

1.06.01 - Química / Química Orgânica

DOCKING MOLECULAR, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LARVICIDA DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN FRENTE AO *Aedes Aegypti*Paulo Ricardo dos S. Correia^{1*}, Ricardo Silva Porto², Dima J. da P. Lima³.

1. Mestrando em Química Orgânica e Medicinal pelo Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
2. Professor do Instituto de Química e Biotecnologia (UFAL) / Coorientador
3. Professor do Instituto de Química e Biotecnologia (UFAL) / Orientador

Resumo

O *Aedes aegypti* tem difundido as doenças Zika, Chikungunya e Dengue, com 554 mortes entre 2019 e 2021. Sabe-se que o vetor vem apresentando resistência aos inseticidas utilizados e esses vêm ocasionando toxicidade ao meio ambiente. Logo, objetivou-se identificar moléculas com ação larvicida mediante Docking Molecular frente à enzima Acetilcolinesterase e posterior síntese e avaliação biológica sobre larvas do vetor. Para o Docking, o software Gold foi utilizado, na síntese das moléculas empregou-se reagentes comerciais e para os testes larvicida utilizou-se dimetilssulfóxido no preparo das soluções. Para a análise estatística aplicou-se o método PROBIT. Os resultados apontaram rendimentos aceitáveis na síntese dos adutos, cuja ação larvicida foi confirmada, com bom grau de validação, validando os estudos iniciais de Docking. Assim, a metodologia computacional foi acurada, a síntese mostrou-se satisfatória e evidenciou-se a ação biológica dos adutos sobre as larvas de *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Docking; Síntese; *Aedes aegypti*.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Introdução

Segundo dados epidemiológicos do Brasil, cerca de 987.173 casos de DENV entre dezembro de 2019 e janeiro de 2021 foram confirmados, com 554 óbitos, destacando as regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste. Estima-se ainda cerca de 82.419 episódios de CHIKV, em que a maior proporção ocorreu em Sergipe, com uma taxa de incidência acima de 100 casos/100 mil habitantes. Em relação ao ZIKV, o estado da Bahia apresentou cerca de 47,9% dos casos de zika do país.¹

Deste modo, é indispensável ações que apontem para a redução populacional do vetor, sendo o meio químico o principal meio de controle, destacando-se os inseticidas Temefós e o Piriproxyfen. Contudo, o mosquito vem apresentando resistência a esses pesticidas e efeitos tóxico têm sido reportados em peixes e crustáceos.²

Ressalta-se que entre os alvos biológicos relacionados a diversos pesticidas, a alteração no funcionamento do sistema nervoso dos artrópodes, particularmente o *Aedes aegypti*, tem sido o meio de ação das principais classes de inseticidas para o controle desse vetor, como organoclorados e piretróides (inibindo os canais iônicos), organofosforados e carbamatos (inibindo a enzima acetilcolinesterase). Destaca-se que a acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel essencial na propagação de impulsos nervosos, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina. Logo, a sua inibição leva a uma superestimulação do sistema nervoso.⁵

Nesse contexto, a reação de Morita-Baylis-Hillman destaca-se no âmbito da Química Ambiental e Medicinal, fornecendo moléculas (adutos) com total economia de átomos, podendo ocorrer na ausência de solventes, em que os adutos apresentam múltiplas atividades biológicas, tais como anti-câncer, anti-protozoário e anti-fúngica.⁷

Assim, tendo em vista as inúmeras ações biológicas desta classe de compostos e considerando-se a indispensabilidade de um manejo efetivo no combate ao *Aedes aegypti*, este trabalho teve como objetivo identificar potenciais hits frente à AChE deste vetor por meio de estudos de Docking Molecular e posterior síntese e validação experimental por ensaios larvicida, calculando-se Concentração Letal para 50% de uma população (CL₅₀).

Metodologia

Docking Molecular

A fim de selecionar potenciais hits frente à enzima acetilcolinesterase do vetor, inicialmente foi realizado estudo *in silico* no âmbito da SBVS, a partir da técnica de Ancoragem Molecular, utilizando-se o software Gold/Hermes, com o screening de uma biblioteca virtual *in-house* de adutos de Morita-Baylis-Hillman.

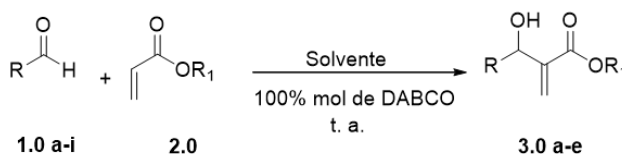
Para tanto, as moléculas foram desenhadas por meio do editor Discovery Studio e otimizadas pelo software Mercury 4.3.1, empregando-se o método semi-empírico PM7.⁶ A estrutura cristalográfica do alvo molecular selecionado foi obtida do Protein Data Bank, a qual foi submetida a processo re-docking, a fim de selecionar a função de energia que apresentasse um menor valor de Desvio de Raiz Quadrada Média, devendo ser menor que 2,00.

Por fim, procedeu-se a ancoragem das moléculas, gerando-se 10 conformações para cada um dos adutos, selecionando-se aquela com menor energia, cujas interações foram analisadas por meio do software Discovery Studio v.20.1.0.19295.

Síntese dos Ésteres Cinâmicos

Utilizou-se acrilato de etila e aldeídos comerciais na proporção 1:2, na presença de 100% de 1,4-diazobocíclico [2.2.2] octano (DABCO) como catalisador sob agitação magnética à temperatura ambiente (esquema 1). O avanço reacional foi feito por meio de Cromatografia em Camada Delgada. A extração foi realizada com acetato de etila (3 x 30mL), empregando-se Sulfato de Sódio anidro como agente secante. Assim, o produto foi purificado por Cromatografia em Coluna e caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C.

Esquema 1: Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman



Avaliação da atividade larvicida

As análises foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica Aplicada a Materiais e Compostos Bioativos da Universidade Federal de Alagoas. Os vetores foram mantidos a temperatura de 27 ± 2 °C e $80 \pm 4\%$ de umidade, em água isenta de cloro, por um fotoperíodo de 12h. As larvas foram alimentadas com ração para gato durante todo o seu desenvolvimento.

Os ensaios qualitativos foram realizados nas concentrações 100µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL. Para tanto, as soluções foram preparadas diluindo-se as amostras em 300µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 100mL de água destilada. Alíquotas de 20mL da solução teste foram transferidas para recipientes descartáveis de 50mL, adicionando-se, em seguida, 20 larvas.

O grau de mortalidade foi computado em 24 e 48h, tendo como controle positivo e negativo, respectivamente, o temefós (3µg/mL) e DMSO. Assim, a taxa de mortalidade seguiu os seguintes critérios: promissor para mortalidade superior a 75%; entre 50% e 75% parcialmente promissor; fracamente promissor entre 25% e 50% e inativo abaixo de 25%.⁸

Logo, para os ensaios considerados promissores, uma análise quantitativa foi abordada, computando-se a mortalidade das larvas após 48h, a fim de se verificar o valor da CL₅₀ e R-Quadrado mediante do método PROBIT, por meio software Graphpad Prism.

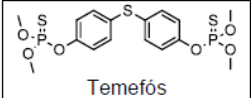
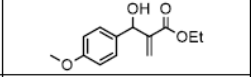
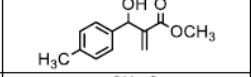
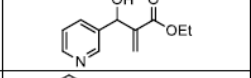
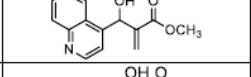
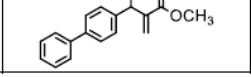
Resultados e Discussão

A enzima sob o código 6ARY foi selecionada para as análises computacionais, em que no processo de re-docking a função de energia CHEMPLP (Chemical Piecewise Linear Potential) mostrou-se a mais acurada entre as funções analisadas, apresentando um valor de RMSD de 0,087, ou seja, tal função apresentou a melhor predição de energia de interação entre enzima-ligante.

Logo, analisando-se os resultados de docking molecular (tabela 1), observou-se que o aduto 3e apresenta uma maior energia de interação (fitness score) com a enzima em relação ao composto de referência (temefós), o que está diretamente relacionado ao tipo e força das interações intermoleculares.

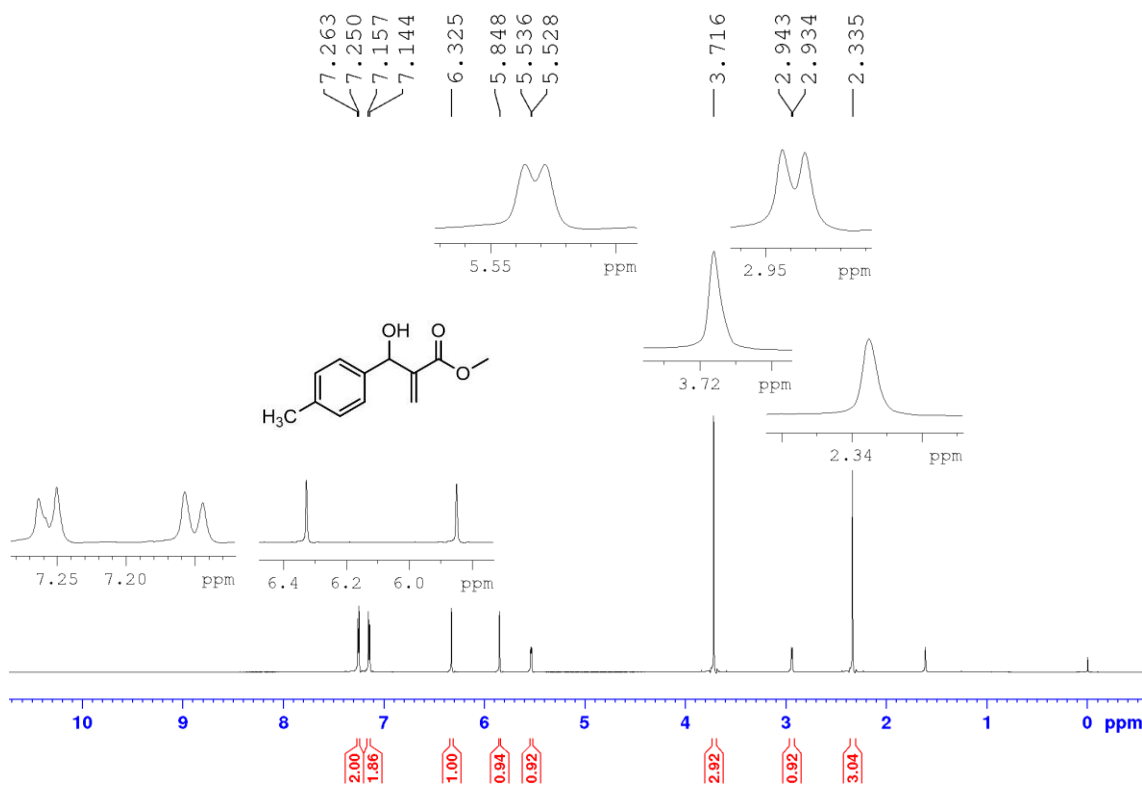
Em geral, observou-se que ligação de hidrogênio convencional foi a interação em maior proporção observada no screening da biblioteca *in-house*, seguida pela fraca interação incomum carbono-hidrogênio-oxigênio, que equivale à metade da energia de interação da primeira. Ou seja, aquela representa a mais forte das interações não-covalentes, o que justifica a maior afinidade entre a enzima e o composto 3e.

Tabela 1: Energias e interação intermoleculares não-covalentes para os complexos enzima-aduto.

Código	MOLÉCULA	FITNESS SCORE	INTERAÇÕES INTERMOLECULARES
	 Temefós	68,1375	CH ₃ -O ... H-OH (2,01 Å), HO-H ... O-P (1,78 Å), D233 (2,34 Å. C=O ... H-Csp ³), G442 (2,11 Å. C=O ... H-Csp ³), L444 (2,55 Å. C=O ... H-Csp ³).
3a		58,6680	G445 (2,32 Å. C=O ... H-Csp ³), E448 (2,02 Å. NH ... O=C), E448 (2,32 Å. C=O ... H-Csp ³).
3b		55,4829	G445 (2,22 Å. C=O ... H-Csp ³), E448 (2,10 Å. NH ... O=C), F490 (2,31 Å. OH ... O=C), Y493 (3,95 Å. CH ₃ - Ph).
3c		51,3427	S280 (2,10 Å. OH ... C=O), Y282 (3,01 Å. HO ... H-Csp ³), E359 (C=O ... H-C _{Ar}), H600 (2,24 Å. C=O ... H-C _{Ar}).
3d		63,5095	G445 (2,22 Å. C=O ... H-Csp ³), E448 (2,10 Å. NH ... O=C), F490 (2,31 Å. OH ... O=C), Y493 (3,95 Å. CH ₃ - Ph).
3e		71,9371	W245 (3,65 Å. CH ₃ - Ph), S280 (2,29 Å. OH ... OH), S283 (2,22 Å. OH ... OH), Y445 (2,26 Å. OH ... O=C)

Em relação à síntese dos adutos, a metodologia aplicada foi de moderada a satisfatória, tendo em vista os rendimentos dos cinco compostos sintetizados, cuja variação está diretamente relacionada à reatividade do acrilato e aldeído, sendo os aldeídos com as unidades piridina e quinolina os mais reativos (Tabela 2). Esses foram caracterizados por RMN de H¹ (Figura 1).

Figura 1: Espectro de H¹ do aduto 3b.



De acordo com os resultados dos bioensaios qualitativos larvicida (tabela 2), inferiu-se que as análises de docking foram validados experimentalmente, em que o composto 3e, aduto com maior potencial de interação com a enzima AChE, foi o único promissor. Ademais, correlacionando os valores de fitness score (tabela 1) com os resultados preliminares larvicida, observou-se uma convergência entre esses resultados.

Tabela 2: Resultado da síntese e do ensaio qualitativo da atividade larvicida.

COMPOSTO 3 (a-1)	R	R ₁	TEMPO REACIONAL (HORAS)	RENDIMENTO (%)	MORTALIDADE (%)			GRAU DE MORTALIDADE
					5 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	
a		OEt	80	81,00	0,00	0,00	8,33	Inativo
b		OCH ₃	720	95,00	0,00	0,00	3,33	Inativo
c		OEt	10	79,00	0,00	0,00	0,00	Inativo
d		OCH ₃	48	95,00	0,00	0,00	10,00	Inativo
e		OCH ₃	36	59,00	0,00	83,33	88,33	Promissor

Em vista disso, o aduto 3e foi submetido a avaliação larvicida quantitativa, cuja resultado foi analisado estatisticamente a fim de se obter o valor de CL₅₀ e o R², que foram equivalentes a 27,34 µg/mL e 0,9415, respectivamente.

Ressalta-se que a resistência a inseticidas é um problema global, que está relacionada à diversos fatores, tais como metabolização acelerada dos compostos pelo organismo dos insetos e a mutação de alvos enzimáticos. O temefós, inibidor covalente da AChE, vem apresentando baixa efetividade devido à ação de carboxilesterase e, principalmente, à mutação na AChE (G122S) próximo ao sítio catalítico (S³⁶⁰, H⁶⁰⁰, E⁴⁸⁶), causando impedimento estérico na região.⁴

Assim, segundo Engdahl e colaboradores (2015)⁵, interações não-covalentes se apresentam como uma alternativa frente a esta problemática, principalmente a respeito da seletividade em relação a vertebrados. Logo, tendo em vista os resultados computacionais e experimentais, o aduto 3e apresentou-se como um potencial hit frente à AChE, uma vez que, para esse e os demais adutos, observou-se interações de natureza não-covalente.

Conclusões

Com os resultados alcançados nesse estudo, evidenciou-se à ação larvicida dos adutos de Morita-Baylis-Hillman para o desenvolvimento de novos inseticidas seletivos, especialmente o composto 3e. Por outro lado, é possível melhorar tal potencial para os demais adutos por meio de alterações estruturais que favoreçam ligação de hidrogênio e interações pi-pi frente à AChE.

Referências bibliográficas

- BRASIL, Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf. Acessado em: 12/04/2021.
- DINIZ, M. M. C. S. L.; Henriques, A. D. da S.; Leandro, R. da S.; Aguiar, D. L.; Beserra, E. B. Resistencia de *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. **Revista Saúde Pública**, n° 5, p. 775-782, 2014.
- ENGDAHL, C., Knutsson, S., Fredriksson, S. Å., Linusson, A., Bucht, G., Ekström, F. Acetylcholinesterases from the Disease Vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*: Functional Characterization and Comparisons with Vertebrate Orthologues. **PLoS One**. 2015 Oct 8;10(10): e0138598.
- GALEN J. Correy, Zaidman, D., Harmelin, A., Silvia C., P., Mabbitt, D., Calaora, P., V., James, A. J., Kotze, C. C., Jackson, N. L. J. Overcoming insecticide resistance through computational inhibitor design. **Proceedings of the National Academy of Sciences** Oct 2019, 116 (42) 21012-21021.
- KNUTSSON, S., Engdahl, C., Kumari, R., Forsgren, N., Lindgren, C., Kindahl, T., Kitur, S., Wachira, L., Kamau, L., Ekström, F., Linusson, A. Noncovalent Inhibitors of Mosquito Acetylcholinesterase 1 with Resistance-Breaking Potency. **J Med Chem**. 2018 Dec 13;61(23):10545-10557.
- MACRAE, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodriguez-Monge, L., Taylor, R., van de Streek, J., & Wood, **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics** 17 P. A. (2008). Mercury CSD 2.0—new features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*, 41(2), 466–470
- OLIVEIRA, J. P. G. et al. Morita-Baylis-Hillman Reaction with 7-Chloroquinoline Derivatives-New Compounds with Potential Anticancer Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 347-354, Feb. 2021. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532021000200347&lng=en&nrm=iso>. access on 12 Apr. 2021. Epub Feb 01, 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP, 2005. Disponível em: Acessado em: 11/04/2019.