



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DO EFEITO DE *Ocotea spixiana* FRENTE A TRIOSEFOSFATO ISOMERASE DE *Rhipicephalus microplus*

**Gabriel Lima Soares Rezende¹; Mariana Borges Botura²; Amanda Ponce Morais
Cerqueira³; Rodrigo Souza Conceição⁴; Manoelito Coelho dos Santos Junior⁵**

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; triosefosfato isomerase.

INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* tem sido responsável por consideráveis prejuízos econômicos na bovinocultura. A principal medida de controle deste carrapato é a utilização de acaricidas sintéticos nos animais infestados, porém a seleção de cepas de carrapatos resistentes aos diferentes grupos químicos disponíveis no mercado, tem incentivado a busca de novos princípios ativos que sejam menos tóxicos e mais eficientes (BANUMATHI et al., 2017).

O gênero *Ocotea* representa um importante membro da família Lauraceae, e diferentes atividades biológicas têm sido relatadas para espécies deste gênero, incluindo ação acaricida (CONCEIÇÃO et al., 2017). Dentre as espécies deste gênero encontradas no semiárido baiano, pode-se destacar a *Ocotea spixiana*, que apresenta atividade *in vitro* anticolinesterásica (CASSIANO, 2014).

Uma importante enzima presente no carrapato que representa um alvo para substâncias acaridas é a triosefosfato isomerase. Esta enzima participa da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a interconversão entre gliceraldeído 3-fosfato e fosfato de dihidroxiacetona. Dessa forma, sua inibição diminuiria a produção de ATP, interferindo nas funções celulares e provocando a morte do carrapato (MORAES et al., 2011).

METODOLOGIA

Inicialmente, foi realizada uma busca da estrutura macromolecular da enzima triosefosfato isomerase de *R. microplus* no *Protein Data Bank* (PDB) baseando-se nos fatores de qualidade cristalográfica (fator de resolução e valor R) e na presença do substrato para a localização das coordenadas do sítio ativo.

Para os estudos de acoplamento molecular de substâncias de *O. spixiana* com a trioseofosfato isomerase foi utilizado o programa DOCK 6.8 e acessórios (LANG et al., 2015). A delimitação do espaço de acoplamento molecular foi feita com o cálculo da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor gerada pelo programa acessório DMS. A partir do DMS foi construída a imagem negativa da superfície molecular do sítio ortostérico pelos programas SPHGEN e SPHERE_SELECTOR (KUNTZ et al., 1982). As propriedades moleculares para a região de acoplamento molecular foram calculadas pelo programa GRID em sua configuração padrão (MENG et al., 1992). Para pontuação das moléculas utilizou-se a função GridScore. As moléculas foram ordenadas por energia de afinidade e comparadas com inibidores clássicos da enzima TPI.

As moléculas foram ranqueadas por número, aquelas com melhores resultados foram analisadas de acordo com seu padrão de ligação com a enzima. Assim, a análise das interações intermoleculares, foi realizada no programa PLIP (SALENTIN, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção do modelo 3D da enzima triosefosfato isomerase (TPI)

No banco de dados *Protein Data Bank*, foi possível encontrar o modelo 3D da enzima triosefosfato isomerase (TPI) do carrapato *Rhipicephalus microplus*, com o código 3TH6 (Moraes, et. al. 2011). No entanto, este modelo foi cristalizado sem ligante e sem a delimitação do seu sítio ativo, que são características fundamentais para a os estudos de acoplamento molecular. Dessa forma, foi necessário selecionar uma proteína que apresentasse similaridade estrutural com a TPI e que concomitantemente estivesse na presença de um ligante, para que o sítio ativo estivesse especificado.

Para tanto, utilizou-se o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para a identificação de outras sequências de proteínas que possuíssem identidade com a TPI do carrapato (3TH6). Foram obtidas 100 sequencias de comparação significativa, e dentre estas, a melhor proteína com um ligante acoplado foi a 2I9E (TPI do *Tenebrio molitor*) com uma cobertura de 98% e identidade de 67,48% em relação a TPI do carrapato *R. microplus*. A sobreposição dessas duas proteínas gerou um RMSD de 0.568 Å (Figura 1), e segundo Eswar et al. (2016) estes resultados mostram que a proteína 2I9E possui semelhanças suficientes para a realização de testes *in silico*.

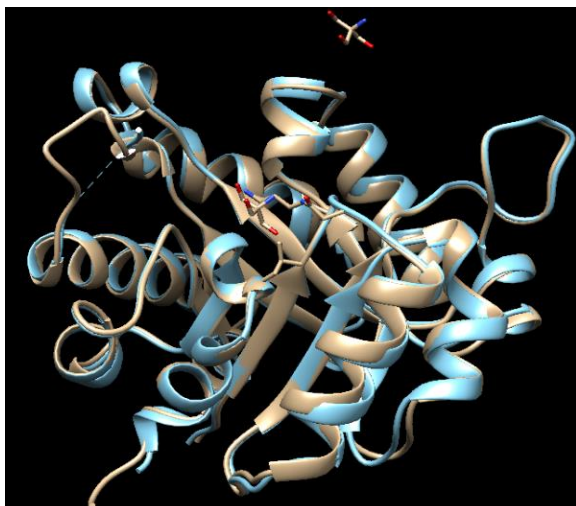


Figura 1: Sobreposição do modelo TPI de *R. microplus* (azul) com o modelo selecionado 2I9E (bege).

Ensaio *in silico*: acoplamento molecular

Foram selecionados 18 alcaloides presentes no extrato acetato de etila de *Ocotea spixiana*, que foram previamente identificados por nosso grupo de pesquisa. Os compostos avaliados foram: Armejavina, N-metil boldina, Boldina, Coclorina, Corituberina, N-metil isodomecicina, Isodomecicina, N-metil glaucina, Glaucina, Isocoridina, Magnocurarina, N-metil laurotetanina, N-metil nantenina, Nantenina, N-metil predicentrina, Predicentrina, Reticulina e Xanthoplanina.

Para o acoplamento molecular foi utilizado o programa AutoDock Vina (TROTT, OLSON, 2010), com a finalidade de encontrar a substância com melhor interação com a TPI. Dentre as moléculas testadas, a glaucina apresentou melhor resultado, considerando o parâmetro de energia de afinidade (kcal/mol). O programa gerou 9 conformações diferentes de possibilidade de interação da glaucina com a TPI, e a melhor conformação obteve um resultado de afinidade de -8.7kcal/mol, que segundo a classificação proposta por Trott e Olson (2010) pode ser considerado como um bom resultado.

Na avaliação das interações intramoleculares da glaucina com modelo da enzima, observou-se duas interações (Figura 2): uma ligação hidrofóbica, entre o átomo de carbono 471 da proteína, e asparagina (ASN) do ligante; e a outra interação foi uma ligação de hidrogênio entre o átomo 1852 da proteína, um átomo de oxigênio, com a metionina (MET). Ambas as ligações se encontram na fenda do sítio alostérico da proteína.

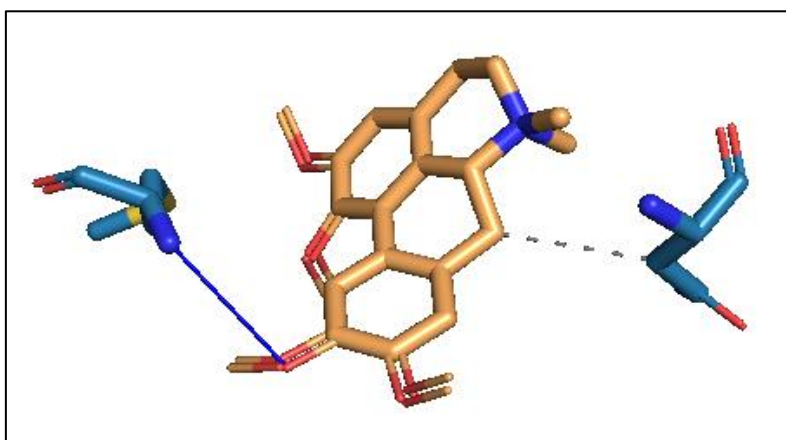


Figura 2: Interação da glaucina com a proteína 3TH6 (ligação tracejada: hidrofóbica e ligação contínua: hidrogênio)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A glaucina, alcaloide presente na espécie *O. spixiana*, apresentou, *in silico*, capacidade de interagir com a enzima TPI através de uma ligação hidrofóbica e uma ligação de hidrogênio, presentes no seu sítio alostérico. Este composto apresenta um potencial efeito frente ao alvo proposto, no entanto novos estudos *in vitro* frente a enzima e ao carrapato são necessários para a confirmação de sua ação carrapaticida

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- 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.
- CASSIANO, D. S. A. Estudo bioguiado através da atividade anticolinesterásica e da análise por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM/EM de *Ocotea* spp. (Lauraceae). 2014. 162f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.
- CONCEIÇÃO, R. S. et al. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 8, n. 2, p. 275-282, 2017.
- ESWAR, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Curr. Protoc. Bioinformatics**, v. 54, n. 5-6, p. 1-5, jun. 2016.
- KUNTZ, I.D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **J. Mol. Biol.**, v.161, p. 269-288, 1982.
- LANG, P.T. et al. DOCK 6.7 Users Manual. Regents of the University of California, 2015.
- MENG, E.C. et al. Automated docking with grid-based energy evaluation. **J. Comput. Chem.**, v.13; p.505-524, 1992.
- MORAES, J. et. al. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 41, 2011.
- SALENTIN, S. et al. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. **Nucl. Acids Res**, v. 43, n. 1, Apr. 2015.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput. Chem.**, v. 31, n. 2, p.455-461, 2010.