

ESTUDO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE ALCALOIDES PRESENTES NA *Sophora alopecuroides* L. CONTRA *Candida auris*

Marcus V. F. da Silva¹; Jacilene Silva²; Francisco N.M.Lucio³; Victor M. de Oliveira⁴; Victor B. Fernandes⁵; Francisco R. S. Mendes⁶; Francisco F. Lopes⁷; Wanessa A. Barbosa⁸; Abraão L. S. dos Santos⁹; Marcia M. Marinho¹⁰; Selene M. de Moraes¹¹; Emmanuel S. Marinho¹²

^{1,8} Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária-FAVET,

^{2,10} Universidade Regional do Cariri, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica,

^{3,4,5,6,7,9,11,12} Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências e Tecnologia.

Palavras-Chave: Resistência Antimicrobiana, Produtos Naturais, Docking Molecular.

Introdução

O fungo *Candida auris* foi descoberto em 2009, sendo sua cepa identificada e isolada no Japão, tornando-se um fungo bastante letal com uma alta taxa de mortalidade mundialmente, principalmente em pessoas com o sistema imunológico comprometido. A incidência desse fungo foi relatada em diversos continentes, dentre eles Asiático, Africano, Europeu e América do Sul (Dahiya *et al.*, 2020). A palavra “auris” vem do latim que significa ouvido, pois foi identificado e isolado pela primeira vez no canal auditivo de um paciente hospitalizado (Watkins *et al.*, 2022).

C. auris forma colônias em meio ao crescimento fúngico. Com o grande surto de pessoas contaminadas, sua rápida propagação, persistência no ambiente e resistência aos medicamentos antifúngicos, a OMS (Organização Mundial Saúde) acrescentou a *C. auris* à lista do ano de 2022 como fungo patógeno de categoria prioritária. Sua forma de transmissão é semelhante das outras espécies de candidas, propagando-se em colonização nos canais auditivos, sistema respiratório, sistema urinário e pele de indivíduos imunossuprimidos, tornando-se uma infecção grave na corrente sanguínea, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Bing *et al.*, 2024).

Doenças causadas por agentes patogênicos estão se tornando cada vez mais resistentes aos fármacos antimicrobianos, sendo observado um aumento de microrganismos resistentes a múltiplas drogas (MDR) (Machado *et al.*, 2023). Nesta perspectiva, a utilização de produtos naturais e fitoterápicos como meio alternativo para o tratamento e prevenção de doenças vem crescendo e tornando-se uma boa alternativa para diversas enfermidades, visto que é comprovado cientificamente que produtos naturais possuem inúmeras atividades biológicas, incluindo antifúngica (Jesus *et al.*, 2024).

Sophora alopecuroides L. é uma planta bastante usada na medicina tradicional para diversas enfermidades como disenteria, dor de estômago, distúrbio de leucorreia, eczema, psoríase, etc. Possui efeitos desintoxicantes, analgésicos e inseticidas. Seus constituintes químicos principais são componentes bioativos que incluem alcaloides, flavonas, óleos voláteis e quinonas. Sendo isolados e identificados mais de 25 alcaloides dentre eles matrina (C₁₅H₂₄N₂O) e soforamina (C₁₅H₂₀N₂O), onde os alcaloides totais possuem atividade antimicrobiana muito significativa (Huang *et al.*, 2016).

Partindo da necessidade de descobrir agentes terapêuticos contra a *C. auris*, a abordagem *in silico* propicia e facilita a previsão de possíveis mecanismos de ação de moléculas frente a enzimas alvo por meio de simulações computacionais, além disso, o estudo *in silico* apresenta custo benefício acessível, comparando a estudos experimentais, onde muitos medicamentos já foram desenvolvidos utilizando simulação computacional como etapa inicial (Braga, 2023). O docking molecular é uma técnica de modelagem molecular que objetiva prever a estrutura do complexo formado entre ligante e proteína através de uma modelagem estrutural mais próxima da precisão gerando uma estimativa da atividade de um ligante (Souza, 2012).

Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar *in silico* as interações moleculares dos alcaloides matrina e soforamina, presentes na planta *Sophora alopecuroides* frente a *C. auris* por meio de simulações computacionais, utilizando a técnica de docking molecular.

A justificativa do presente trabalho destaca a *C. auris* como um fungo emergente com diversos casos letais em todo território mundial, tornando-se um superfungo resistente às três classes de medicamentos antifúngicos sintéticos que é o meio de tratamento da infecção causada pela *C. auris*. Na busca por um meio alternativo para combater a resistência do fungo estão à utilização de produtos naturais por meio de metabolitos secundários, uma vez que, já foram comprovadas cientificamente atividades antioxidante, antimicrobiana e antifúngica desses compostos, devido aos fitoquímicos fenóis, alcaloide e dentre outras propriedades químicas que podem estar presente nas raízes, caule, folha, flor e sementes. Partindo disso, o docking molecular é uma ferramenta essencial para estudar o possível mecanismo de ação dos compostos químicos presente *S. alopecuroides* frente ao superfungo *C. auris*.

Material e Métodos

A estrutura química dos alcaloides matrina e soforamina foram desenhadas no software de licença acadêmica MarvinSketch® (<https://chemaxon.com/marvin>) e otimizadas utilizando o campo de força MMFF94 – *Merck Molecular Force Field* (Csizmadia, 1999).

Para estudar o possível mecanismo de ação das moléculas frente à *C. auris*, foram realizadas simulações de docking molecular entre os alcaloides e a isomerase, identificada como “*Crystal structure of FKBP12 of Candida auris*” no repositório de proteínas Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) sob código PDB ID 6VSI (Bashir *et al.*, 2020).

Para a realização das simulações de docking molecular, foi utilizado o *software* AutoDockVina (Trott; Olson, 2009), *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA), *Exhaustiveness* 64 (Marinho *et al.*, 2020). O grid box foi centralizado de forma a englobar toda a enzima utilizando os eixos (24.109 x, 4.73 y, 3.798 z) e size (100 x, 88 y, 112 z). Como critérios da preparação das estruturas proteicas, foram removidos os resíduos, adicionados os hidrogênios polares, cargas Kollman e cargas Gasteiger (Yan *et al.*, 2014). A preparação foi realizada usando o software Autodocktools™ (Huey; Morris; Forli, 2012).

Como critério padrão foram realizadas 50 simulações independentes para cada um dos ligantes propostos gerando 20 poses por simulação, a *best pose* foi selecionada utilizando o parâmetro estatístico RMSD (*Root Mean Square Deviation*) com valores até 2,0 Å (Yusuf *et al.*, 2008) e a energia de afinidade com valores iguais ou inferiores a -6,0 kcal/mol (Shityakov; Förster, 2014).

A intensidade das ligações de hidrogênio foi analisada utilizando os valores das distâncias entre os átomos doadores e receptores, sendo consideradas forte quando apresentam distâncias entre 2,5-3,1 Å, moderada entre 3,1-3,55 Å e fraca quando apresentam distâncias superiores a 3,55 Å (Imberty *et al.*, 1991).

A análise dos resultados foi realizada usando os softwares UCSF Chimera™ (Pettersen *et al.*, 2004), *Discovery Studio Visualizer™ Viewer* (BIOVIA DASSAULT SYSTÈMES, 2016) e *Pymol* (Delano, 2020). As interações moleculares e ligações de hidrogênio foram visualizadas usando o servidor Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Adasme *et al.*, 2021; Salentin *et al.*, 2015).

Resultados e Discussão

Após as simulações de docking molecular foi possível observar que os alcaloides matrina e soforamina apresentaram valores RMSD de 1,564 Å e 1,496 Å respectivamente, e energia de afinidade de -6,149 kcal/mol, -6,354 kcal/mol respectivamente (Figura 1C), valores dentro do padrão de idealidade descrito na literatura, confirmando a viabilidade para formação dos complexos receptor-ligante.

A energia de afinidade quantifica a contribuição energética das interações ligante-receptor, em que uma energia de afinidade mais negativa significa uma afinidade de ligação mais forte entre o ligante e o receptor. Esta serve como um indicador da atividade do composto e oferece evidências promissoras para sua eficácia potencial (Azevedo, 2010). Desse modo, os resultados mostraram que a soframina apresentou potencial significativo como inibidor da *C. auris*, visto que o alcaloide apresentou o menor valor de energia de afinidade (-6,354 kcal/mol).

As interações observadas em cada complexo receptor-ligante formado foram descritas na Tabela 1. A análise detalhada das interações mostrou que a matrina (Figura 1B) apresentou cinco interações hidrofóbicas, uma ligação de hidrogênio de intensidade moderada (George, 1997) e uma interação π -Cation. Soforamina (Figura 1A) apresentou quatro interações hidrofóbicas e uma interação de empilhamento π - π . A distância entre as ligações está intimamente relacionada ao grau de força das interações ligante-receptor (Oliveira *et al.*, 2024), como mostrado pelo mapa de calor na Figura 1D. Os ligantes mostraram interações hidrofóbicas semelhantes com os resíduos de aminoácidos Phe-50A, Ile-60A e Phe-103A, como mostrado pelo gradiente azul do mapa de calor.

Tabela 1. Distâncias e Tipos de Interações dos alcaloides frente à *C. auris*

Ligante	Resíduo	Distância (Å)	Tipo de Interação
Matrina	Phe-50A	3,58	Hidrofóbica
	Phe-50A	3,60	Hidrofóbica
	Ile-60A	3,75	Hidrofóbica
	Trp-63A	3,43	Hidrofóbica
	Phe-103A	3,69	Hidrofóbica
	Tyr-86A	3,32	Ligação de hidrogênio (moderada)
	Trp-63A	4,68	π -Cátion
Soforamina	Phe-50A	3,60	Hidrofóbica
	Val-59A	3,89	Hidrofóbica
	Ile-60A	3,45	Hidrofóbica
	Phe-103A	3,77	Hidrofóbica
	Trp-63A	4,13	Empilhamento π - π

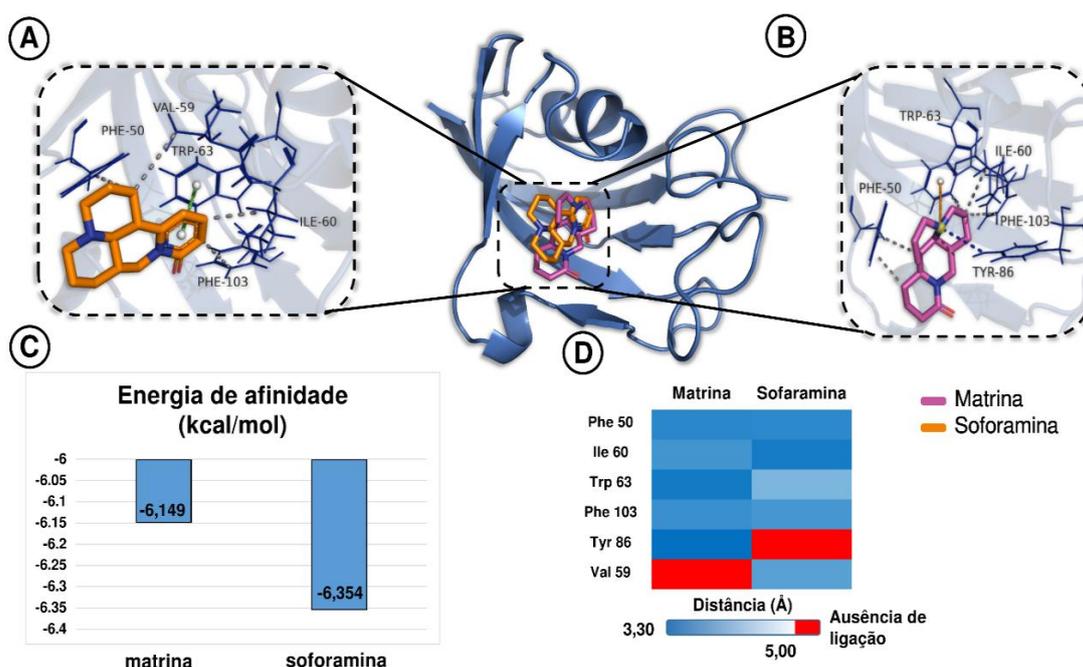


Figura 1. Sítio de ligação dos alcaloides frente à *C. auris*. Soforamina (A), Matrina (B), Energia de afinidade(C) e Mapa de calor (D).

Conclusões

O estudo de docking molecular mostrou que os compostos apresentaram valores de energia de afinidade significativos, com destaque para a soframina. Os dados também mostraram que os alcaloides interagem na mesma região da enzima, desse modo, podemos inferir que os alcaloides avaliados apresentaram excelentes resultados na etapa inicial do estudo que busca por candidatos a fármacos para combater a *Candida auris*, logo, podem ser uma alternativa para novas abordagens experimentais em pesquisas futuras visando o planejamento de fármacos antifúngicos. É importante ressaltar que a análise realizada nesse estudo serve para indicar possíveis mecanismos de ação das moléculas frente à *C. auris*, necessitando de futuros testes *in vitro* e *in vivo* sobre a viabilidade desses compostos.

Agradecimentos

À UECE e ao Laboratório de Bioprospecção e Monitoramento de Recursos Naturais (LBMRN) pelo espaço para realização deste trabalho, à FUNCAP e a CAPES pela concessão de bolsas e apoio financeiro.

Referências

- Adasme, M. F.; Linnemann, K. L.; Bolz, S. N.; Kaiser, F.; Salentin, S.; Haupt, V. J.; Schroeder, M. PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic Acids Research**, 49, (1), p. W530–W534, 2021.
- Azevedo W. F. J. MolDock applied to structure-based virtual screening. **Curr Drug Targets**. Mar;11(3):327-34, 2010.
- Bashir, Q.; Li, Z.; Li, H.; LeMaster, D. M.; Hernández, G. Crystal structure and transient dimerization for the FKBP12 protein from the pathogenic fungus *Candida auris*. **Biochemical and biophysical research communications**, 525(4), 1103-1108,2020.
- Bing, J.; Guan, Z.; Zheng, T.; Ennis, C. L.; Nobile, C. J.; Chen, C; Chu,H.; Huang, G. Rapid evolution of an adaptive multicellular morphology of *Candida auris* during systemic infection. **Nature Communications**, 15(1), 2381, 2024.
- Biovia Dassault Systèmes. **Discovery Studio Visualizer Version 16.1.0**. San Diego: Accelrys Software Inc., 2016.
- Braga, A. P. **Atividade Anti-Helmíntica in vitro de Monoterpenos Benzoiados Sobre *Haemonchus contortus*, Toxicidade e Análise in silico**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, 2023.
- Csizmadia, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. In: 1999, Basel, Switzerland. **Proceedings of The 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry**. Basel, Switzerland: MDPI, p. 1775, 1999.
- Dahiya, S.; Chhillar, A. K.; Sharma, N.; Choudhary, P.; Punia, A.; Balhara, M.; Kaushik, K.;Parmar, V. S. *Candida auris* and nosocomial infection. **Current Drug Targets**, 21(4), 365-373.2020
- Delano, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3**.
- George, A. J. An Introduction to Hydrogen Bonding. Oxford University Press, **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 22, 1997.
- Huang, Y. X.; Wang, G.; Zhu, J. S.; Zhang, R.; Zhang, J. Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties of *Sophora alopecuroides* L. **European Journal of Inflammation**, 14(2), 128-132,2016
- Huey, R.; Morris, G. M.; Forli, S. **Using autodock 4 and autodock vina with 22 autodocktools : a tutorial**. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory, 2012.
- Imberty, A.; Hardman, K. D.; Carver, J. P.; Perez, S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.
- Jesus D. J.; Oliveira, L. T. A.; Assis C, M. D. M.; Silva, L. D. A. M.; Nascimento, F.; Dietrich, L. Uso de fitoterápicos e demais componentes vegetais e minerais na fabricação de produtos odontológicos naturais: Revisão de literatura. **Research, Society and Development**, 10(3), e57610313678-e57610313678. 2021. 04

Machado, A.; Zamora, M. L.; Alexis, F.; Álvarez, S. J. M. Use of plant extracts, bee-derived products, and probiotic-related applications to fight multidrug-resistant pathogens in the post-antibiotic era. **Future Pharmacology**, 3(3), 535-567, 2023.

Marinho, E. M.; Andrade Neto, J. B.; Silva, J.; Silva, C. R.; Cavalcanti, B. C.; Marinho, E. S.; Nobre Júnior, H. V. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, n. November 2020, p. 1–6, 2020.

Oliveira, V. M.; Rocha, M. N.; Roberto, C. H. A.; Lucio, F. N. M.; Marinho, M. M.; Marinho, E. S.; Morais, S. M. Insights of structure-based virtual screening and MPO-based SAR analysis of berberine-benzimidazole derivatives against Parkinson disease. **Journal of Molecular Structure**, v. 1302, p. 137453, 2024.

Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, 25,(13), p. 1605–1612, 2004.

Salentin, S.; Schreiber, S.; Haupt, V. J.; Adasme, M. F.; Schroeder, M. PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, 10 (43), n. W1, p. W443–W447, 2015.

Silva, J.; Rocha, M. N.; Marinho, E. M.; Marinho, M. M.; Marinho, E. S.; Santos, H. S. Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Analytical & Pharmaceutical research**, v. 10, n. 5, p. 177–194, 2021.

Shityakov, S.; Förster, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014.

Souza, S. D. D.; Rodrigues, C. R.; Cabral, L. M. **Estudo de Inibidores de Colinesterases Aplicando Técnicas de QSAR -2D (HQSAR) e Docking Molecular**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

Yan, J.; Zhang, G.; Pan, J.; Wang, Y. α -Glucosidase inhibition by luteolin: kinetics, interaction and molecular docking. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, n. March 2014, p. 213–23, 2014.

Yusuf, D.; Davis, A. M.; Kleywegt, G. J.; Schmitt, S. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008.

Watkins, R. R.; Gowen, R.; Lionakis, M. S.; Ghannoum, M. Update on the Pathogenesis, Virulence, and Treatment of *Candida auris*. **Pathogens and Immunity**, 7(2), 46, 2022