



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
LICENCIATURA EM QUÍMICA

**TRIAGEM *IN SILICO* DE METABÓLICOS SECUNDÁRIOS DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *SPONDIAS* EM BUSCA DE INIBIDORES DA MONOAMINA OXIDASE
(MAO)**

Mônica Alves de Medeiros

Serra Talhada, PE

Abril de 2023

MÔNICA ALVES DE MEDEIROS

**TRIAGEM *IN SILICO* DE METABÓLICOS SECUNDÁRIOS DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *SPONDIAS* EM BUSCA DE INIBIDORES DA MONOAMINA OXIDASE
(MAO)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Licenciatura em Química, na modalidade Artigo Científico, como pré-requisito para a obtenção do título de Licenciada em Química, pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elayne Bessa Ferreira Pinheiro.

Serra Talhada, PE

Abril de 2023

RESUMO

A depressão é um transtorno psicológico multicausal que pode aparecer em qualquer pessoa, causando uma gama de emoções e efeitos incapacitantes sendo, atualmente, a principal causa de inabilidade em todo o mundo e está situada em quarto lugar entre as dez principais causas de carga patológica mundial. Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo identificar potenciais inibidores para a Monoamina oxidase A (MAO-A) que possam contribuir no tratamento da depressão, a partir de compostos identificados e/ou isolados de espécies do gênero *Spondias*, utilizando como método o docking molecular, visto que possibilita prever o modo de ligação e afinidade de interação de um composto quando interage com o sítio de ligação de uma proteína. Sendo assim, no processo de docagem várias simulações entre os 104 metabólicos secundários que foram identificados ou isolados do gênero *Spondias* e o sítio ativo do receptor foram realizadas. Os resultados demonstraram que dos 104 complexos como possíveis inibidores, mais da metade - um total de 78 complexos - demonstrou interações com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima e obtiveram pontuações scores superiores a 56,68 Kcal/mol, o que significa uma elevada interação, afinidade e especificidade entre os complexos proteína-ligante. Por fim, os metabólitos secundários pertencentes às espécies do gênero *Spondias* demonstram ser promissores candidatos a fármacos que podem vir a contribuir no tratamento da depressão como inibidores da MAO-A.

Palavras-chave: Depressão; Monoamina oxidase A (MAO-A); Docking molecular; Gênero *Spondias*.

ABSTRACT

Depression is a multicausal psychological disorder that can appear in anyone, causing a range of emotions and disabling effects and is currently the leading cause of disability worldwide and ranks fourth among the ten leading causes of pathological burden worldwide. Therefore, this work aims to identify potential inhibitors for Monoamine oxidase A (MAO-A) that may contribute to the treatment of depression from compounds identified and/or isolated from species of the genus *Spondias*. Having molecular docking as a method that makes it possible to predict the binding mode and the interaction inheritance of a compound when it interacts with the binding site of a protein. Thus, in the docking process, several simulations were performed between the 104 secondary metabolites that were identified or isolated from the *Spondias* genus and the active site of the receptor. The results indicated that 78 complexes demonstrated interactions with the amino acid residues present in the active site of the enzyme and obtained scores greater than 56.68 Kcal/mol, which means a high interaction, affinity and specificity between protein-ligand complexes. Finally, secondary metabolites belonging to species of the genus *Spondias* proved to be promising candidates for drugs that may contribute to the treatment of depression as MAO-A inhibitors.

Keywords: Depression; Monoamine oxidase A (MAO-A); Molecular docking; Genus *Spondias*.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins medicinais é uma das práticas mais antigas da humanidade para o tratamento de diversas enfermidades (VEIGA & MACIEL, 2005). Estas práticas contribuem significativamente para divulgar novas substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e maior potencialidade terapêutica dos vegetais, sendo descritas com frequência na literatura. Ainda assim, grande parte das plantas utilizadas popularmente não tem seus metabólitos secundários conhecidos (MACIEL et al., 2002).

Os metabólitos secundários identificados e/ou isolados de plantas se referem a classes de compostos produzidos por diferentes vias biossintéticas, cuja variabilidade quantitativa e qualitativa é suscetível a influências e potenciais predadores naturais. A produção desses compostos pode sofrer modificações de acordo com a interação de processos fisiológicos, ecológicos e bioquímicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; PAVARINIA et al., 2012).

Desse modo, são as diversas atividades biológicas dos metabólitos secundários presentes nas plantas que contribuem, há séculos, como recursos terapêuticos na medicina popular, agindo na prevenção, cura e tratamento de diversas enfermidades (BRAIBANTE et al., 2014; FUMAGALI et al., 2008).

Nesse contexto, constata-se que os componentes químicos produzidos pelas plantas, que lhes conferem atividade terapêutica, são chamados de princípio ativo. Essas substâncias apresentam uma diversidade de estruturas moleculares com inúmeros grupos funcionais nas suas cadeias carbônicas, sendo organizados em diferentes classes de acordo com as semelhanças químicas (FUMAGALI et al., 2008). Por essa razão, tem aumentado cada vez mais os estudos voltados à utilização de metabólitos secundários para fins farmacológicos, tais como: inibidores de glicose no sangue, agentes anticancerígenos, recursos terapêuticos antioxidantes e anti-inflamatórios, atividades antimicrobianas entre outras finalidades (PEREIRA & CARDOSO, 2012; SPECIAN et al., 2014).

Na contemporaneidade há um maior conhecimento de uma diversidade de ferramentas que a ciência utiliza para estudar os efeitos de diversas substâncias no organismo, bem como para viabilizar a obtenção de novos compostos a partir de protótipos moleculares (ARROIO et al., 2010). Assim, os recursos computacionais

surgem como uma possibilidade de fazer experimentos *in silico*, reproduzindo o ambiente biológico.

Partindo dessa perspectiva, entre os métodos *in silico* mais utilizados está o docking molecular, que utiliza dados teóricos para a ancoragem entre uma proteína e um ligante, com o objetivo de estudar as suas interações pelos métodos da relação estrutura-atividade, ou seja, o complexo molecular formado permite a compreensão entre o ligante e a proteína, suas especificidades como complexo e interações energéticas, além de considerar características de afinidade eletrônica e interações intermoleculares (LYNE, 2002). Dessa forma, esse processo seleciona possíveis inibidores através de certos critérios de seleção que, posteriormente, podem ser testados *in vitro* e *in vivo* (LASKOWIKI et al., 2005).

A cada dia surgem mais pesquisas direcionadas à descoberta de novos protótipos a fármacos, que pode ser realizada por meio da construção de uma nova espécie que atue em um alvo específico já conhecido, mas também usando moléculas existentes que possam atuar em um alvo ainda não conhecido (LYNE, 2002). Esse estudo, por sua vez, evidenciou e estudou os metabólicos secundários que foram identificados e/ou isolados do gênero *Spondias* como inibidores da Monoamina oxidase (MAO).

O gênero *Spondias* (pertencente à família Anacardiaceae) compreende entre 14 a 21 espécies que estão distribuídas mundialmente. Todavia, no Brasil as espécies que se destacam desse gênero são a cajazeira (*S. mombin*), o umbuzeiro (*S. Tuberosa Arruda*), a seriguela (*S. purpurea*), cajá-umbu (*S. mombin* x *S. tuberosa*) e cajarana ou cajá-manga (*S. dulcis*). Essas espécies são exploradas por sua importância econômica e também pelas propriedades farmacêuticas (CHRISTENHUSZ & BYNG, 2016; SILVA et al., 2014). Na literatura, por exemplo, encontram-se estudos que evidenciam a utilização das espécies pertencentes ao gênero *Spondias* no uso popular. Como exemplo, espécies do gênero *Spondias* são utilizadas para o tratamento de desordens infecciosas (gripe, infecções de pele, as hepatites virais tipo B e C, doenças respiratórias e entre outras) em diferentes regiões do mundo na medicina tradicional (SILVA et al., 2014).

Por sua vez, a monoamina oxidase (MAO) é um grupo de isoenzimas encontrado na membrana externa das mitocôndrias, principalmente em células

nervosas, gliais e outras células (JIA & ZHU, 2010). A monoamina oxidase possui duas isoformas, a MAO-A e a MAO-B, diferindo apenas no substrato, na sensibilidade a inibidores e na sequência de aminoácidos. A inibição da MAO-A, foco deste trabalho, é utilizada como estratégia no tratamento da depressão, pois estudos vêm comprovando que a MAO-A está intimamente relacionada a esse distúrbio, tanto pela especificidade do substrato quanto pelo aumento dos níveis enzimáticos. A depressão é um transtorno psicológico multicausal que pode aparecer em qualquer pessoa, independentemente de idade, gênero, etnia ou nível socioeconômico, causando uma gama de emoções e efeitos incapacitantes (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 2008; SHIH & THOMPSON, 1999; WILLNER et al., 2013).

Por outro lado, a inibição da MAO-B está sendo estudada devido à sua associação com a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer, visto que estudos evidenciam que essa enzima também apresenta alteração da sua atividade nessas patologias. O Alzheimer é uma patologia neurológica que leva à perda progressiva da memória, causando déficit das habilidades cognitivas, e, quando não tratado, pode evoluir para demência, apresentando maior incidência em idosos (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006).

Ademais, a predição de inibidores seletivos para a MAO-A e MAO-B através da química computacional permite encontrar novos candidatos a fármacos com alta afinidade e especificidade para o sítio alvo, bem como com maior atividade intrínseca, que pode potencializar o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e seletivos, a fim de minimizar os efeitos da hiperatividade dessas enzimas no processo patológico (SHIH & THOMPSON, 1999; VERDONK et al., 2003).

Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo identificar potenciais inibidores para a Monoamina oxidase (MAO), especificamente a MAO-A, para o tratamento da depressão, a partir de compostos identificados e/ou isolados de espécies do gênero *Spondias*, tendo como base a análise dos resultados dos cálculos de docking molecular entre a enzima MAO-A e os compostos pesquisados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Seleção do banco de moléculas

Para a seleção do banco de moléculas um levantamento bibliográfico foi realizado, utilizando as bases de dados Science Direct e PubMed como ferramentas de pesquisa. Os termos pesquisados foram “Spondias and isolations” ou “Spondias and isolated”, com a finalidade de construir um banco de dados com os metabólitos secundários que já haviam sido identificados e/ou isolados de extratos fixos das espécies do gênero *Spondias*. Com isso, foi possível especificar a espécie, os compostos e a parte da planta que o composto foi identificado e/ou isolado. Assim, 104 moléculas foram encontradas, de um total de vinte uma (21) espécies. Posteriormente, o desenho racional das 104 moléculas foi realizado utilizando o software *ACD/ChemSketch*, (versão 2016.2.2), que possibilitou observar a estrutura de cada uma das moléculas nos formatos bi e tridimensional, a fim de melhor entender a estrutura molecular dos compostos.

2.2. Preparo dos ligantes

Seguindo a metodologia proposta por Okada-Júnior et al. (2018), uma das primeiras etapas de uma triagem virtual é a verificação do estado de protonação da molécula e o pH em que o alvo (receptor) trabalha. Sendo assim, uma revisão bibliográfica acerca do pH em que a Monoamina oxidase (MAO), especificamente a MAO-A, trabalha foi realizada. A partir disso, foi identificado que MAO-A atua no pH fisiológico (7,4), geralmente utilizado para enzimas/proteínas – exceto em alguns casos, nos quais enzimas/proteínas trabalham em meios mais ácidos ou mais alcalinos. Após a constatação da faixa de pH que a MAO-A atua, o programa de desenho molecular Marvin Sketch 5.0.9 foi usado para a verificação do estado de protonação das moléculas (ligantes).

Em seguida, o software freeware Avogadro® (versão:1.2.0, library versão:1.2.0, Open Babel versão:2.3.90, Qt versão: 4.8.6) foi utilizado, configurado para realizar cálculos de campo de força clássico Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94), com o intuito de obter a conformação de menor energia.

2.3. Protocolo de Docking Molecular

Os cálculos de docking molecular entre os ligantes e o alvo (receptor) foram efetuados no software Gold Suite 5.1 (Genetic Optimization for Ligand Docking 5.1) (CCDC Software Limited). Para a realização desse estudo, a estrutura cristalográfica da Monoamina oxidase A (PDB: **2BXR**) foi utilizada, sendo previamente retirada do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Além disso, as estruturas otimizadas dos ligantes também foram utilizadas.

A Monoamina oxidase A estava complexada com a Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) e estava com o dímero (domínio A e domínio B). Dessa forma, a MAO-A foi tratada removendo inibidores cristalizados, moléculas de água e outras moléculas coordenadas. Além disso, átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura da enzima MAO-A para as simulações de docking.

2.4. Análise dos resultados

O software GOLD (Genet Optimisation for Ligand Docking), que funciona como um algoritmo genético, realiza cálculos de docking, permitindo a flexibilização dos ligantes e trabalha com a otimização de uma função fitness pré-definida – o GoldScore – que compreende quatro componentes, sendo eles: a energia de ligação de hidrogênio do complexo receptor-ligante, a energia de ligação de Van der Waals, a energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante e a energia de Van der Waals interna do ligante (JONES et al., 1995, 1997). Os componentes que compreendem ao GoldScore estão expressos na equação 1.

$$\text{GoldScore} = S_{\text{hb_ext}} + 1,375 S_{\text{vdw_ext}} + S_{\text{hb_int}} + S_{\text{vdw_int}}$$

Equação 1. Componentes que compreendem o GoldScore.

De acordo com a equação, o $S_{\text{hb_ext}}$ é o score da energia das ligações de hidrogênio proteína-ligante, $S_{\text{vdw_ext}}$ é o score das energias de Van der Waals proteína-ligante, $S_{\text{hb_int}}$ é a contribuição para o score devido à ligações de hidrogênio intramoleculares do ligante, e $S_{\text{vdw_int}}$ é a contribuição devido à tensão intramolecular do ligante. Contudo, cabe ressaltar que o termo $S_{\text{vdw_ext}}$ é expresso como uma forma de correção empírica para possibilitar/facilitar os contatos hidrofóbicos entre

proteína e ligante, e, por essa razão, é multiplicado pelo fator 1,375 quando a pontuação total é computada (JONES et al., 1995, 1997).

Sendo assim, o programa realiza uma seleção interna dos resultados do docking com base na função fitness e no escore escolhido (GoldScore). Os cálculos de docking foram planejados para obter 10 saídas em cada etapa do cálculo. Ademais, foi utilizado o software Discovery Studio Visualizer para análise das interações previstas com os aminoácidos do sítio ativo do complexo proteína-ligante.

2.5. Validação dos Protocolos de Docking por Re-docking

Em uma triagem virtual de docking molecular, o programa gera posições possíveis para o ligante – chamadas de poses – e avalia a energia de cada posição, a partir de uma função de pontuação. Após as poses serem geradas, foram comparadas com a posição cristalográfica do ligante que estava cristalizado junto à sua proteína e foi retirado para a realização de outras docagens. Esta comparação gera um Desvio Médio Quadrático (RMSD), com valor esperado $< 2\text{Å}$. Os valores inferiores a 2Å indicam que o ligante conseguiu reproduzir a pose esperada ou que se aproximou dela a partir do protocolo empregado (MARTÍNES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2021).

Dessa forma, na validação por re-docking, o processo de docking molecular foi realizado com o próprio ligante da estrutura cristalina de um complexo ligante-proteína, a fim de tentar reproduzir o modelo de ligação original, utilizando os valores de Desvio Médio Quadrático (RMSD) que foram consultados no GOLD.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Monoamina oxidase A (MAO-A) é encontrada complexada com a Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) com o dímero (domínio A e domínio B), ambos cofatores que controlam o funcionamento da enzima e são nomeados como A FAD600 e B FAD600. O docking com o cofator (B FAD600) para o banco de dados dos compostos identificados e/ou isolados das espécies do gênero *Spondias* apresentou bons resultados, visto que em sua maioria, os compostos obtiveram pontuações de score superior a 56,68 Kcal/mol, indicando a qualidade da interação

entre a molécula ligante e a proteína alvo. Esse resultado indica que quanto maior o valor do fitness, maior a interação entre o alvo e o ligante, formando um complexo mais estável, o que indica que a molécula ligante é mais eficaz no encaixe do sítio ativo da enzima. Em outras palavras, a energia do cálculo de interação da função score possibilita eleger as poses de ligação teoricamente mais próximas da pose da ligação “real” (VERDONK et al.; 2003). Os ligantes que obtiveram os melhores scores de pontuação na formação de complexos com a MAO-A estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados do docking molecular dos ligantes que obtiveram os melhores scores de pontuação na formação de complexos com a MAO-A.

Complexos	Score (Kcal/ mol)
Beta-Caroteno-15,15'-epóxido	98,08
Rutina	97,17
Trigaloil glicose	96,80
Éster butílico do ácido clorogênico	93,43
Zeaxantina	92,10
Fitoflueno	84,32
Astaxantina	80,09
β-caroteno	76,76
Ácido clorogênico	75,70
7,7', 8,8'-Tetrahydro-beta, beta-caroteno	74,59

Fonte: Autores (2023).

Para garantir mais precisão no docking foi inserida a função re-rank score que possibilitou identificar as soluções de docking mais promissoras, a partir dos algoritmos estabelecidos pelo docking (THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006). De acordo com o re-rank score, as três melhores poses do docking foram para o Beta-Caroteno-15,15'-epóxido, rutina e Trigaloil Glicose, respectivamente, os complexos com melhores poses do docking pertencem as espécies *Spondias mombin L*, *Spondias tuberosa* e *Spondias lutea*, respectivamente.

Segundo Arrúa (2020), uma função de score pode ser considerada eficiente quando funciona bem em três aplicações (modo de ligação, afinidade de ligação e

triagem virtual). Assim, os compostos descritos neste estudo obtiveram bons resultados de pontuação de score, uma vez que o método de docking molecular utilizado trabalha com a otimização da função fitness pré-definida – o GoldScore, que apresenta funcionalidade nas três aplicações, permitindo uma análise completa das interações proteína-ligante, a fim de encontrar as melhores interações entre o alvo e o ligante, além de formar um complexo estável (VERDONK et al.; 2003).

O software utilizado para realização do docking permitiu, como já mencionado, inserir novas funções, tais como o re-rank score, que possibilitou identificar as soluções de docking mais promissoras, através dos algoritmos estabelecidos pelo docking. Dessa forma, em vez de utilizar dois algoritmos distintos, como feito por Brito (2007), um único software foi capaz de prever com precisão as pontuações de scores dos compostos que obtiveram maior interação proteína-ligante, considerando os graus de liberdade dos grupos laterais dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo durante a realização do procedimento de docking (MORRIS et al.; 1998; THOMSEN & CHRISTENSEN, 2006).

3.1 Análise das interações com os aminoácidos do sítio ativo do complexo proteína-ligante

As interações que ocorrem entre uma proteína e um determinado ligante resulta na formação de um complexo proteína-ligante, caso o ligante apresente afinidade e especificidade de ligação com a proteína. Com isso, a presença de interações intermoleculares, tais como: interações hidrofóbicas, π - π , forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações iônicas ou eletrostáticas são responsáveis por indicar a afinidade e especificidade entre o receptor, nesse caso a MAO-A e os ligantes (GURYANOV et al., 2016).

Após uma pesquisa na literatura e a partir do software Discovery Studio Visualizer foi possível perceber que a estrutura cristalográfica da MAO-A apresenta 20 resíduos de aminoácidos que estão presentes no sítio ativo dessa enzima (TYR69, GLN74, VAL91, LEU97, ILE180, ASN181, ILE207, PHE208, VAL210, GLU216, CYS323, ILE325, ILE335, LEU337, MET350, PHE352, TYR407 e TYR444). Os resíduos presentes no sítio ativo da Monoamina oxidase são

importantes fatores para explicar a seletividade de inibidores e substratos (MILCZEK et al., 2011; WOUTERS, 1998).

Nesse contexto, dos 104 complexos como possíveis inibidores da MAO-A, 78 apresentaram interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima. Sendo assim, foram selecionadas, utilizando o software Gold, as soluções de maior score de pontuação de cada complexo (Tabela 1) e, posteriormente, foram analisadas as interações com os aminoácidos do complexo proteína-ligante, utilizando o software Discovery Studio Visualizer, a fim de analisar a afinidade e especificidade dos complexos. Em seguida, após realizar as análises das interações, os compostos foram organizados em grupos de acordo com as semelhanças químicas.

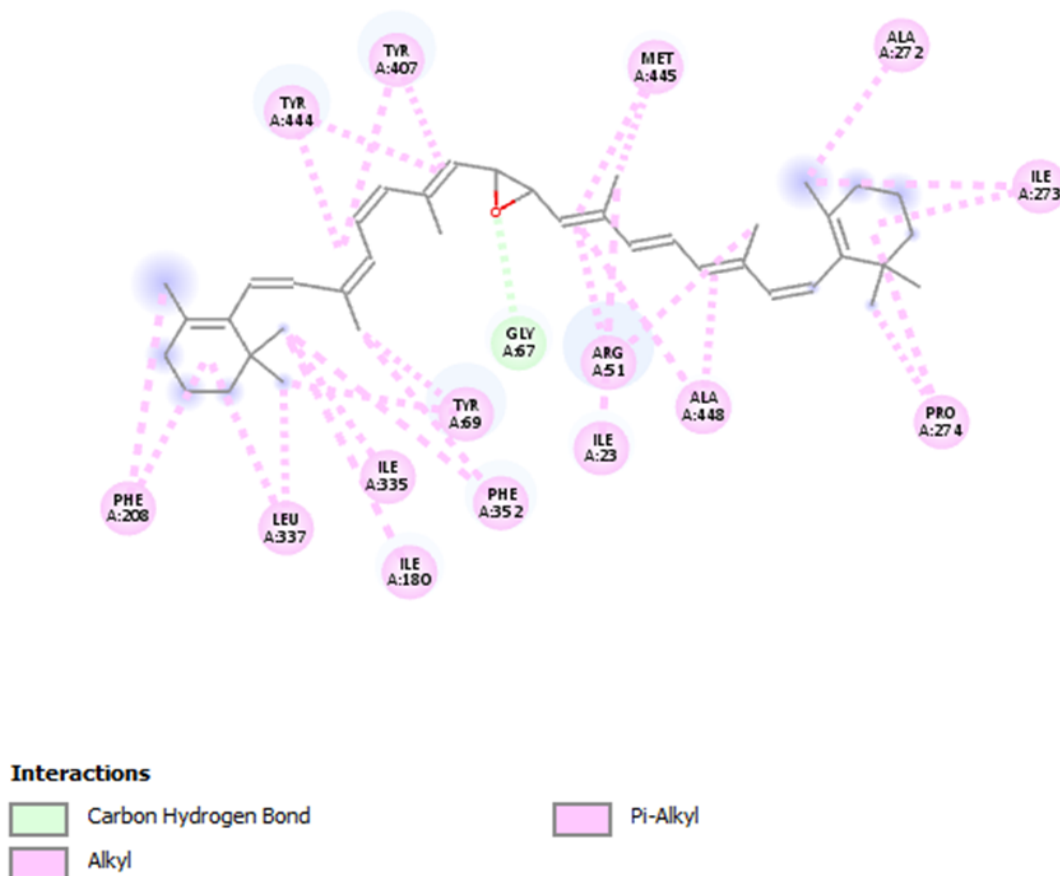
3.1.1 Resultados do grupo 1

Neste grupo, se encontram os compostos que obtiveram uma quantidade semelhante de aminoácidos interagindo com aminoácidos do sítio ativo da enzima e, também, que apresentaram o maior número de interações antagonistas, π - π -T-Shaped e a presença do único complexo que possui uma interação π -cátion que, dentre algumas de suas funções, a catálise enzimática pode ser destacada. Isso significa que esse ligante pode possibilitar que a enzima atue como um catalisador biológico, de modo a aumentar a velocidade das reações do organismo. Esse fator pode ser um ponto positivo, visto que pode promover um aumento mais rápido na concentração de neurotransmissores na fenda sináptica, e, conseqüentemente, pode vir a aumentar o nível de serotonina e noradrenalina, desencadeando uma atividade mais rápida como antidepressivo.

Assim, a partir das análises foi possível verificar que o complexo com o ligante Beta-Caroteno-15,15'-epóxido (Figura 1) apresentou o maior score e interagiu com oito aminoácidos (LEU337, ILE180, PHE208, ILE335, PHE352, TYR69, TYR444, TYR407). Dessas interações que ocorreram, seis são interações π -Alkyl (PHE208, LEU337, ILE180, PHE352, TYR69, ILE335) e duas são do tipo Alkyl (TYR444, TYR407). Essas interações possibilitam a formação de ligações hidrofóbicas, visto que nas ligações do tipo π -Alkyl há interação da nuvem de elétrons sobre um grupo aromático e um grupo de elétrons qualquer do grupo Alkyl. Além disso, interações do tipo Alkyl também acontecem entre grupos alquil e

consequentemente também geram interações hidrofóbicas (ALENCAR et al.; 2022).

Figura 1. MAO-A interagindo com: Beta-Caroteno-15,15'-epóxido.

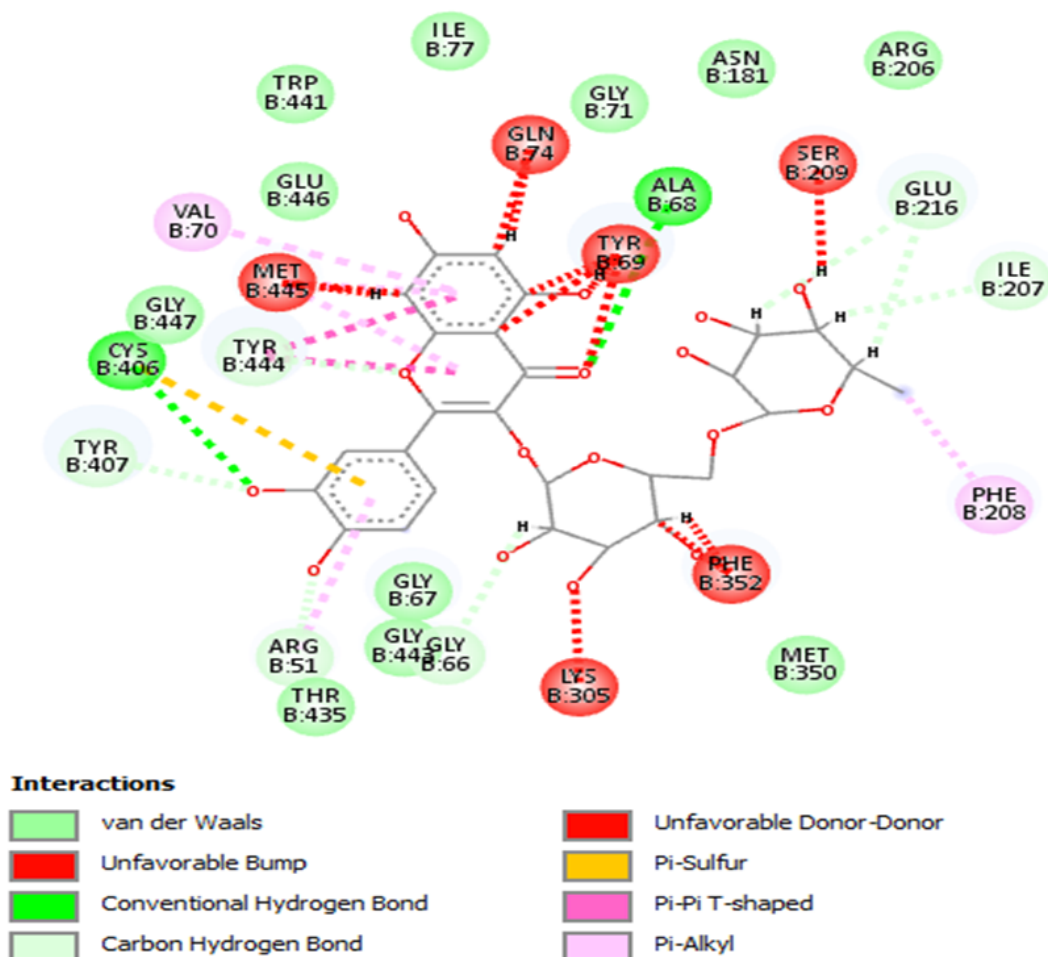


Fonte: Autores (2023).

A interação com a rutina (Figura 2), obteve oito interações com os aminoácidos (TYR69, TRY407, TYR444, GLU216, ILE207, PHE208, PHE352, GLN74), das quais quatro foram interações de Van der Waals (TYR444, TYR407, GLU216, ILE217). Particularmente, o TYR444 também faz uma interação do tipo π - π -T-Shaped, sendo uma interação entre dois anéis aromáticos, ou seja, a interação π - π -T-Shaped ocorre com a interação da nuvem de elétron lateral de 1 anel e na nuvem de elétron de outro anel. Ademais, essa interação ocorre em forma de T (ALENCAR et al.; 2022). Além disso, apresentou uma interação que ocorre por π -Alkyl com o aminoácido (PHE208) e três interações antagonistas com os aminoácidos (TYR69, GLN74, PHE352) que indicam a repulsão entre os resíduos de aminoácidos com as ligações que estão, ao mesmo tempo, interagindo

e se afastando entre o ligante e o sítio ativo (FILHO et al.; 2020).

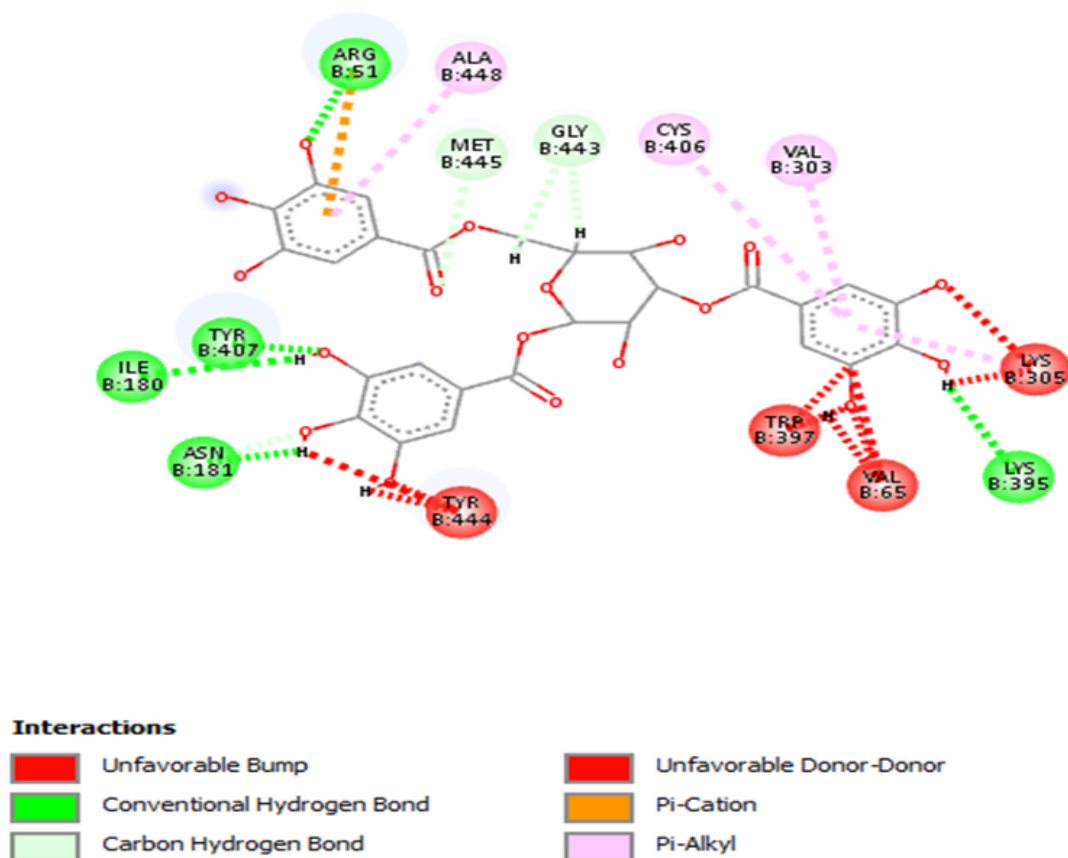
Figura 2. MAO-A interagindo com: Rutina.



Fonte: Autores (2023).

A figura 3, por sua vez, mostra as interações da trigaloil glicose, nas quais é possível perceber a presença de uma interação π -cátion que é de suma importância no reconhecimento molecular e catálise enzimática (ALENCAR et al.; 2022). Além disso, também apresenta interações com os aminoácidos (ILE180, ASN181, TRY407) que participam da formação de diferentes ligações químicas, entre elas: ligações convencionais de hidrogênio e ligações não convencionais de hidrogênio, bem como a presença de uma interação antagonista com o aminoácido TYR444.

Figura 3. MAO-A interagindo com: Trigaloil glicose.



Fonte: Autores (2023).

Com relação às interações que ocorrem por ligações de hidrogênio referentes ao docking entre os inibidores e a MAO-A, constatou-se que dos 78 complexos que apresentaram interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, 30 complexos apresentaram interações por ligações de hidrogênio, que são importantes interações que ocorrem em sistemas biológicos e são responsáveis por manter a estrutura da proteína (BARREIRO & FRAGA, 2015). Além disso, 48 complexos apresentaram interações dos tipos π -Alkyl, Alkyl, π -Sulfur e π - π -T-Shaped.

Contudo, a presença ou ausência de interações dos aminoácidos por ligações de hidrogênio com os complexos proteína-ligante, deve-se em razão que essas interações só são possíveis, em sua maioria, se os inibidores apresentarem grupamentos hidroxilas, ou, em determinados casos, ocorrem também devido à presença de moléculas de nitrogênio e flúor, por estarem presentes nos compostos

como inibidores da MAO-A, que interagem com átomos de hidrogênio dos aminoácidos.

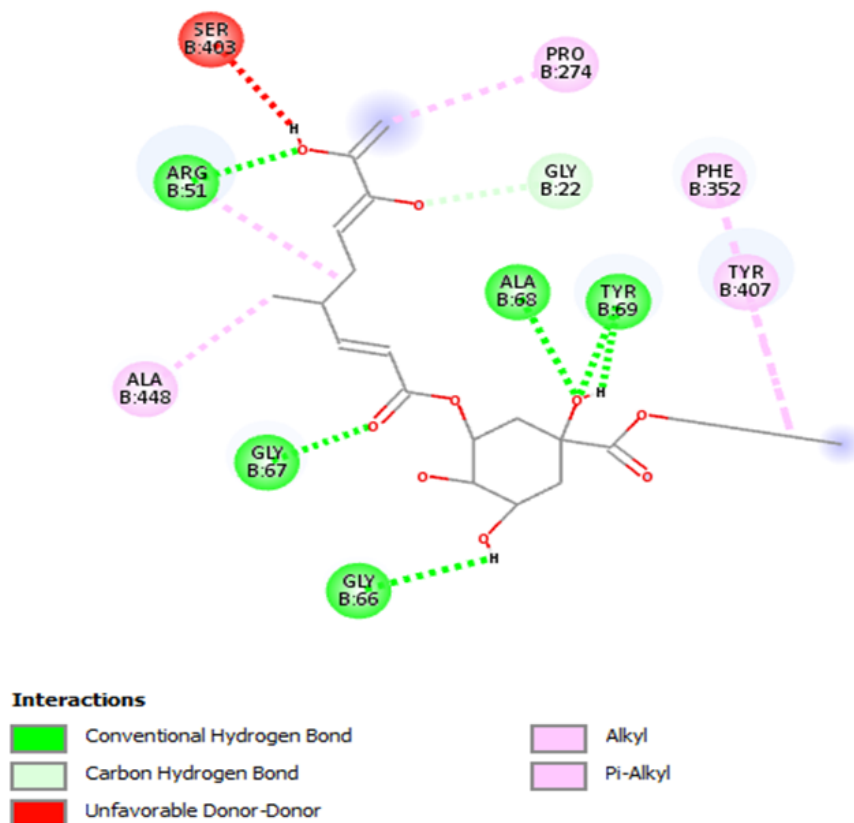
Por sua vez, quando as interações ocorrem em nível atômico entre o ligante e a proteína são os elétrons que estão presentes na formação de ligações não covalentes ou covalentes. Sendo assim, as interações dos tipos π -Alkyl, Alkyl e π -Sulfur presentes nos complexos com os aminoácidos da MAO-A pertencem a ampla categoria de interações não covalentes. Como já mencionado, as interações π -Alkyl possuem a interação da nuvem de elétrons e um grupo de elétrons de qualquer grupo alquil sobre um grupo aromático. Já nas interações π -Sulfur, há uma nuvem de elétrons π do anel aromático que interage com os dois pares solitário da nuvem de elétrons do átomo de enxofre e as interações do tipo Alkyl, por sua vez, acontecem como já mencionado entre grupos alquil (ALENCAR et al.; 2022). Entre os complexos apresentados, é possível perceber que prevalecem interações do tipo Alkyl e π -Alkyl.

3.1.2 Resultados do grupo 2

Nesse grupo, se encontram os compostos que apresentaram em sua maioria ligações do tipo π -Alkyl e Alkyl que favorecem a formação de ligações hidrofóbicas que ocorrem em função da presença de cadeias ou subunidades apolares que estão solvatadas por camadas de moléculas de água. Assim, aproximação entre si dessas superfícies hidrofóbicas promove o colapso da estrutura organizada das moléculas de água, favorecendo a interação ligante-receptor à custo do ganho entrópico associado à desorganização do sistema (BARREIRO & FRAGA, 2008; VOET; VOET; PRATT, 2014).

No caso do éster butílico do ácido clorogênico, figura 4, uma ligação convencional de hidrogênio com o aminoácido (TYR69), uma interação Alkyl com o aminoácido (PHE352) e outra do tipo π -Alkyl com o aminoácido são observadas (TYR407).

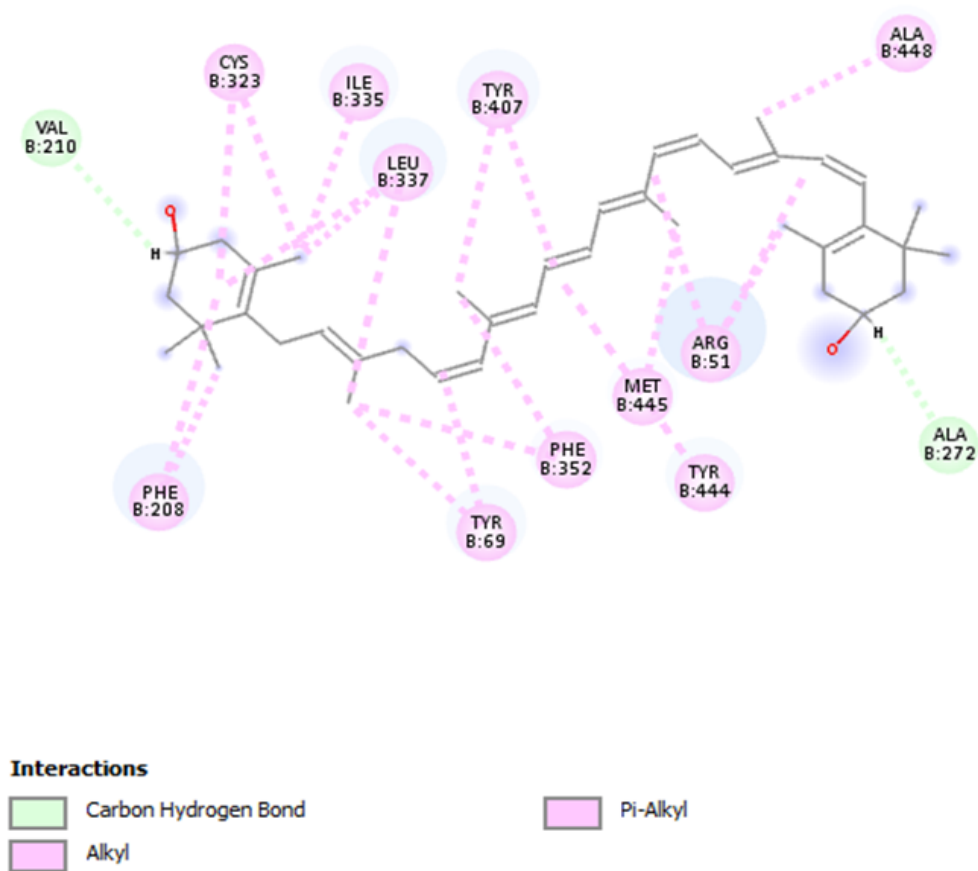
Figura 4. MAO-A interagindo com: Éster butílico do Ácido clorogênico.



Fonte: Autores (2023).

A zeaxantina, figura 5, apresentou interações hidrogênio-carbono (VAL210), ligações de π -Alkyl e Alkyl, ambas realizaram as mesmas interações com oito aminoácidos (TYR407, PHE208, TYR69, PHE352, TYR444, ILE335, LEU337 e CYS323).

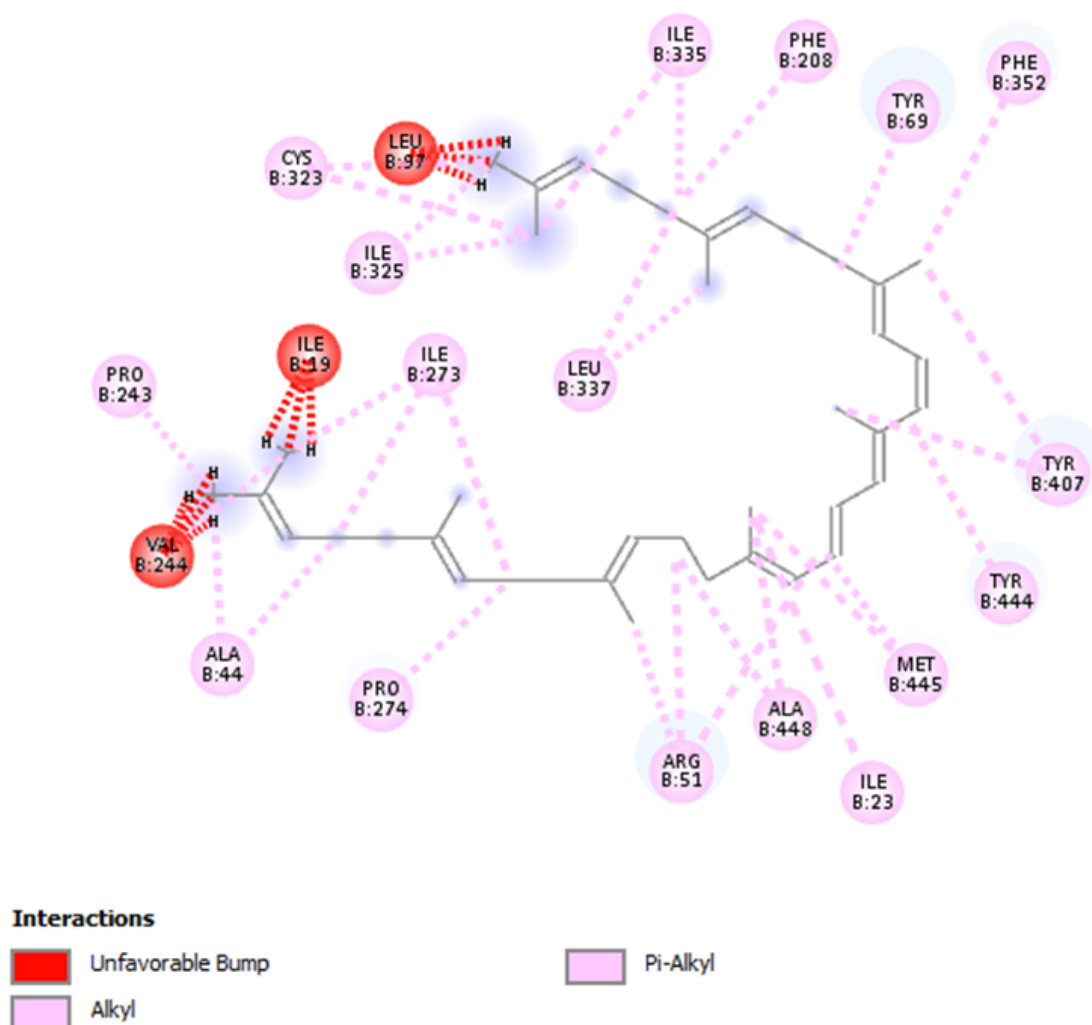
Figura 5. MAO-A interagindo com: Zeaxantina.



Fonte: Autores (2023).

O fitoflueno, figura 6, interagiu com nove aminoácidos (LEU325, LEU 97, LEU337, CYS323, ILE335, PHE208, TYR69, PHE352, TYR407, TYR444), sendo interações π -Alkyl e Alkyl, além da presença de uma interação antagonista com o aminoácido LEU 97.

Figura 6. MAO-A interagindo com: Fitoflueno.

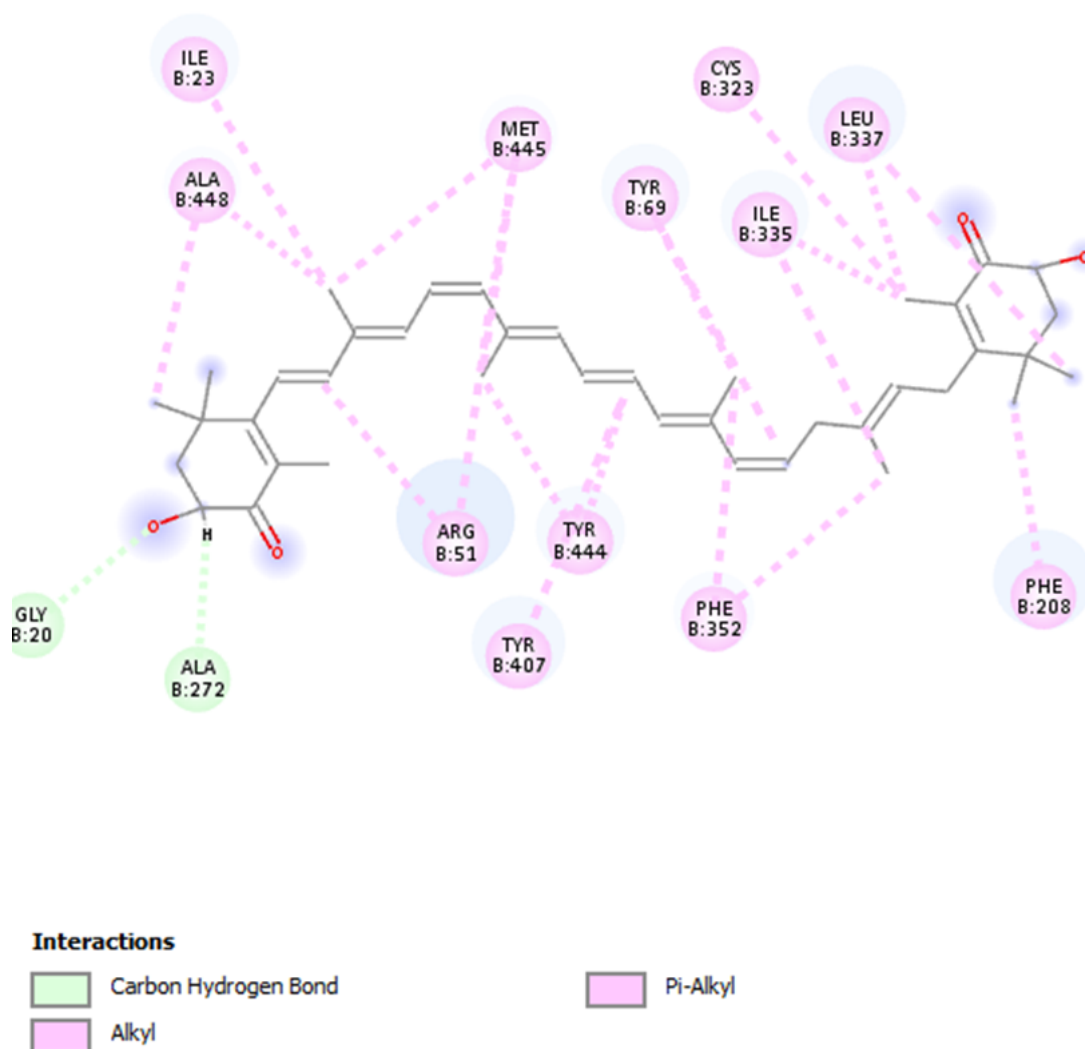


Fonte: Autores (2023).

Por sua vez, a astaxantina, figura 7, obteve uma interação de ligação hidrogênio-carbono (ALA272). Embora esse tipo de interação C-H seja fraca (cerca 4 kJ.mol⁻¹), é provável que muitos grupos CH participem na interação com o sistema π , aumentando a energia total, visto que esse tipo de interação persiste, mesmo em meios polares, tais como a água, de tal forma que fica evidente que essas interações podem ter um papel importante para a estabilidade estrutural de macromoléculas orgânicas, ou seja, pode possibilitar estabilidade nas interações entre o ligante-receptor (SHANTHI et al., 2010). Além disso, a astaxantina também apresenta quatro interações Alkyl com os aminoácidos (TYR407, TYR444,

PHE352, PHE208) e três do tipo π -Alkyl (ILE335, CYS323, TYR69).

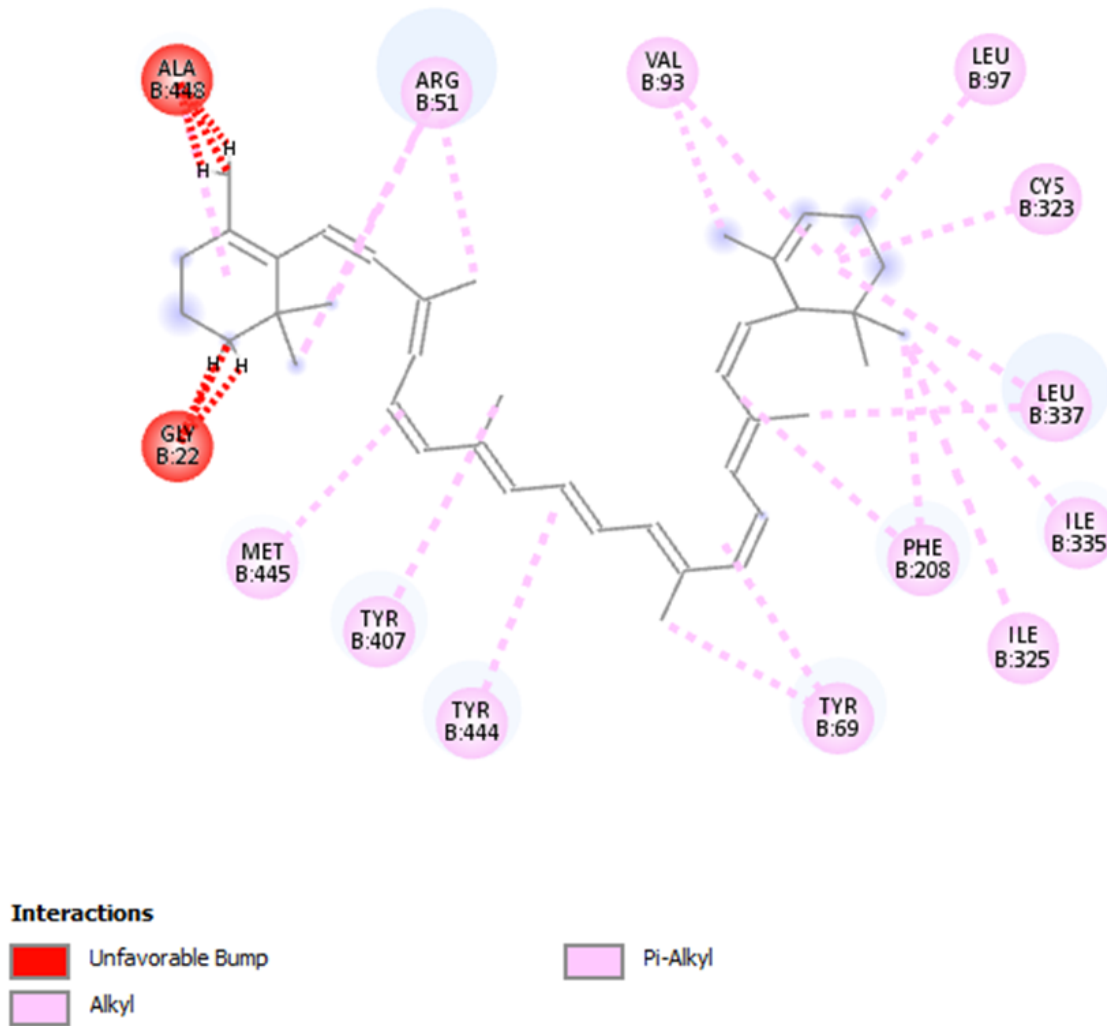
Figura 7. MAO-A interagindo com: Astaxantina.



Fonte: Autores (2023).

O β -caroteno, figura 8, por sua vez, obteve seis interações do tipo Alkyl (LEU337, ILE335, ILE325, TYR69, TYR444, TYR407) e duas do tipo π -Alkyl (CYS323, PHE208).

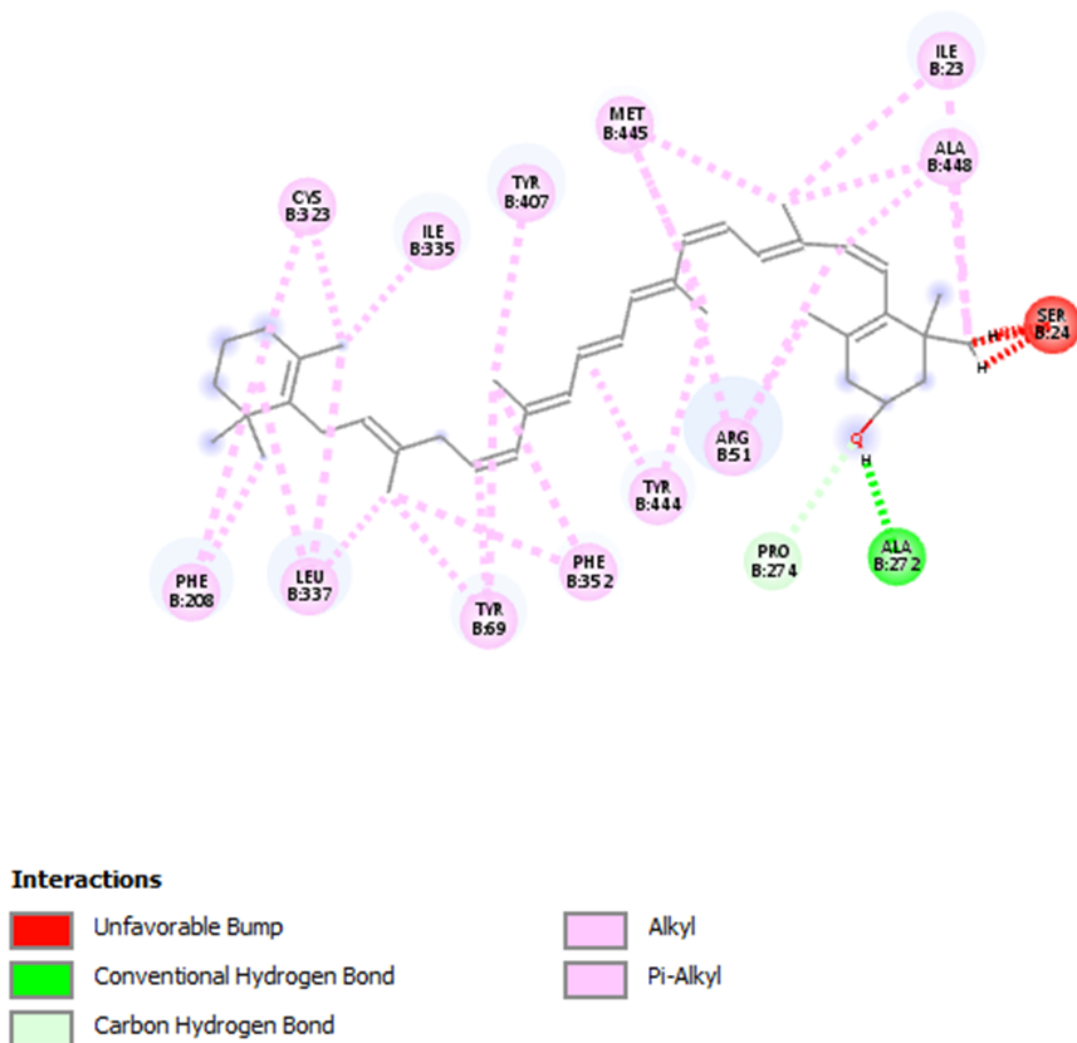
Figura 8. MAO-A interagindo com: β -caroteno.



Fonte: Autores (2023).

O ácido clorogênico, figura 9, interagiu com oito aminoácidos (TYR407, ILE335, CYS323, PHE208, LEU337, TYR69, PHE352, TRY444), sendo quatro interações Alkyl (LEU337, PHE208, TYR407, ILE335) e quatro interações π -Alkyl (TYR444, ILE335, CYS323, TYR69). Contudo, foi verificado que existe afinidade das ligações Alkyl com ligações de hidrogênio-carbono, visto que a partir da análise detalhada do acoplamento dessas ligações foi observado que os aminoácidos (PHE208, LEU337, TYR407, ILE335) demonstraram um grau de influência pela energia de afinidade nas interações.

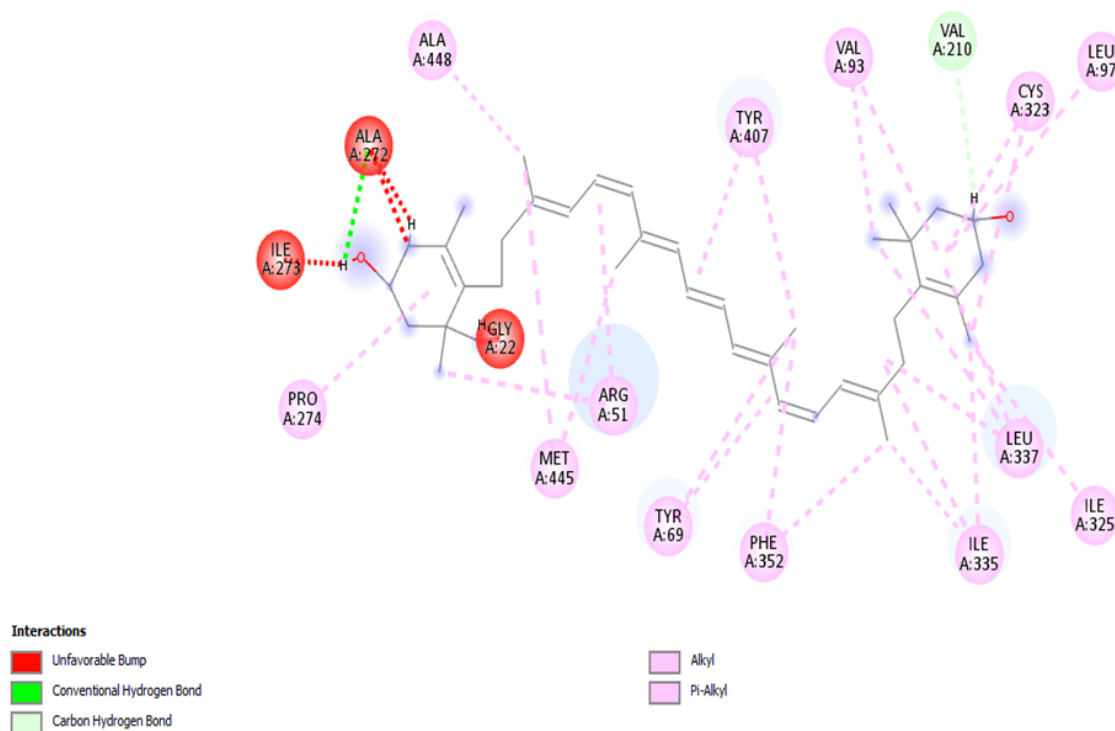
Figura 9. MAO-A interagindo com: Ácido clorogênico.



Fonte: Autores (2023).

Por último, o complexo 7,7',8,8'-Tetrahidro-beta, beta-caroteno, figura 10, apresentou cinco interações Alkyl com os aminoácidos (TYR69, PHE352, ILE335, ILE325, LEU337), duas interações do tipo π -Alkyl com os aminoácidos (CYS323, TYR407, LEU97) e uma interação de ligação hidrogênio-carbono (VAL210).

Figura 10. MAO-A interagindo com: 7,7',8,8'-Tetrahidro-beta, beta-caroteno.



Fonte: Autores (2023).

3.2 Validação do Protocolo de Docking por Re-docking

A validação do protocolo de docking por re-docking, como já mencionado, foi realizada com o próprio ligante cristalográfico da MAO-A, a fim de reproduzir o modelo original de ligação. Desse modo, obteve-se um valor de Desvio Médio Quadrático (RMSD) igual a 0,3 Å, que indica a validação do método com sucesso, visto que para o docking ser validado é necessário que o valor de RMSD seja igual ou inferior a 2Å (OLIVEIRA et al.; 2021). A Figura 11 apresenta a sobreposição do ligante Monoamina oxidase A (MAO-A) e a melhor pose de docking com RMSD igual a 0,3 Å.

Figura 11. Sobreposição do ligante Monoamina oxidase A (MAO-A) e a melhor pose de docking com RMSD igual a 0,3 Å.



Fonte: Autores (2023).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como mencionado inicialmente, o objetivo central deste trabalho foi a identificação de potenciais inibidores para a Monoamina oxidase (MAO), especificamente a MAO-A, para o tratamento da depressão, a partir de compostos identificados e/ou isolados de espécies do gênero *Spondias*, utilizando como método *in silico* o docking molecular.

Sendo assim, a ancoragem entre a proteína (MAO-A) e os ligantes foi realizada. Com isso, 104 compostos foram identificados em 21 espécies do gênero *Spondias*, visando estudar as interações entre os complexos proteína-ligante, além de buscar compreender as interações energéticas, interações intermoleculares e a afinidade entre o receptor e o ligante, com o intuito de encontrar novos candidatos a fármacos, com alta afinidade e especificidade para o sítio alvo e com maior atividade intrínseca.

Ademais, o estudo do docking molecular possibilitou observar que os compostos identificados e/ou isolados da espécie do gênero *Spondias* obtiveram pontuações (scores) superiores a 56,68 Kcal/mol, o que prediz que esses metabólicos secundários (ligantes) realizaram interações estáveis com MAO-A

(alvo), formando complexos estáveis.

Por sua vez, na análise das interações que acontecem com os aminoácidos do sítio ativo do complexo proteína-ligante foi verificado que, dos 104 complexos como possíveis inibidores, mais da metade – um total de 78 complexos – demonstraram interações com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da MAO-A, sendo esses compostos, em sua maioria, pertencentes às espécies do gênero *Spondias mombin* L, *Spondias tuberosa* e *Spondias lutea*. Desse modo, como já mencionado, 48 complexos apresentaram interações π -Alkyl, Alkyl, π -Sulfur e π - π -T-Shaped e 30 complexos apresentaram interações por ligações de hidrogênio, o que evidencia a existência de afinidade e especificidade dos ligantes com a Monoamina oxidase A (MAO-A).

Dentre os 10 complexos que obtiveram os melhores scores de pontuação: Beta-Caroteno-15,15'-epóxido (98,08 Kcal/mol), rutina (97,17 Kcal/mol), trigaloil glicose (96,80 Kcal/mol), éster butílico do ácido clorogênico (93,43 Kcal/mol), zeaxantina (92,10 Kcal/mol), fitoflueno (84,32 Kcal/mol), astaxantina (80,09 Kcal/mol), β -caroteno (76,76 Kcal/mol), ácido clorogênico (75,70 Kcal/mol) e 7,7',8,8'-Tetrahydro-beta,beta-caroteno (74,59 Kcal/mol), o Beta-Caroteno-15,15'-epóxido (98,08 Kcal/mol) foi tido como o mais promissor dos compostos inibidores da MAO-A, já que ele apresentou o maior score de pontuação e realizou oito interações com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima.

Contudo, cabe enfatizar que os demais compostos também demonstraram resultados promissores como possíveis inibidores da MAO-A, uma vez que apresentaram elevadas pontuações de scores superiores a 56,68 Kcal/mol e todos os compostos conseguiram interagir com pelo menos cinco resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima o que significa um elevada interação, afinidade e especificidade entre os complexos proteína-ligante. Ademais, o método demonstrou ser eficaz, tendo em vista que apresentou o RMSD igual a 0,3 Å, o que indica que os ligantes conseguiram reproduzir uma pose esperada ou semelhante com o próprio ligante que se encontrava cristalógrafo com a proteína.

Dessa forma, é evidente que os metabólitos secundários identificados e/ou isolados pertencentes às espécies do gênero *Spondias* relatados nesse estudo

trazem contribuições significativas e promissoras para a descoberta de novos agentes terapêuticos, que podem contribuir para o tratamento de doenças neurológicas, incluindo a depressão. Além disso, ausência de estudos *in vitro* com esses compostos como inibidores da MAO-A é percebida na literatura. Logo, este estudo pode contribuir com estudos posteriores, onde os melhores inibidores relatados neste estudo poderão ser testados tanto *in vitro* como *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ACD/ChemSketch, version 2016.2.2, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2015.

ALENCAR, W. L. M. et al. Interactions of Co, Cu, and Non-metal phthalocyanines With external structures of SARS-COV-2 using docking and molecular dynamics. **Scientific Reports**, v.12, n. 1. p. 1-20, 2022.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K.; SILVA, A. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.

ARRÚA, O. E. **Função de escore baseada em machine learning para docagem molecular proteína-ligante**. 2020. 370 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Computação, Rio Grande, 2020.

BARREIRO, E.J; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BARREIRO, E.J; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**.3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BRAIBANTE, M. E. F. et al. A Química dos Chás. **Química Nova na Escola**, v. 36, n. 3, p. 168-175, 2014.

BRITO, G. S. L. **Corroboração computacional por “Docking” Molecular da Hipótese Auto-imune da Esquizofrenia**. 2007. 55f. Tese (Doutorado Ciências em

engenharia de sistemas e computação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 2007.

CHRISTENHUSZ.M.J.M.; BYNG.J.W. The number of known plant species in the world and its annual increase. **Phytotax**, v.261, n.3, p. 201-217, 2016.

FILHO, F. C. M. et al. Estudos da inibição da acetilcolinesterase por docking molecular: aplicação no tratamento da doença do Alzheimer. **Educação ciência e saúde**, v. 7, n. 2, p. 1-18, 2020.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.; G. A Century of Alzheimer's disease. **Science**, v. 314, n.3, p.777-781, 2006.

GURYANOV, I; FIORUCCI, S; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. **Materials Science and Engineering**, v. 68, n. 1, p. 890–903, 2016.

JIA, Z.; ZHU, Q. 'Click' assembly os selective inhibitors for MAO-A. **Bioorg Med Chem Letters**, v. 20, n. 21, p. 6222-6225, 2010.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Molecular recognition into active sites using a genetic algorithm with description of desolvation. **J. Mol. Biol**, v. 245, n. 1, p. 43-53, 1995.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol**, v. 267, n. 3, p. 727- 748, 1997.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. 1.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008.

LASKOWSKI, R. A, CHISTYAKOV, V.V., THORNTON, J.M. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n.1, p. 266-268, 2005.

LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug Discovery Today**, v.7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C. VEIGA Jr., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, V. 25, n.3, p. 429- 438, 2002.

MARTÍNES, F. P. et al. Molecular Docking: Current advances and challenges. **Revista Especializada em Ciências Químico-Biológicos**, v. 21, n.1, p. 65-87, 2018.

MILCZERK, E. M. et al. The Gating residues Ile199 and Tyr326 in the role of human monoamine oxidase B in substrate and inhibitor recognition. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 24, p. 4860-4869, 2011.

MORRIS, G.M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

OLIVEIRA, J. S. RAMOS, L. F. P. Triagem virtual de inibidores da MAO-B, um alvo molecular na doença de Parkinson. **Revista neurociências**, v. 29, n. 1, p. 1-26, 2021.

OKADA-JÚNIOR, C. W et al. Phthalimide Derivatives with Bioactivity against Plasmodium falciparum: Synthesis, Evaluation, and Computational Studies Involving bc1 Cytochrome Inhibition. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 9424- 9430, 2018.

PAVARINIA, D. P.; PAVARINIB, S. P.; NIEHUESA, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

SILVA, G. A. D. et al. Gênero Spondias: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Revista BioFar**. V. 10, n. 1, p. 1-16. 2014.

SHANTHI, V.; RAMANATHAN, K.; SETHUMADHAVAN, R. Exploring the role of C-H...pi interactions of the structure stability of single chain "all-alpha" proteins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1473-1483, 2010.

SHIH. J.C; THOMPSON, R. P. Monoamina Oxidase in Neuropsychiatry and behavior. **Am J Hum Genet**, v. 65, n. 3, p. 593-598, 1999.

SPECIAN. V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

THOMSEN, R; CHRISTENSEN, M. H. J. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Med Chem**, v. 49, n. 11, p. 3315- 3321, 2006.

VEIGA Jr., V. F.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519- 528, 2005.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHOM, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 4, p.609-623, 2003.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRÜGER, J.; BRLZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neurosci Biobehav Ver**, v. 37, n.10, p.2331–2371, 2013.

WOUTERS, J. Structural aspects of monoamine oxidase and its reversible inibidores. **Curret medicinal chemistry**, v. 5, n. 2, p. 137-162, 1998.

ANEXO

A1. Comprovante de submissão do artigo.

[Home](#)[Author](#)[Review](#)

DO NOT USE YOUR BROWSER BACK BUTTON. TO EXIT THIS PAGE, PLEASE CLOSE YOUR BROWSER WINDOW OR CLICK ON THE RETURN TO DASHBOARD BUTTON, IF AVAILABLE.

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

Journal of Pharmacy and Pharmacology

Manuscript ID

JPP-23-0295

Title

In silico screening of secondary metabolites from species of the genus Spondias in search of Monoamine oxidase (MAO) inhibitors

Authors

Medeiros, Mônica

Pinheiro, Elayne

Date Submitted





04-Apr-2023

[Author Dashboard](#)

© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2023. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

 [@Clarivate for Academia & Government](#) |  [System Requirements](#) |  [Privacy Statement](#) |  [Terms of Use](#)

