato, *R. (B.) annulatus*. No entanto, os autores utilizaram concentração superior (25 mg/mL) a testada no presente estudo (3 mg/mL).





## XXII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

**Figura 3:** Média e desvio padrão do percentual de mortalidade de larvas de *R. microplus* após tratamentos com sitosterol e fipronil (controle positivo). \* $p < 0.05$  comparado ao controle negativo.

### CONCLUSÕES

Neste trabalho foi desenvolvido um modelo tridimensional da enzima GST do carrapato *R. (B.) microplus*, capaz de ser utilizado para a predição de substâncias com potencial efeito inibitório sobre a GST. O composto  $\beta$ -sitosterol apresentou, *in silico*, capacidade de interagir com a enzima GST através de ligações hidrofóbicas presentes no seu sítio ativo. Esta substância tem atividade carrapaticida *in vitro*, no entanto sua eficácia é baixa.

### REFERÊNCIAS

- BANUMATHI, B. et al. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – A review. **Vet. Parasitol.**, v. 244, p. 102-110, 2017.
- BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, jul. 2009.
- ENAYATI, A.A. et al. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v.14, n.1, p.3-8, 2005.
- MELO, F.; FEYTMANS, E. Novel knowledge-based mean force potential at atomic level. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 1, p. 207-222, 1997.
- MOAWAD, A.; MOHAMMED, R.; ARAFA, W. Biologically-guided Isolation of Acaricidal Phytosterols: An *in vitro* Study against *Rhipicephalus (B.) annulatus* Ticks Infesting Cattle in Egypt. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 18, n. 3, abr. 2017.
- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95-99, jul. 1963.
- SINDHU, Z. U. D. et al. Syringe test (modified larval immersion test): A new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. **Vet. Parasitol.**, v.188, p. 362-367, 2012.
- WHITEHEAD, T. L. Molecular modeling: basic principles and applications, second edition. **Journal of Chemical Education**, v. 83, n. 6, p. 116-118, jun. 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed083p851>>. Acesso em: 13 jul. 2019.