

IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA UDP-N-ACETILGLICOSAMINA PIROFOSFORILASE DO FUNGO *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* PELA TÉCNICA DE VIRTUAL SCREENING E DOCKING

Thiago Cardoso de Almeida¹; Manoelito Coelho dos Santos Junior².

1. Bolsista FAPESB/UEFS, Graduando em Ciências Farmacêuticas, UEFS, e-mail: thiago.uefs@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, UEFS, mc2500@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Moniliophthora perniciosa*, Virtual screening, UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase.

INTRODUÇÃO

O *Theobroma cacao* L. conhecido como cacauero é uma árvore da família Malvaceae, nativa da região Amazônica e tem como principal produto suas sementes, que são utilizadas como matéria-prima na produção de chocolate, manteiga de cacau, além de produtos farmacológicos (PURDY; SCHIMIDT, 1996).

Assim como o cultivo de café e cana-de-açúcar, o plantio de cacau marcou época na economia nacional, sendo uma das principais fontes geradoras de divisas na década de 70. Sua maior evolução se deu ao longo dos séculos XIX e XX a ponto de tornar-se a principal fonte de arrecadação fiscal da economia baiana e um importante produto na pauta de exportações brasileiras (MASCARENHAS, 2004). Na década de 70, cerca de 90% da produção era destinada à exportação e a Bahia era responsável por 80% da produção nacional (aproximadamente a 15% da produção mundial), o que correspondia a 60% do PIB do estado, ocupando cerca de 650 mil hectares no sul do estado e, sendo produzidas em 29 mil propriedades (CUENCA; NAZÁRIO, 2004).

A partir de 1989 houve uma queda na produção de cacau devido ao surgimento do fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa, a mais importante e destrutiva praga do cacauero (OLIVEIRA, 2005). Com a disseminação da praga o Brasil saiu de terceiro maior produtor de cacau para a de importador. Em 2000, foram importadas cerca de 71.000 toneladas de amêndoas de cacau (MEINHARDT *et al.*, 2008).

Atualmente a necessidade de controle da praga se baseia no fato de se encontrar novos fungicidas que tenham seletividade e bom custo de aplicação, o desenvolvimento de novos antifúngicos depende das diferenças bioquímicas entre os fungos e outros organismos. Da mesma forma como os inibidores da biossíntese da parede celular bacteriana como as penicilinas e cefalosporinas, têm apresentado bons resultados no controle de infecções bacterianas, a parede celular dos fungos é um bom alvo para o desenvolvimento de potentes antifúngicos (GRIFFITH & TRACY, 2002). Na busca por um controle efetivo da vassoura-de-bruxa, escolheu-se a rota metabólica que leva a síntese da quitina. O alvo escolhido nessa via metabólica foi a enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UNAcP) que é responsável em realizar a reação que forma UDP-N-acetilglicosamina, precursor essencial para a síntese de quitina, principal componente da parede celular fúngica (HERSCOVICS; ORLEAN, 1993).

Diante do impacto decorrente desta praga, o presente estudo teve como objetivo principal realizar um virtual screening no catálogo de produtos naturais do banco de estruturas ZINC¹² e justifica-se pela necessidade de identificar compostos químicos que possam ser utilizados como antifúngicos capazes de eliminar o fungo causador da vassoura-de-bruxa, proporcionando assim um plantio seguro da cultura do cacau, fazendo com que essa cultura volte a ser economicamente rentável.

METODOLOGIA

O presente projeto empregou métodos computacionais na busca de inibidores para a enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UNAcP), onde foram realizadas diferentes etapas de busca e validação. Inicialmente foi realizado um virtual screening no Zinc¹², que é um banco de estruturas moleculares mantido pela *University of California-San Francisco* (UCSF) o qual funciona como uma base que pode ser acessada gratuitamente para estudos de triagem virtual, formada por compostos comercialmente disponíveis, atualmente o Zinc¹² possui mais de 21 milhões de compostos (IRWIN *et al.*, 2012). Os compostos selecionados fazem parte da biblioteca de produtos naturais do Zinc¹², essa por sua vez é composta por cerca de 143.268 estruturas.

O virtual screening foi realizado pelo programa Autodock Vina 1.1.2, que utiliza o algoritmo estocástico *Iterated Local Search Global Optimizer*, com isso uma sucessão de passos com uma mutação e otimização local (pelo método Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno [BFGS] são conduzidas, sendo que cada passo obedece ao critério Metr opolis (TROTT; OLSON, 2010). O alvo molecular utilizado foi o modelo 3D da UNAcP do fungo *M. perniciosus* construído por Santos Junior *et al.* (2011) pela técnica de modelagem comparativa.

As coordenadas da caixa de acoplamento (*grid box*) foram obtidas no trabalho de Santos Junior e colaboradores (2013), assim o *grid box* foi definido como um cubo geométrico localizado nas coordenadas espaciais $x = -58,323$, $y = -19,926$ e $z = 79,633$ e com dimensões de 18 X 14 X 16  . As intera es entre as moléculas com menor energia de afinidade e o modelo da 3D da UNAcP foram determinadas pelo programa Discovery Studio 3.5 Visualizer.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ponto de partida para o virtual screening envolveu uma análise detalhada do sítio de liga o e uma compila o de todos os aspectos envolvidos na afinidade e seletividade. Os resíduos mais importantes para a rea o feita pela UNAcP são: Leu108, Gly111, Gly112, Asp254, Glu304, Asn328, His331, Phe381, Phe383 e Lys408 (PENEFF, 2001). O modelo utilizado neste estudo foi construído por Santos Junior *et al.* (2011), o sítio ativo   bastante conservado, quando comparado a outras pirofosforilases de outros organismos eucariontes, apenas as regiões compreendidas entre os resíduos 379-384 e 403-409 não apresentaram similaridade, destaque também para o bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Phe381 e Phe383, pois eles não existem no modelo construído (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2011).

Os resultados da triagem virtual conduzidas pelo Autodock Vina foram organizados em ordem crescente de energia de afinidade. O composto ZINC02140075 foi que apresentou o melhor resultado frente a todo o banco de dado testado, com valor de energia de -12,4 Kcal/mol. O segundo e o terceiro composto foram respectivamente ZINC02432855 e ZINC11868961 com a mesma energia de afinidade -12,2 Kcal/mol.

A Figura 1 representa o mapa 3D de intera es da molécula ZINC02140075 frente ao sítio ativo do modelo da UNAcP do fungo *M. perniciosus*. Há duas intera es do tipo cátion- π entre dois anéis aromáticos do composto e o aminoácido Lys408. Foi observada uma distância de 3,83  para o anel pentafluorbenzeno e 5,36  para o segundo anel aromático.   possível também verificar uma intera o de hidrog nio do tipo acceptora (LHA) entre o O1 do grupamento imidazolidina-2,4-diol do ligante e a Gln330 com uma distância de 3,12 . Embora as intera es citadas sejam notáveis, importante ressaltar que as intera es hidrofóbicas são as que mais acontecem, sendo responsáveis pelo ancoramento do ligante no sítio ativo da enzima. As intera es hidrofóbicas acontecem com os aminoácidos Met109, Ala110, Gly111, Gly112, Lys123, Asn224, Val302, Val303, Glu304, Asn328, Gly381,

Tyr382, Arg383, Leu384 e Lys408.

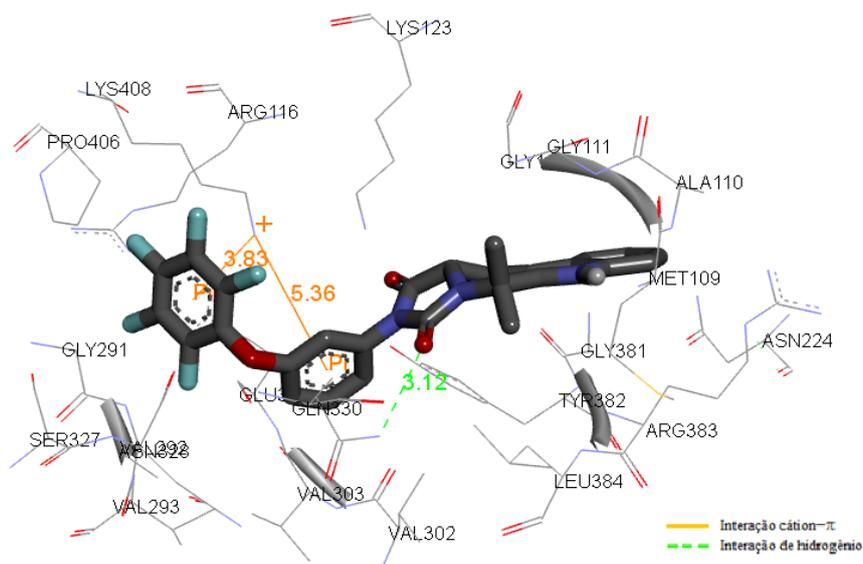


Figura 1 - Mapa de interações do composto ZINC02140075 frente ao sítio ativo da enzima pirofosforilase do fungo *M. perniciosus* em representação 3D.

Através do programa Discovery Studio 3.5 foram identificados os 10 aminoácidos que mais interagem com as 20 melhores moléculas por valor de energia de afinidade, que são visualizados na Tabela 1, além de sua respectiva frequência.

Tabela 1. Aminoácidos e a frequência de interações com os 20 melhores compostos.

Aminoácido	Frequência de interações
Gly112	21
Tyr382	21
Gln330	20
Lys123	20
Gly381	20
Lys408	19
Asn328	19
Glu304	19
Val303	19
Gly111	18

Comparando os resultados da Tabela 1 com a literatura percebe-se que os aminoácidos Gly111, Gly112, Glu304, Asn328, Lys408 são os mesmos descritos por Peneff (2001) o que demonstra que estes são importantes para o desenvolvimento de inibidores para a UNAcP.

Uma interação muito comum observada entre a enzima alvo e os compostos selecionados foi a interação do tipo cátion- π com os aminoácidos Lys123 e Lys408, que ocorreu com ambos aminoácidos com os compostos ZINC01792699, ZINC02102635, ZINC03846902 e ZINC11869425. Houve compostos em que a interação cátion- π só ocorreu com o aminoácido Lys123, sendo eles os compostos ZINC20113225, ZINC02106447, ZINC08764311, ZINC35406232, ZINC70680675 e ZINC70687417. Já o composto

ZINC02140075 apresentou apenas interação cátion- π com o aminoácido Lys408.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O virtual screening foi realizado frente ao sítio ativo do modelo 3D da UNACP do *M. pernicioso* utilizando o catálogo de produtos naturais depositados no Zinc¹², onde foi possível ordenar e selecionar os 20 melhores compostos que podem apresentar potencial interação com a enzima, baseado nos valores de energia de afinidade fornecidos pelo Autodock Vina, foi possível, também, estudar as interações intermoleculares dos compostos selecionados e a enzima-alvo. Sendo assim, foi possível identificar potenciais inibidores oriundos de fontes naturais como promissores frente à UNACP do *M. pernicioso*, desta forma, estes compostos serão selecionados para futuros estudos envolvendo a inibição *in vitro* da enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Importância econômica e evolução da cultura do cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002**. Embrapa Tabuleiros Costeiros: Aracaju, 2004.
- GRIFFITH, R.; TRACY, T. Antifungal drugs. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2002, p. 891-903.
- HERSCOVICS, A.; ORLEAN, P. Glycoprotein biosynthesis in yeast. **FASEB Journal**, n. 7, p. 540-550, 1993.
- IRWIN, J. J. *et al.* ZINC: a Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **J. Chem. Inf. Model**. 2012
- MASCARENHAS, G. Atual conjuntura socioeconômica e ambiental da Região Sul e agricultura sustentável como uma alternativa concreta. In: UZÊDA, M. C. *et al.* **O desafio da agricultura sustentável: alternativas viáveis para o Sul da Bahia**. Ilhéus-BA: Editus, p.13-32, 2004.
- MEINHARDT, L. W. *et al.* In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**, v. 52, p. 191-196, 2008.
- OLIVEIRA, M. A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma cacao*)**. 2005. 72f. Tese. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- PENEFF, C. *et al.* Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 20, n. 22, p. 6191-6202, 2001.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 537-594, 1996.
- SANTOS JUNIOR, M. C. *et al.* Purification, characterization and structural determination of UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylase produced by *Moniliophthora pernicioso*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 22, n. 6, p. 1015-1023, 2011.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDockVina: improvising the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**.n.31, p. 455-461, 2010.