



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



ANTONIO ANDERSON FREITAS PINHEIRO

**ESTUDOS DE INIBIÇÃO E MODELAGEM POR HOMOLOGIA
DA ENZIMA BETA(1,3)-D-GLICANO SINTASE DE
*MONILIOPHTHORA PERNICIOSA***

ANTONIO ANDERSON FREITAS PINHEIRO

**ESTUDOS DE INIBIÇÃO E MODELAGEM POR HOMOLOGIA
DA ENZIMA BETA(1,3)-D-GLICANO SINTASE DE
*MONILIOPHTHORA PERNICIOSA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida de Assis
Co-orientador: Prof. Dr. Alex Gutterres Taranto

Feira de Santana, BA
2011

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Angélica Maria Lucchese.

UEFS

Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida.

UEFS

Profª Drª Sandra Aparecida Assis.

Orientadora e Presidente da Banca

UEFS

FEIRA DE SANTANA-BA

2011

Aos meus pais e a minha esposa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Professora Sandra e ao meu orientador Professor Alex.

À minha esposa e aos meus pais pelo apoio incondicional.

Aos colegas de laboratório que me auxiliaram na realização dos trabalhos.

Ao professor Manoelito pelo incentivo e pelos conselhos sempre coerentes.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (professores, estudantes e funcionários) UEFS/FIOCRUZ-Ba que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Só se é curioso na proporção de quanto se é instruído (Jean Jacques Rousseau).

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Trabalhos de identificação de sequências genômicas de beta(1,3)-D-glicano sintase. 27

Tabela 2: Cepas do Gênero *Candida* resistentes à micafungina segundo a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Insituite). 39

CAPÍTULO 2

Table 1: CATH search-server selected templates. 58

Table 2: Stereochemical parameters after models refinement. 62

Table 3: T-Score and RMSD from templates-models. 63

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Efeito *in vitro* de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*. 83

Tabela 2: Efeito *in vitro* (% de inibição) de derivados glicolipídicos sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*. 86

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Data, local de coleta e identificação das espécies de *Lippia* e *Hyptis* coletadas no Semi-árido da Bahia em diferentes épocas do ano estudadas no presente trabalho. 95

Tabela 2: Efeito *in vitro* de extratos vegetais sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*. 101

Tabela 3: Efeito *in vitro* (% de inibição) de extratos vegetais sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*. 103

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Fases biotrófica e necrotrófica do *M. pernicioso*. 14

Figura 2: Ciclo de vida do *M. pernicioso*. 16

CAPÍTULO 1

Figura 1: Síntese de beta(1,3)-D-glicano através da ação da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase. 25

Figura 2: Localização do beta(1,3)-glicano através da formação de um complexo com o anticorpo conjugado a partículas de ouro. 31

Figura 3: Componentes da parede celular fúngica. 35

CAPÍTULO 2

Figure 1: Multiple sequences alignment in Blastp-server of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme sequence (glucan) and PDB models (1D7U and 1ZOD). Active site defined by dashed red. 58

Figure 2: BegS2 model alignment in Blastp-server of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme sequence (query) and PDB models (3A8E and 3L7I). Active site defined by dashed red. 60

Figure 3: Ramachandran plot of BegS1 (Procheck 3.0). 62

Figure 4: Ramachandran plot of BegS2 (Procheck 3.0). 64

Figure 5: The structure of *M. pernicioso* beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme. Helical are colored red and, and sheet, coil, and loops secondary structures in BegS1 are colored red, blue, green and gray, respectively. 65

Figure 6: The characteristic structures of the GT-2 family in the *M. pernicioso* beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme. 66

Figure 7: Flat ribbon representation of BegS1 model with active site amino acid residues represented in space-filling form and amino acid sequence of beta(1,3)-D-glucan synthase from *Moniliophthora perniciosa* with active site amino acid residues indicated by red color. 67

CAPÍTULO 3

- Figura 1:** Estrutura dos compostos estudados. 79
- Figura 2:** Estrutura dos compostos estudados. 80
- Figura 3:** Atividade antifúngica do composto HQN (estrutura localizada na figura 3). 84
- Figura 4:** Atividade antifúngica do composto MAN (estrutura localizada na figura 3). 84
- Figura 5:** Atividade antifúngica do composto RD6 (estrutura localizada na figura 2). 84
- Figura 6:** Atividade antifúngica do composto EGG (estrutura localizada na figura 3) 85
- Figura 7:** Atividade antifúngica do composto ANPB (estrutura localizada na figura 3). 85
- Figura 8:** Atividade antifúngica do composto R14 (estrutura localizada na figura 2). 85

CAPÍTULO 4

- Figura 1:** Atividade antifúngica do extrato metanólico de *L. microphylla* (amostra Silva LMA). 98
- Figura 2:** Atividade antifúngica do extrato metanólico de *L. microphylla* (Amostra Silva LMB). 99
- Figura 3:** Atividade antifúngica do extrato metanólico de *L. thymoides Martius & Schauer* (Amostra Silva LTA) 99
- Figura 4:** Atividade antifúngica do extrato metanólico de *L. alnifolia* (Amostra Silva LAA). 99

Figura 5: Atividade antifúngica do extrato metanólico de *L. thymoides* Martius & Schauer (Amostra Lapron 7 LTB). 100

Figura 6: Atividade antifúngica do óleo essencial de *L. alnifolia* Schauer (Amostra Óleo de *Lippia* LAB). 100

Figura 7: Atividade antifúngica do óleo essencial de *Hyptis fruticosa* Salzm ex Benth (Amostra Óleo de *Hyptis* HF). 100

RESUMO

A doença da Vassoura-de-Bruxa, causada pelo fungo basidiomiceto hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*, reduziu drasticamente a produção de cacau no Brasil. O *M. perniciosa* coloniza os tecidos meristemáticos diminuindo a produtividade, bem como o tempo de vida da planta hospedeira. Esforços têm sido despendidos para elucidação de alvos moleculares, como a beta(1,3)-D-glicano sintase, que é uma glicosiltransferase fundamental para a construção da parede celular e catalisa a formação dos compostos estruturais beta(1,3)-glicanos. Métodos de bioinformática são capazes de determinar a estrutura das proteínas sem a realização de etapas experimentais, considerando as dificuldades relacionadas aos métodos experimentais para determinação da estrutura de alvos moleculares. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o modelo tridimensional da enzima sintase do beta(1,3)-D-glicano de *M. perniciosa* pela modelagem por homologia e estudar a inibição do crescimento micelial do fungo por compostos orgânicos e extratos vegetais com uso potencial em plantações de cacau. Para construir os modelos, foram executadas duas metodologias: através da modelagem comparativa por satisfação de restrições espaciais no MODELLER e por meio da metodologia de montagem de corpos rígidos no software SWISS-MODEL. Foi obtido modelo com estrutura razoável para a enzima beta(1,3)-D-glucano sintase (BegS1), este modelo apresentou concordância com a estrutural geral da família de enzimas GT-2. Nos estudos de inibição do crescimento fúngico, a CIM foi considerada aquela onde existiu inibição de 100% do crescimento micelial. Extratos obtidos a partir de *Lippia alnifolia* e a substância HQN revelaram resultados promissores com menores valores de CIM para o fungo *M. perniciosa*.

Palavras-chave: Doença da Vassoura-de-Bruxa, *Moniliophthora perniciosa*, modelagem por homologia, beta(1,3)-D-glicano sintase, glicosiltransferases; inibição do crescimento fúngico.

ABSTRACT

The Witches' Broom Disease, caused by the hemibiotrophic basidiomycete fungus *Moniliophthora perniciosa*, drastically reduced the production of cocoa in Brazil. *M. perniciosa* colonize meristematic tissues decreasing the productivity and the lifetime of the host plant. Efforts have been expended to elucidate the molecular targets, such as beta(1,3)-D-glucan synthase, a glycosyltransferase that is essential for the cell wall construction, this enzyme catalyzes the formation of 1,3- β -D-glycans structural compounds. Bioinformatics methods are able to determine the structure of proteins without performing experimental steps, considering the barriers related to experimental methods for structure determination of molecular targets. Therefore, the objective of this study was determine the three-dimensional model of the enzyme beta(1,3)-D-glucan synthase of *M. perniciosa* by homology modeling and study the micelial growth inhibiting of the fungus by organics compounds and vegetal extracts with potential use in cocoa plantation. To build the models, was implemented both procedures: a comparative modeling by satisfaction of spatial restraints in MODELLER and a modeling by assembly of rigid bodies in the SWISS-MODEL software. Was obtained reasonable for beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme (BegS1), agree well with general structure from GT-2 enzyme family. In studies of fungal inhibiting growth, the MIC was considered one which there was 100% inhibition of mycelial growth. Extracts derived from *Lippia alnifolia* and the substance HQN showed promising results with MIC lowest values for *M. perniciosa* fungus.

Palavras-chave: Witches' Broom Disease, *Moniliophthora perniciosa*, homology modeling, beta(1,3)-D-glucan synthase, glycosyltransferase; fungal growth inhibition.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1 – SEQUENCIAS GENÔMICAS, AÇÃO CATALÍTICA E INIBIDORES DA BETA(1,3)-D-GLICANO SINTASE FUNGÍCA: UMA REVISÃO	23
INTRODUÇÃO	25
SEQUÊNCIA GENÔMICA DAS ENZIMAS BETA(1,3)-D-GLICANO SINTASES	28
ATIVIDADE CATALÍTICA DA ENZIMA BETA(1,3)-D-GLICANO SINTASE	31
INIBIDORES DA ENZIMA BETA(1,3)-D-GLICANO SINTASE	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 2 - HOMOLOGY MODELING STUDIES OF BETA(1,3)-D-GLUCAN SYNTHASE OF <i>MONILIOPTHORA PERNICIOSA</i>	49
INTRODUCTION	51
COMPUTATIONAL METHODOS	54
RESULTS AND DISCUSSION	57
CONCLUSION	68
REFERENCES	70
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>MONILIOPTHORA PERNICIOSA</i> POR COMPOSTOS ORGÂNICOS	74
INTRODUÇÃO	76
MATERIAIS E MÉTODOS	78
RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89
CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>MONILIOPTHORA PERNICIOSA</i> POR EXTRATOS DE <i>LIPPIA</i> E <i>HYPTIS</i>.	91
INTRODUÇÃO	93
MATERIAIS E MÉTODOS	95
RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	106

INTRODUÇÃO

O Cacao (*Theobroma cacao* L.) cresce principalmente nas regiões tropicais e é a terceira cultura agrícola mais importante do mundo, sendo superada apenas pela cultura dos chás e do café. A planta é uma espécie nativa das florestas tropicais úmidas, como as regiões do leste dos Andes e América do Sul. Esta cultura é o sustentáculo econômico de países como a República dos Camarões, Costa do Marfim e Gana (NAIR, 2010).

O cacau é cultivado principalmente para oferecer licor de cacau, manteiga e pó para a indústria de chocolate, não apenas por suas propriedades de sabor, mas também por conta dos benefícios para a saúde. O cacau é um produto importante, sendo que 20 milhões de pessoas dependem diretamente do cacau para a sua subsistência e cerca de 90% da produção - principalmente da Costa do Marfim, Gana e Indonésia - são exportados na forma de grãos ou de produtos semi-manufaturados de cacau para a Europa e os EUA (KRIS-ETHERTON; KEEN, 2002).

A Doença da Vassoura de Bruxa, causada pelo fungo basidiomiceto biotrófico *Moniliophthora perniciosa*, é uma das doenças mais importantes do cacau no hemisfério ocidental e causou reduções drásticas no rendimento das culturas em diferentes regiões produtoras do Brasil e outros países no continente americano. No início da década de oitenta, a produção anual de cacau na Bahia era de cerca de 400.000 toneladas, após a infecção pelo fungo, a produção regional caiu para 120.000 toneladas (CEITA et al., 2007).

Antes do advento da Doença da Vassoura de Bruxa, o Brasil tinha uma grande produção de cacau, principalmente na Bahia, primeiro estado produtor. Após a chegada da vassoura de bruxa, o Brasil mudou sua condição de país exportador para a condição de importador, resultando em complexos problemas para as regiões de produção, em termos sociais, econômicos e ecológicos. A Doença da Vassoura de Bruxa do cacau atinge todas as regiões cacauíferas da América do Sul (MEINHARDT et al. 2008).

Acredita-se que o fungo *Moniliophthora perniciosa* pode ter se originado e evoluído em plantas hospedeiras na bacia alta do Rio Amazonas, no lado oriental dos Andes (PURDY; SCHMIDT, 1996). A infecção pelo *Moniliophthora perniciosa* durante a ocorrência da Doença da Vassoura de Bruxa inicia-se com a produção de

basidiósporos oriundos do basidioma, que são caracteristicamente rosas e pequenos, estes, são formados em tecidos de plantas previamente infectadas, incluindo a casca e o tecido vegetativo infectado (MEINHARDT et al, 2008).

Os basidiósporos têm a capacidade de infectar todos os tecidos meristemáticos do cacauero inclusive brotos, flores e frutos jovens em desenvolvimento, principalmente em períodos noturnos sob alta umidade (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991; EVANS, 1980).

O fungo *M. pernicioso* coloniza os tecidos meristemáticos reduzindo a produtividade, bem como o tempo de vida da planta hospedeira. Este micro-organismo apresenta duas fases bem características: fase biotrófica (vassoura-verde, com micélio monocarióticos intercelulares) e fase saprofítica ou necrotrófica (vassoura seca, com micélios dicarióticos intracelulares) (RUBINI et al, 2005), conforme visualizado na Figura 1.

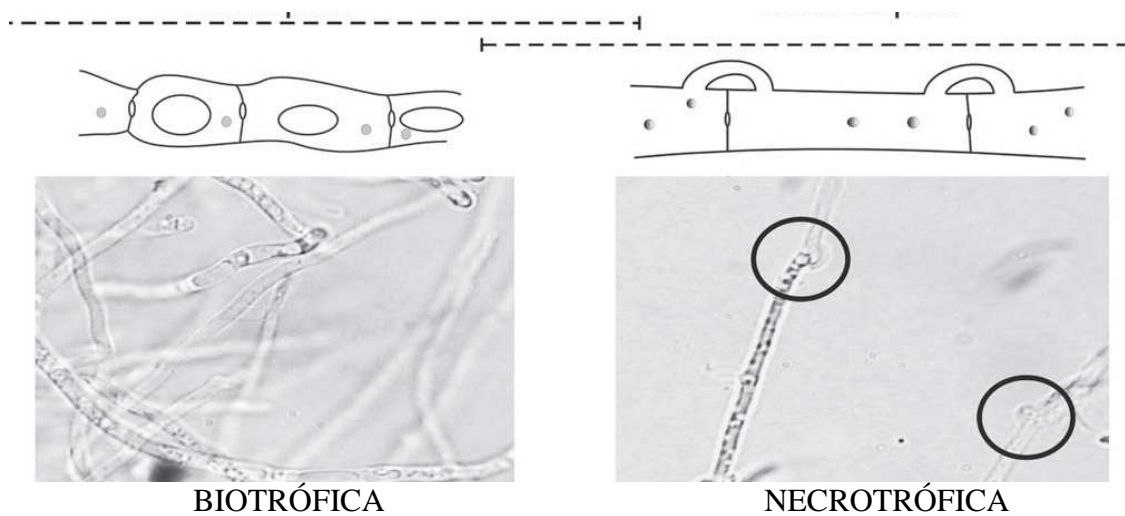


Figure 1: Fases biotrófica e necrotrófica do *M. pernicioso*.
Fonte: SCARPARI, 2005

No ciclo infeccioso da doença, a densidade do micélio fúngico presente no hospedeiro é muito baixa (ORCHARD; HARDWICK, 1988; PENMAN et al, 2000.) principalmente quando o fungo se encontra em fase de crescimento biotrófico (EVANS, 1980). Durante a fase biotrófica as células do micélio são geralmente uninucleadas, mas eventualmente podem existir células com mais de um núcleo

(GRIFFITH; HEDGER, 1994). Durante a fase biotrófica, ocorrem os seguintes sintomas: hipertrofia e hiperplasia dos tecidos distais ao local da infecção (HOLIDAY, 1980). Perda da dominância apical, superbrotamento de ramos auxiliares, e a formação anormal de uma estrutura de vassoura, chamada vassoura verde (MEINHARDT et al, 2008).

Durante a fase biotrófica, o tecido infectado parece estar sob estresse oxidativo intenso, indicado pelo aumento na peroxidação lipídica (SCARPARI et al. 2005) e pela eventual produção de espécies reativas de oxigênio (GRATÃO et al, 2005) como peróxido de hidrogênio, que é produzido na degradação enzimática de cristais de oxalato de cálcio encontrados em plantas de cacau infectadas (CEITA et al. 2007).

Um a dois meses após a infecção existe o desenvolvimento de alterações, com necrose e morte de tecidos distais ao tecido envolvido na infecção inicial, formando a estrutura chamada de vassoura seca, o fungo muda para a fase saprofítica ou também chamada necrofítica, com a propagação de micélios dicarióticos intracelulares (EVANS, 1980; LAWRENCE et al, 1991). Na fase inicial do desenvolvimento da vassoura seca, a densidade do fungo no interior do tecido vegetal é muito baixa, mostrando um aumento importante somente após a morte da vassoura (PENMAN et al, 2000). O momento exato da transição biotrófica/sapofítica, os mecanismos de sinalização e os fatores envolvidos nas alterações de desenvolvimento de ambos (plantas e fungo), permanecem desconhecidos, supõe-se que carboidratos específicos têm um papel-chave na transição entre a transição de fases (ROCHA; WHEELER, 1985; ORCHARD; HARDWICK, 1988; et al SCARPARI, 2005).

A biologia da interação Cacau e *M. pernicioso* é complexa e os estudos moleculares começaram recentemente, sendo nestes estudos observada a expressão gênica diferencial entre micélio biotrófico e saprofítico, indicando que o fungo biotrófico expressa uma série de proteínas relacionadas à patogenicidade (RINCONES, 2008).

No final do ciclo de vida do fungo o micélio torna-se um basidioma, estes produzem esporos que são potencialmente infectantes e capazes de finalizar o ciclo de vida do micro-organismo (EVANS 1980; LAWRENCE et al, 1991). A produção de basidiocarpos e a formação de esporos podem ocorrer em qualquer tecido

necrotrófico infectado, após a alternância de períodos secos e molhados (Figura 2) (ALMEIDA; CHIACCHIO; ROCHA, 1997).

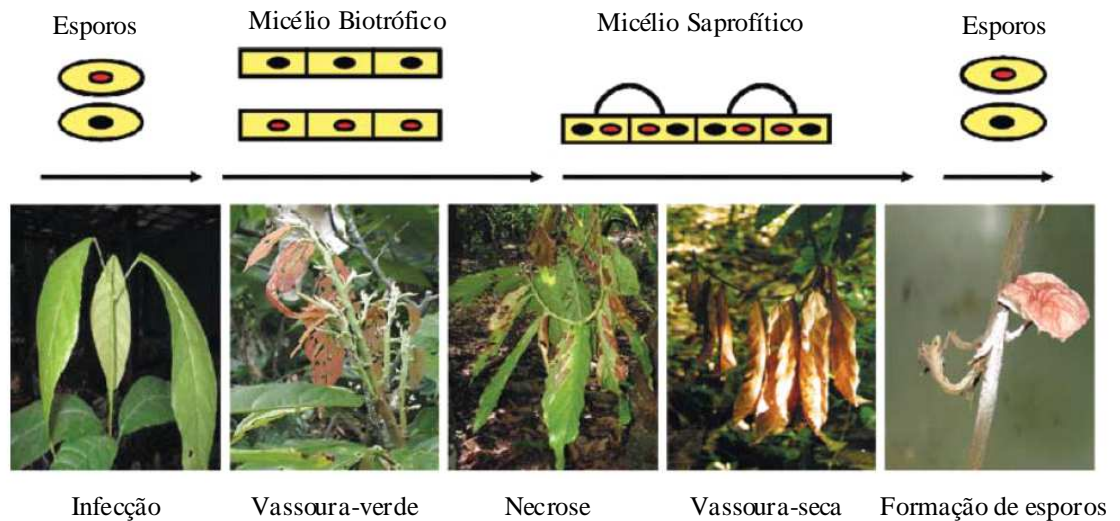


Figure 2: Ciclo de vida do *M. perniciosa*
Fonte: MEINHARDT, 2008

Tratando-se do controle desta doença, compostos químicos foram testados como fungicidas de contato (tópicos) com o objetivo de prevenir ou erradicar a Doença da Vassoura de Bruxa, porém não foram obtidos bons resultados, pelos seguintes motivos: rápido crescimento da superfície dos frutos durante os dois ou três meses de desenvolvimento do fungo, dificuldades no processo de aplicação do fungicida em grande frequência no alto das árvores (SOBERANIS et al., 2000).

Devido ao grande impacto sócio-econômico da Doença da Vassoura de Bruxa no Estado da Bahia, foi criado em 2000 um consórcio de instituições com o intuito de seqüenciar o genoma do *M. perniciosa*. Este projeto está estruturado com sete laboratórios na UESC, UEFS, UFBA, CEPLAC, EMBRAPA e UNICAMP, tendo como objetivo final, a elucidação dos alvos moleculares que podem levar ao desenvolvimento de várias estratégias para controlar a doença, através do seqüenciamento genético do fungo. Entre os vários alvos moleculares que podem ser estudados, as estruturas relacionadas ao processo de formação dos componentes da parede de fungos (carboidratos da parede celular, glicano e quitinas) podem revelar-se cruciais para o êxito do desenvolvimento de drogas antifúngicas (PIROVANI et al, 2005).

Desde 2001, o projeto genoma da Doença da Vassoura de Bruxa foi iniciado e a partir dos resultados obtidos vários artigos relacionados à patogenicidade e aos mecanismos de desenvolvimento de *M. pernicioso* foram publicados. A partir destes estudos foi possível elucidar parte das vias bioquímicas que caracterizam a interação entre o cacau e *M. pernicioso*, revelando que alterações metabólicas em plantas infectadas, incluindo o aumento do teor de malondialdeído e glicerol, a produção de etileno e oxalato. O oxalato de cálcio é um fator fitopatogênico que através da liberação de íons cálcio podem promover a ligação deste elemento à pectina e a outros polímeros, tornando as paredes das células mais acessíveis às pectinases fúngicas (SCARPARI et al. 2005).

Atualmente, os trabalhos publicados têm fornecido o sequenciamento de grande parte do genoma do *M. pernicioso*, agora existe o desafio de atribuir, investigar e modificar as funções das proteínas codificadas por esses genomas. Esta tarefa é geralmente facilitada por estruturas 3D de proteínas.

Avanços na compreensão dos detalhes estruturais dos principais componentes da parede celular de *M. pernicioso* resultaram na identificação de vários pontos potencialmente sensíveis ao ataque. No entanto, sabendo que enzimas específicas ao longo desta via metabólica ainda não são totalmente caracterizadas, o desenvolvimento de estratégias para a desestabilização da parede celular fúngica dependem do conhecimento destes sistemas biológicos, dentre estes a glicosiltransferase beta(1,3)-D-glicano sintase presente em *M. pernicioso* e outros fungos (KURTZ, REX, 2001).

Existem quatro principais componentes da parede celular do fungo: beta(1,3)-D-glicano, beta(1,6)-D-glicano, quitina e proteínas da parede celular. O beta(1,3)-D-glicano é o mais abundante e o responsável pela rigidez da parede celular (LIPKE; OVALLE, 1998).

A integridade das células depende de um envelope externo, a parede celular, cuja resistência mecânica, permite que as células suportem a pressão de turgor, além de lhes oferecer proteção contra condições ambientais extremas.

O beta(1,3)-D-glicano é um polímero estrutural importante da parede celular de leveduras e fungos filamentosos, e é sintetizado a partir da UDP-glicose pelo complexo enzimático multissubunidade beta(1,3)-D-glicano sintase. Esta enzima que é caracteristicamente uma enzima de membrana foi fracionada em duas subunidades, sendo uma caracterizada como componente solúvel no citoplasma e

componente ligado à membrana (ELEANOR, JAMES, 1980; RUBIO, MI; NAVARRO RODRIGUEZ-A; PARDO, JM 1994)

Na maioria dos fungos, os compostos que inibem a atividade da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase promovem a morte destes micro-organismos, além disso, deleções no genes que estão relacionados à síntese da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase, também são letais. Em conjunto, estes e outros resultados indicam que a síntese do beta(1,3)-D-glicano é essencial para o crescimento de fungos *in vitro* e *in vivo* (THOMPSON, 1999)

De acordo com informações relacionadas com a enzima beta(1,3)-D-glicano sintase e seu papel na formação da parede celular, existe grande motivação para a elaboração deste trabalho, que tem como objetivo realizar estudos de modelagem por homologia da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase de *Moniliophthora perniciosa*, bem como a obtenção de sua estrutura 3D da área contendo o motivo catalítico.

Nesse contexto, a determinação da estrutura tridimensional da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase compõe uma etapa bastante relevante para o entendimento das vias de biossíntese da parede celular fúngica e para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

A determinação da estrutura tridimensional de enzimas transmembrânicas, como a beta(1,3)-D-glicano sintase de *M. perniciosa* por métodos experimentais, tais como cristalografia de raios-X, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, é uma tarefa pouco exequível, tendo em vista os problemas relacionados ao isolamento e a purificação. Conseqüentemente, a modelagem por homologia torna-se uma ferramenta essencial para a caracterização estrutural de seqüências sem estruturas determinadas experimentalmente (PIEPER et al, 2009).

Na modelagem comparativa uma estrutura aproximada é garantida como conseqüência de um modelo tridimensional de uma proteína de interesse (alvo), construído a partir de um modelo de estrutura conhecida que compartilham similaridade de seqüência estatisticamente significativa (GINALSKI, 2005).

Compostos químicos da classe das equinocandinas são inibidores da biossíntese da parede celular, estes são eficazes contra patógenos como a *Candida albicans* e *Aspergillus fumigates* (CHANDRASEKAR; MANAVATHU, 2002). No entanto, o mecanismo de inibição das equinocandinas permanece não elucidado (PARK et al, 2005).

Diante deste contexto, este trabalho tem como objetivo geral: desenvolver estratégias para o controle do crescimento do fungo *M. perniciosus*. Os objetivos específicos são: realizar um levantamento bibliográfico das sequências genômicas, da ação catalítica e dos inibidores da beta(1,3)-D-glicano sintase; determinar a estrutura tridimensional da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase de *M. perniciosus* através da modelagem por homologia; avaliar a inibição do crescimento micelial de *M. perniciosus* por compostos orgânicos; avaliar a inibição do crescimento micelial de *M. perniciosus* por extratos de *Lippia* e *Hyptis*;

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA O.C; CHIACCHIO F.P.B; ROCHA H.M. Sobrevivência de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em vassouras secas de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) do estado da Bahia. **Agrotropica**. v. 9, n.4, p. 23–28. 1997.
- CEITA, G. de O.; MACÊDO, J. A.; SANTOS, T. B.; ALEMANN, L.; GESTEIRA, A. S.; MICHELI, F.; MARIANO, A. C.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. de M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pernicioso*. **Plant Science**. v.173, p.106-117, 2007.
- CHANDRASEKAR, P; MANAVATHU, E. Caspofungin. **Drugs of Today**. v. 38, n.12, p. 829. 2002.
- ELEANOR M. S, JAMES A.B et al. Biosynthesis of the Yeast Cell Wall. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 255, n. 3, p. 888-894, 1980.
- EVANS, H.C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** v. 74, n. 3. p. 515–526. 1980.
- FRIAS, G.A; PURDY, L.H; SCHMIDT, R.A. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cocoa. **Plant Dis**. v.20, n.75, p. 552–556. 1991.
- GINALSKI, K. Comparative modeling for protein structure prediction. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 16, n. 16, p. 172–177, 2005.
- GRIFFITH, G.W; HEDGER, J.N. Dual culture of *Crinipellis pernicioso* and potato callus. **Eur. J. Plant Pathol**. v. 100, n. 6, p. 371–379. 1994.
- HOLLIDAY, P. **Fungus Diseases of Tropical Crops**. Dover Pub. Inc: New York. 1980
- KRIS-ETHERTON P; KEEN C. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. **Current Opinion in Lipidology**. v. 13, p. 41–49. 2002
- KURTZ, M.B; REX, J.H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. In: RICHARDS F.M; EISENBERG, D.S; KIM, P.S (Org.). **Advances in protein chemistry: drug discovery and design**. Pennsylvania: Academic Press. v. 56, p. 424-475. 2001.
- LAWRENCE, J.S; CAMPÊLO, A.M.F.L; FIGUEIREDO, J.M. Enfermidades do cacauzeiro. II - Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. **Agrotropica**, v. 3, n.15, p. 1–14. 1991.
- LEVIN, D. E. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 69, n. 2, p. 262-291. 2005.

LIPKE, P.N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. **Journal of Bacteriology**. v.180, n.15, p. 3735-3740. 1998.

MEINHARDT, L.W. et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**. v. 9, n. 5, p. 577-588. 2008.

NAIR, K.P.P. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). **The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World**. London, v.12. n.10, p. 131-180, 2010.

ORCHARD, J.E; HARDWICK, K. **Photosynthesis, Carbohydrate Translocation and Metabolism of Host and Fungal Tissues in Cocoa Seedlings Infected with *Crinipellis Perniciosa***. Cocoa Producers Alliance: Lagos. 1988.

PARK, S et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida sp.* Isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.49(8): 3264-3273. 2005.

PENMAN, D; BRITTON, G; HARDWICK, K; COLLIN, H.A; ISAAC, S. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycol. Res**. v. 104, n. 6, p. 671–675. 2000.

PIEPER et al. MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. **Nucleic Acids Research**. v. 37, n.15, p. 347-354. 2009.

PIROVANI, C. P et al., Knowledge Discovery in genome database: the chitin metabolic pathway in *Crinipellis Perniciosa*. **Proceedings of International Symposium on Mathematical and Computational Biology**. 2005.

PURDY, L.H; SCHMIDT, R.A. Status of cacao Witches' broom: biology epidemiology and management. **Annu. Rev. Phytopathol**. 34, 573–594. 1996.

RINCONES, J. et al; Differential Gene Expression Between the Biotrophic-Like and Saprotrophic Mycelia of the Witches' Broom Pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **The American Phytopathological Society**. v. 21, n. 7, p. 891–908. 2008.

ROCHA, H.M; WHEELER, B.E.J. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease on cacao (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**. v. 34, n. 21, p. 319–328. 1985.

RUBINI, M.R et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**. v. (1): 24-33. 2005.

RUBIO, M.I; RODRIGUEZ-NAVARRO, A; PARDO, J.M. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269, n. 12, p.8792–8796, 1994

SCARPARI, L.M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany**. v. 56, n. 413, p. 865-877. 2005.

SOBERANIS, W. et al. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cocoa (*Theobroma cacao* L.) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protection**, v. 18, p. 667-685, 2000.

THOMPSON, J. R; et al. A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. **Journal of Bacteriology**. v.181, n. 2, p. 444-453, 1999.

CAPÍTULO 1¹

SEQUENCIAS GENÔMICAS, AÇÃO CATALÍTICA E INIBIDORES DA BETA(1,3)- D-GLICANO SINTASE FÚNGICA: UMA REVISÃO¹

¹ Artigo será submetido à Revista Sientibus – Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana.

SEQUENCIAS GENÔMICAS, AÇÃO CATALÍTICA E INIBIDORES DA BETA(1,3)-D-GLICANO SINTASE FUNGÍCA: UMA REVISÃO

Resumo

A beta(1,3)-D-glicano sintase é uma das enzimas responsáveis pela construção de componentes da parede celular fúngica e atua catalisando a transferência de moléculas de açúcar (UDP-glicose) para um receptor específico (o polímero beta(1,3)-D-glicano). A cadeia polimérica formada predominantemente por beta(1,3)-D-glicano é um dos principais componentes estruturais da parede celular. Existe um conjunto de genes homólogos (FKS/GSC/CPS) que codificam a subunidade essencial para atividade catalítica da beta(1,3)-D-glicano sintase em vários fungos, a ocorrência de mutações ou a ausência destes genes em células fúngicas resultam em anormalidades nos processos de remodelagem e síntese da parede celular. As equinocandinas e as papulacandinas são compostos inibidores da beta(1,3)-D-glicano sintase, esta ação também promove a destruição da parede celular. Estas substâncias têm sido usadas na terapia antifúngica, porém, o mecanismo pelo qual ocorre a inibição da enzima ainda não foi totalmente elucidado. Diante do atual processo de resistência aos antifúngicos, determinar o mecanismo da atividade enzimática a estrutura tridimensional da beta(1,3)-D-glicano sintase, são passos importantes no desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

Palavras-chave: enzima, beta(1,3)-D-glicano sintase, equinocandinas, antifúngico.

Abstract

The beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme is one of the enzymes responsible for building components from fungal cell wall and acts by catalyzing the transfer of sugar molecules (UDP-glucose) to a specific receptor (polymer beta(1,3)-D-glucan). The polymeric chain consisting mainly of beta(1,3)-D-glucan, it is a major structural constituents of cell wall. In several fungus, there is one set of homologous genes (FKS/GSC/CPS) that encode the subunit essential to catalytic activity of the beta(1,3)-D-glucan synthase, the occurrence of mutations or the absence of these genes in fungal cells, results in abnormality processes of the remodeling and cell wall biosynthesis. The echinocandins and papulacandinas compounds are inhibitors of beta(1,3)-D-glucan synthase, this action also promotes the destruction of the cell wall. These substances have been used on antifungal therapy; however, the mechanism through which it inhibits the enzyme has not been fully elucidated. In the current process of fungal resistance, mechanism of enzymatic activities the and the determination of three dimensional structure from beta(1,3)-D-glucan synthase, are important steps in the development of new antifungal agents.

Keywords: enzyme, beta(1,3)-D-glucan synthase, echinocandins, antifungal.

Introdução

A beta(1,3)-D-glicano sintase é uma enzima pertence à família das glicosiltransferases, especificamente a família das hexosiltransferases e possui EC de número 2.4.1.34, família de enzimas que agem catalisando a reação de transferência de unidades de monossacarídeos para uma molécula aceptora (polímero beta-glicano). Outros nomes comumente utilizados para denominá-la são: uridina difosfatoglucose-1,3-alfa-glucano glicosiltransferase e 1,3-alfa-D-glucano sintetase (Gonzalez et al, 2001).

Em fungos filamentosos e em leveduras, o polímero beta-glicano é sintetizado por um complexo multienzimático na membrana plasmática que requer UDP-glicose como substrato, para transferir monômeros de glicose para uma cadeia crescente de glicano com ligações β -1,3, conforme descrito na figura 1.

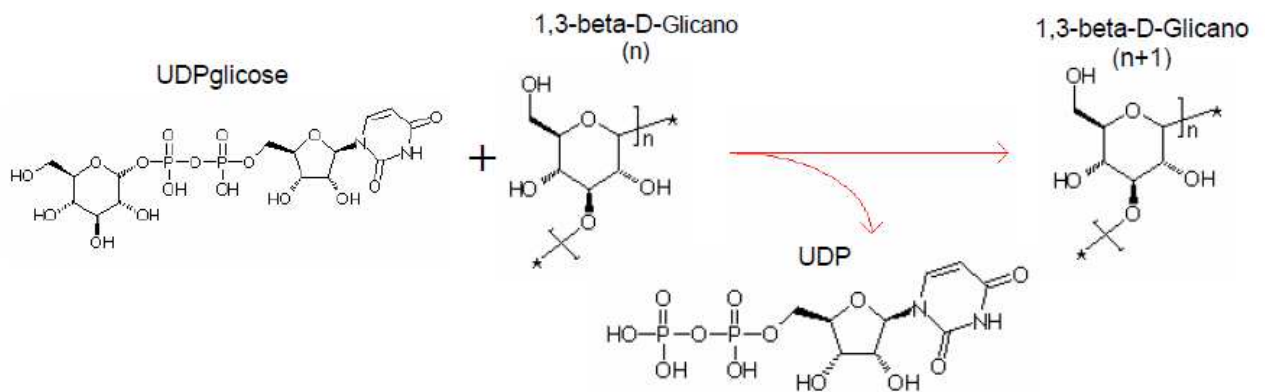


Figura 1: Síntese de beta(1,3)-D-glicano através da ação da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase. **Fonte:** Adaptado de Georgopapadakou; Tkacz, 1995.

A importância do estudo desta enzima se dá no motivo de que os substratos UDP glicose e $(1,3\text{-beta-D-glicano})_n$ transformados por ela em $(\text{beta}(1,3)\text{-D-glicano})_{n+1}$ fazem parte do processo de formação dos polissacarídeos da parede celular de fungos, formando cadeias com cerca de 60 a 80 unidades de glicose (Schomburg; Stephan, 1996). Este polímero formado é o polímero de carboidrato mais abundante da parede celular de fungos filamentosos e o maior responsável pela sua rigidez (Lipke; Ovalle, 1998).

A parede celular é essencial para a sobrevivência das células fúngicas. A falta de proteção osmótica decorrente da destruição da parede celular promove a lise

celular devido à presença da pressão interna de turgor. Assim, substâncias que interferem nas etapas da síntese da parede celular, são consideradas agentes antifúngicos potenciais (Cabib et al, 1988).

Estudos iniciais demonstraram que as células fúngicas destituídas de parede celular somente sobrevivem em condições de laboratório, onde o suporte osmótico previne a sua lise. Estes achados sugerem a parede celular com um importante alvo na busca de uma defesa efetiva, justificada por ela ser essencial para os fungos e por não estar presente em mamíferos. Conseqüentemente, as rotas biossintéticas das moléculas que a compõem são alvos importantes para o desenvolvimento de agentes inibidores do crescimento destes patógenos (Georgopapadakou; Tkacz, 1995).

A beta(1,3)-D-glicano sintase está localizada na porção interior da membrana celular, tendo sua atividade controlada por uma pequena subunidade derivada de uma família de genes de proteínas G chamada *Rho* que é ativada por GTP (Skipper, 1985).

As características da beta(1,3)-D-glicano sintase são extremamente variáveis nas diferentes espécies de fungos bem como em suas fases de desenvolvimento. Dessa forma, para o entendimento dos processos de morfogênese e crescimento celular, existe grande importância no estudo dos mecanismos de síntese destes polissacarídeos, de maneira a planejar fármacos antifúngicos específicos (Ruiz-Herrera, 1991).

A participação catalítica da beta(1,3)-D-glicano sintase na formação do principal polímero da parede celular e o desenvolvimento de novos antifúngicos inibidores desta enzima (Cabib et al, 1988), justificam a importância de um levantamento bibliográfico a respeito dos processos de catálise e inibição, bem como, o levantamento dos dados relacionados à sequências genéticas da enzima nos diversos micro-organismos.

A importância do estudo da beta(1,3)-D-glicano sintase é fundamentada no fato de que esta enzima é um dos alvos moleculares mais promissores no desenvolvimento de novos fármacos. Considerando-se ainda que, classes antifúngicas como azoles, triazoles e polienos são mais vulneráveis aos processos de resistência (Perlin, 2007).

Nesse contexto, esta revisão tem como objetivo reunir as informações relacionadas à enzima beta(1,3)-D-glicano sintase, tais como: sequências genômicas, ação catalítica, compostos inibidores.

Sequências genômicas das enzimas beta(1,3)-D-glicano sintases

A maioria das informações a respeito das sequências genômicas da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase foram obtidas a partir de estudos realizados em fungos (Inoue et al, 1996; Qadota et al, 1996). Várias linhas de evidência mostram que o gene *FKS* codifica uma subunidade essencial para atividade da fração protéica de membrana da beta(1,3)-D-glicano sintase (Mazur et al, 1995). O gene *FKS* responsável pela ação catalítica do complexo multi-enzimático beta(1,3)-D-glicano sintase foi identificado por diversos autores conforme tabela 1.

Tabela 1. Trabalhos de identificação de sequências genômicas de β -1,3-glicano sintases.

Micro-organismo/Fonte	Nomenclatura	Fonte
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>FKS1/FKS2</i> <i>ETGI</i>	(Douglas et al, 1994)
<i>Candida Albicans</i>	<i>CaFKS1/CaF</i> <i>KS2 GSC1</i> <i>GLS2</i>	(Mio et al, 1997)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Cps1+</i>	(Ishiguro et al, 1997)
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>FKSa</i>	(Kelly, 1996)

Tabela 1. Trabalhos de identificação de sequências genômicas de β -1,3-glicano sintases.

Micro-organismo/Fonte	Nomenclatura	Fonte
<i>Coccidioides posadassi</i>	<i>FKS1</i>	(Kellner et al, 2005)
<i>Neurospora crassa</i>	<i>FKS1</i>	(Himoler-O'rourke; Renault; Mo; Selitrennikoff, 2003)
<i>Fusarium solani</i>	<i>FSFKS1</i>	(Ha; Covert; Momany, 2006).
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>PBFKS1</i>	(Pereira, 2000)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>FKS1</i>	(Thompson, 1999)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>YIFKS1</i>	(Leon; Sentandreu; Zueco, 2002)
<i>Moniliophora perniciosa</i>	<i>Contig</i> <i>01/contig 06</i>	(Hora, 2006)
<i>Candida glabrata</i>	<i>Fks1p/Fks2p</i>	(Guillermo et al, 2009)
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>PbFKS1</i>	(Pereira et al, 2000)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>FKS1</i>	(Thompson et al, 1999)

O gene que codifica a possível subunidade catalítica de beta(1,3)-D-glicano sintase (FKS) foi identificado, utilizando-se distintas abordagens em diversos fungos, com alta similaridade entre as várias seqüências, o que sugere que os genes *fks/gsc* são bem conservados tanto em fungos filamentosos quanto em leveduriformes (Kelly et al, 1996). Todas as enzimas fúngicas FKS até agora examinadas têm sequências de aminoácidos altamente conservadas (Young-Sil; Covert; Momany, 2006).

A caracterização das sequências genéticas da beta(1,3)-D-glicano sintase revelou a codificação de uma proteína transmembranica relacionada aos processos de síntese da parede celular, onde, mutações induzidas nessas regiões genômicas, promoviam alteradas susceptibilidades à ação de inibidores da classe das equinocandinas (Douglas, 1994; Faucette et al, 1994). Também em *Fusarium solani* mutações específicas em *FKS1* promoveram resistência adquirida à equinocandinas (Katiyar; Edlind, 2009).

FKS1 foi identificado como um gene cujas mutações são responsáveis pela alteração da sensibilidade a diferentes inibidores da síntese da parede celular, ou seja, o gene alvo equinocandina, que confere resistência aos fármacos desta classe

(Douglas, 1994). A análise de sequência genética FKS1 de *Saccharomyces cerevisiae*, revelou uma enzima com topologia com dois grandes domínios hidrofóbicos transmembrânicos precedida por grandes domínios citoplasmáticos hidrofílicos (Douglas, 1994). A susceptibilidade do fungo *Saccharomyces cerevisiae* aos inibidores da beta(1,3)-D-glicano sintase tem sido utilizada para identificar e caracterizar os genes que participam nos processos de síntese da parede celular (El-Sherbini; Clemas, 1995).

Segundo Mazur et al (1995), foi observada atividade catalítica residual na beta(1,3)-D-glicano sintase em *Saccharomyces cerevisiae*, mesmo após ação mutagênica na sequência de nucleotídeos de FKS1, inferindo a possível natureza não essencial deste gene, a presença de outro gene homólogo o FKS2, com a capacidade de codificar enzima com atividade semelhante pode ser ativado quando não há expressão de FKS1. O gene FKS1 tem sua expressão predominante nas fases vegetativas de crescimento do fungo e é regulado pelo ciclo celular. Enquanto que FKS2 é expresso durante a esporulação ou em resposta a um sinal ambiental e nutricional específico (Kurtz; Rex, 2001). No entanto a deleção simultânea de FKS1 e FKS2 resulta em um fenótipo letal para a célula, indicando que a beta(1,3)-D-glicano sintase é essencial para a vida do fungo (Inoue et al, 1995).

Sabe-se também que em *Saccharomyces cerevisiae* a proteína Rho1-GTPase é uma subunidade regulatória que estimula a atividade do complexo enzimático beta(1,3)-D-glicano sintase. Esta proteína é produzida a partir da expressão do gene RHO1 elucidado em *Saccharomyces cerevisiae*. Mutações no gene RHO1 promoveram aumento da susceptibilidade dos fungos a equinocandinas, essa hipersensibilidade favoreceu o descobrimento da função moduladora da expressão do gene RHO1 nas funções de manutenção da parede celular através do estímulo à beta(1,3)-D-glicano sintase (Qadota et al, 1996).

Em *Shcizosaccharomyces pombe* o gene Cps1+ apresenta homologia a FKS1 e FKS2 de *Saccharomyces cerevisiae* que codificam a β -1,3-glucano sintase, mutações no referido gene apresentam como resultado modificações no processo de formação da parede celular (Ishiguro et al, 1997).

FKSa foi clonado a partir de *Aspergillus nidulans*, este gene apresentou 64% de identidade e 78% de similaridade a *FKS1* de *Saccharomyces cerevisiae*, mas nenhum gene homólogo adicional foi encontrado no micro-organismo, sendo o estudo do gene *FKSa* a principal via para o desenvolvimento de inibidores da

enzima. Em *A. nidulans*, o gene FKSa codifica uma proteína denominada (FKSAP) de 229 kDa, que apresenta alto grau de conservação em tamanho e identidade com as proteínas homólogas beta(1,3)-D-glicano sintases em *Saccharomyces cerevisiae*. (Kelly, 1996).

Os genes GS1 e GS2 de *Candida albicans* foram descritos por Mio et al (1997) apresentado cerca de 72% de identidade com as FKS de *Saccharomyces cerevisiae*. Em *Yarrowia lipolytica* a análise da expressão do gene YLFKS1 em diferentes condições não revelou discrepâncias relevantes, no entanto, YLFKS1 é muito importante para o crescimento celular, apresentando também grande homologia com as outras proteínas codificadas por FKS1 (Leon; Sentandreu; Zueco, 2002).

A reação da formação do beta(1,3)-D-glicano requer pelo menos dois componentes, sendo uma subunidade catalítica e outra regulatória (Ribas et al, 1991). Existem dois genes altamente similares, FSK1 e FSK2 que supostamente codificam as duas subunidades catalíticas, estes genes são diferentemente expressados dependendo do ciclo de vida e do crescimento celular do micro-organismo. A simples inativação de um dos genes é viável, no entanto, a disfunção ou inativação dos dois genes é letal para a célula (Mazur et al, 1995). A subunidade catalítica está localizada na porção interior da membrana celular, enquanto que a subunidade regulatória é solúvel e ativa a enzima na porção citoplasmática da célula (Cabib et al, 2001).

Atividade catalítica da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase

A síntese da parede celular é rigidamente regulada através de processos que estão intimamente associados ao crescimento celular e a morfogênese. Os glicanos são os maiores filamentos que compõem a estrutura da parede celular, perfazendo mais da metade do peso seco da parede, além disso, os glicanos são requeridos para o correto funcionamento da célula, deste modo, a regulação da síntese de glicanos é um passo essencial para a construção de uma célula fúngica funcional (Nogami; Ohya, 2009). Na figura 2, é possível visualizar a distribuição e a importância estrutura do polímero beta(1,3)-glicano através do uso de marcadores (anticorpos conjugados a partículas de ouro).

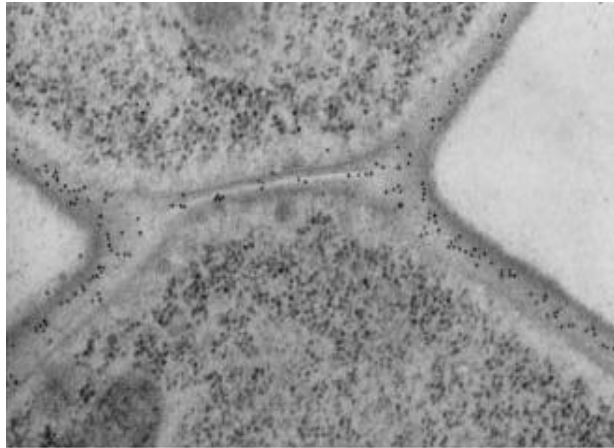


Figura 2: Localização do beta(1,3)-D-glicano através da formação de um complexo com o anticorpo conjugado a partículas de ouro **Fonte:** Nogami; Ohya, 2009.

A parede celular fúngica não é estática, na verdade, são estruturas que dinamicamente sofrem processos de remodelagem em resposta a vários estímulos endógenos e exógenos (MORRIS, 1986). A participação da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase é fundamental neste processo.

Considerando FKS1p é a forma predominante durante o crescimento vegetativo das células, FKS2p regula o ciclo celular, é expressa durante a esporulação ou em resposta a sinais ambientais ou nutricionais específicos. A inibição de FKS2 não afeta o crescimento vegetativo normal, mas pode prejudicar a esporulação. No entanto, a perda da atividade FKS1p apresenta consequências graves para a célula, uma vez que, esta deve contar com a atividade residual da proteína para o crescimento. A cepa duplamente inibida (FKS1p e FKS2p) não é viável, porque beta(1,3)-glicano não pode ser produzido (Kurtz; Rex, 2001).

Estudos iniciais realizados por Cabib e Shematek 1980 revelaram que o beta(1,3)-glicano é formado a partir UDP-glicose na presença de GTP. O estímulo do GTP e a necessidade da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase ligar-se a esta substância para viabilização da atividade catalítica é uma característica conservada nas glicano sintases que se estende a fungos filamentosos e leveduras (Kang; Cabib, 1986; Szaniszlo et al, 1985).

Ao se realizar análise enzimática das frações de membranas celulares fúngicas, foi observado que a atividade da beta(1,3)-D-glicano sintase pode ser separada por tratamento com detergentes e sais em duas frações, sugerindo que esta enzima consiste de pelo menos duas subunidades: uma subunidade catalítica ligada à membrana celular e uma subunidade regulatória ligada ao GTP (Kang;

Cabib, 1886; Szaniszlo et al, 1985). Contudo, purificação e identificação das subunidades enzimáticas se caracterizam por processos muito complexos (Nogami; Ohya, 2009).

Alguns estudos foram realizados com objetivo de solubilizar e purificar a enzima beta(1,3)-D-glicano sintase de vários fungos (Awald et al, 1993; Beauvais et al, 1993), mas, poucos obtiveram sucesso. O principal desafio relacionado a este processo está relacionado ao fato de que a enzima solubilizada se apresenta muito instável sob as condições usuais de purificação. Em decorrência destas dificuldades, detalhes do mecanismo de ação da formação do beta(1,3)-D-glicano (polímero) ainda não são totalmente conhecidos. Por exemplo, não se conhece como a UDP-Glicose acopla-se as unidades já formadas do polímero para enlogamento da cadeia, como o 1-3-beta glucano é transferido do citosol para fora da membrana celular ou como são ramificadas cadeias de 1-3-beta glucano a partir de 1-6-beta-glucano (Inoue et al, 1995).

Com o objetivo de estudar a subunidade catalítica da beta(1,3)-D-glicano sintase, Inoue et al (1995), conseguiram purificar a fração ligada à proteína plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* usando um procedimento especial chamado de aprisionamento de produto. Essa técnica, onde a purificação da enzima é baseada em sua afinidade com o seu próprio produto, foi aplicada na purificação da quitina sintase (Kang et al, 1984). Logo após, este procedimento foi aplicado na purificação da beta(1,3)-D-glicano sintase de várias espécies, incluindo *Neuspora crassa*, *Aspergillus nidulas*, *A. fumigatus*, *Candida albicans* e *S. cerevisiae* (Awald et al, 1994; Beauvais et al, 2001; Kelly et al, 1996, Mio et al, 1997).

Em trabalho realizado por Beauvais et al (2001) a enzima foi obtida através da tecnologia de DNA recombinante, no entanto a sua atividade não foi detectada, somente Tomazett et al (2010), obteve a porção catalítica da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase de *Paracoccidioides brasiliensis* (PbFks1pc) e adicionalmente realizarem ensaios de atividade.

Várias evidências indicam que as proteínas Fks1p e Fks2p codificadas a partir dos genes FKS1 e FKS2 são as subunidades catalíticas da beta(1,3)-D-glicano sintase, dentre estas evidências sabe-se que a atividade das enzimas é reduzida quando são adicionados anticorpos monoclonais específicos (Mazur et al, 1995). Relata-se também que a destruição do gene FKS1 resulta em diminuição da atividade *in vitro* da beta(1,3)-D-glicano sintase e conseqüentemente a formação do

beta(1,3)-glicano na célula (Douglas et al, 1994; Inoe et al, 1995). Podem existir ainda mutações direcionadas ao gene FKS1 que diminuem a atividade antifúngica das caspofunginas. No entanto, apesar de todas as evidências que relacionam o gene FKS com atividade da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase, o mecanismo de inibição desta enzima permanece pouco elucidado (Douglas et al, 1997; Kurtz et al, 1996).

Embora não haja conhecimento do *motif* que se liga à UDP-glicose, um dos domínios citoplasmáticos tem homologia com o gene *Bcsa* de *Acetobacter xylinium*, responsável pela codificação da subunidade catalítica da glicosiltransferase celulose sintase (Kurtz; Rex, 2001). Sabendo-se que, dentre as enzimas que compõem o grupo das glicosiltransferases existe uma grande homologia, acredita-se que esta estrutura da celulose sintase seja homóloga ao *motif* UDP-glicose da beta(1,3)-D-glicano sintase.

A proteína FKS1p (subunidade do complexo beta(1,3)-D-glicano sintase) é o alvo proposto para ação das equinocandinas, mutações no gene FKS1 podem alterar a forma ligação entre a proteína e o fármaco ou promover outro evento que comprometa o processo de inibição. Contudo, o mecanismo e a natureza da interação entre as equinocandinas e o complexo beta(1,3)-D-glicano sintase permanecem não elucidados (Edlind; Katiyar, 2004). Embora a atividade da Rho-GTPase esteja bem estabelecida como uma ativadora do complexo enzimático beta(1,3)-D-glicano sintase, os domínios críticos de interação entre as subunidades catalíticas e reguladoras, bem como as bases para ativação da Rho-GTPase continuam desconhecidas (Lesage; Bussey, 2006).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o complexo mecanismo de síntese de polímeros beta(1,3)-D-glicano ainda não é totalmente elucidado, de forma que a formação da parede celular do fungo é um processo complexo e integrado, onde os mecanismos de regulação são expressos em múltiplos níveis, dentre os quais podem ser observados no ciclo celular, na polaridade e crescimento das células, na adaptação às condições externas, na integridade da via da proteína quinase. A enzima Rho1 está no centro de muitas vias de sinalização e atua como um integrador de sinais (Lesage e Bussey 2006). Além da dificuldade de isolamento e purificação desta enzima.

Em *C. albicans* as regiões de FKSp entre os aminoácidos 641 e 648 contém a maioria das mutações que influenciam na atividade inibitória das caspofunginas,

incluindo o aminoácido serina de número 645, este já fora relatado em outros trabalhos como alterado em processos mutagênicos que levam à diminuição da susceptibilidade às equinocandinas (Park et al, 2005). Esta sequência de oito aminoácidos (641 a 648) faz parte de um domínio de 89 aminoácidos de FKS1p que, de acordo com os modelos de topologia, estão dispostos na porção citoplasmática da membrana. Este domínio citoplasmático tem sido proposto como local de ligação das equinocandinas no complexo enzimático beta(1,3)-D-glicano sintase (Douglas et al, 1997; Ma; Dixon, 1999). Segundo Douglas (2001), os resíduos identificados na região citoplasmática de FKS1 apresentam-se conservados em diversas espécies de fungos e leveduras, sugerindo que estes aminoácidos participam de um importante papel na interação com as drogas da classe das equinocandinas.

Em *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans* e *S. cerevisiae*, a proteína FKS1p é regulada pela proteína Rho-GTPase, a atividade desta enzima está envolvida por um processo de alternância entre um estado inativo (ligada ao GDP) e um estado ativo com mudanças conformacionais (ligada ao GTP) (Arellano; Duran; Perez, 1996; Guest; Lin; Momany, 2004).

A estrutura da parede celular da maioria dos fungos é composta por dois polissacarídeos, beta-glicanos e quitina, estes, apresentam-se ligados entre si através de ligações covalentes cruzadas, formando o esqueleto primário da parede celular, sendo esta estrutura responsável pela integridade e formato da célula (Latge, 2007).

A Figura 3 revela um modelo para a estrutura da parede celular de fungos com base em estudos genéticos e bioquímicos em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, exibindo também as proteínas e outros componentes da parede celular (Lipke e Ovalle, 1998). Conforme sugerido na Figura 3, estes componentes estão organizados em duas camadas, que podem ser visualizadas por microscopia eletrônica (Osumi, 1998).

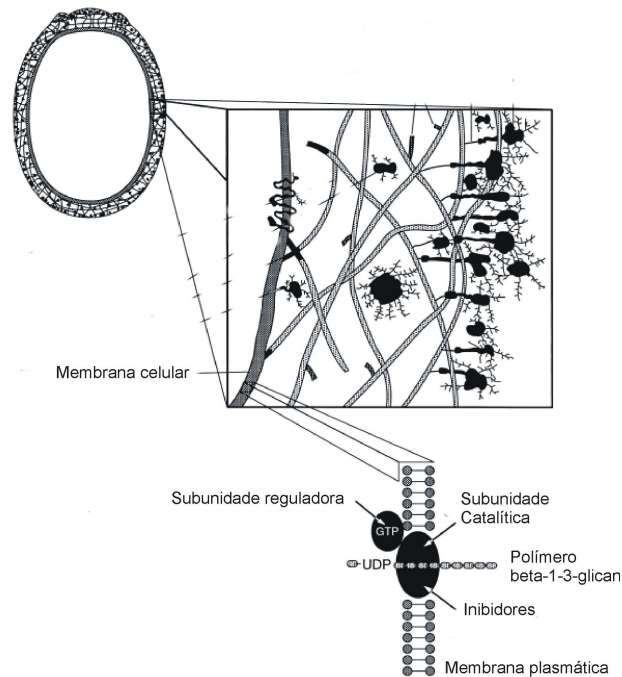


Figura 3: Componentes da parede celular fúngica **Fonte:** Kurtz, 1997.

Estudos bioquímicos revelam em *C. albicans* outros componentes associados à membrana celular, incluindo a enzima Pma1, esta apresenta estreita associação com o complexo glicano sintase (Schimoler-O'rourke et al., 2003). A enzima Pma1 apresenta atividade na manutenção do gradiente eletroquímico transmembrana (Monk; Perlin, 1994) que é importante para atividade da beta(1,3)-D-glicano sintase, pois, fornece a força motriz para a translocação do produto para o lado exterior da membrana, além de favorecer a manutenção de um ambiente ácido nas regiões proximais a membrana celular, onde as cadeias de polissacarídeos são constituídas (Perlin, 2007).

Inibidores da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase

Nos últimos anos, esforço considerável tem sido despendido na busca por inibidores potentes do complexo enzimático beta(1,3)-D-glicano sintase, de forma a interromper vias biossintéticas específicas relacionadas aos processos fisiológicos de síntese da parede celular fúngica. No entanto, este trabalho tem sido dificultado pela falta de informação precisa a respeito das enzimas que participam da síntese de glucanos (Danac et al, 2008).

A partir da década de 70, foram descobertos compostos derivados da fermentação de alguns fungos que apresentaram bons resultados de inibição da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase, dentre estes os lipopeptídeos referidos como equinocandinas e os glicolipídeos, chamados de papulocandinas. (Kurtz; Rex, 2001).

Equinocandinas são lipopeptídeos sinteticamente modificados e inibidores da beta(1,3)-D-glicano sintase, tendo sido identificados a partir da fermentação de vários fungos, dentre os quais *Aspergillus nidulans* (Cappelletty; Jung, 2009).

As equinocandinas foram os primeiros compostos do grupo dos lipopeptídeos descobertos, que apresentavam atividade inibitória para a enzima beta(1,3)-D-glicano sintase, que é a responsável pela biossíntese do maior biopolímero da parede celular fúngica (Kurtz; Douglas, 1997). Estes compostos são hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácidos graxos tendo como principais representantes: caspofungina, micafungina, anidulafungina (Denning, 2003). No entanto, a região catalítica e o mecanismo da inibição destas drogas ainda não foram descritos (Walker et al, 2010).

As equinocandinas produzem edema e lise celular nas áreas de crescimento da parede, além da ativação de genes relacionados à síntese de parede (Reinoso-Martin et al, 2003). Observações microscópicas revelam que as equinocandinas promovem crescimento anômalo das hifas com ramos curtos, espessos e ramificações desordenadas (Kurtz et al, 1996). Apesar das alterações na parede, as organelas internas permanecem inalteradas, além disso, não promovem sinais evidentes de dano ao conteúdo citosólico (Kurtz; Rex, 2001).

As equinocandinas apresentam largo espectro antifúngico com atividade contra os gêneros *Candida* e *Aspergillus*, não sendo registrada resistência cruzada aos agentes antifúngicos existentes, portanto eficazes contra fungos filamentosos e leveduras resistentes aos compostos azóis (Denning, 2003; Morrison, 2006).

As equinocandinas são fungicidas contra leveduras, mas, fungistáticas contra fungos filamentosos. Em fungos filamentosos, as equinocandinas bloqueiam as extremidades de crescimento das hifas (Bowman et al, 2002; Douglas, 2006). Estes fármacos são amplamente utilizados para terapia antifúngica contra fungos filamentosos e leveduras (Morris; Villmann, 2006; Bennett, 2006; Joseph; Jain; Danziger, 2007). Segundo Denning (2003) os gêneros *Zigomices*, *Cryptococcus*, *Neoformans* e *Fusarium* apresentam baixa sensibilidade à ação das equinocandinas.

Os melhores parâmetros metodológicos a serem utilizados para os testes de susceptibilidade *in vitro* das equinocandinas ainda estão em debate (ODDS et al, 2004; BARTIZAL; ODDS 2003). Mas, considerando as diferentes metodologias e resultados de susceptibilidade encontrados nos trabalhos acadêmicos, havia uma necessidade de padronização e paralelismo entre os dados encontrados. Desta forma, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), fundamentou em 2008, através de um procedimento padrão, os limites de susceptibilidade para equinocandinas, estabelecendo que, para fungos do gênero *Candida*, o limiar de CIM (Concentração Inibitória Mínima) é de 2ng/mL para os três principais fármacos da classe das equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (Clsi, 2008). Organismos com CIM acima de 2ng/mL são considerados não suscetíveis às equinocandinas.

A caspofungina, micafungina e a anidulafungina possuem uma cadeia lateral hidrofóbica que presumidamente interagem com a bicamada lipídica da membrana celular durante o processo de inibição do complexo beta(1,3)-D-glicano sintase (Denning, 2003), conforme visualizado na Figura 4.

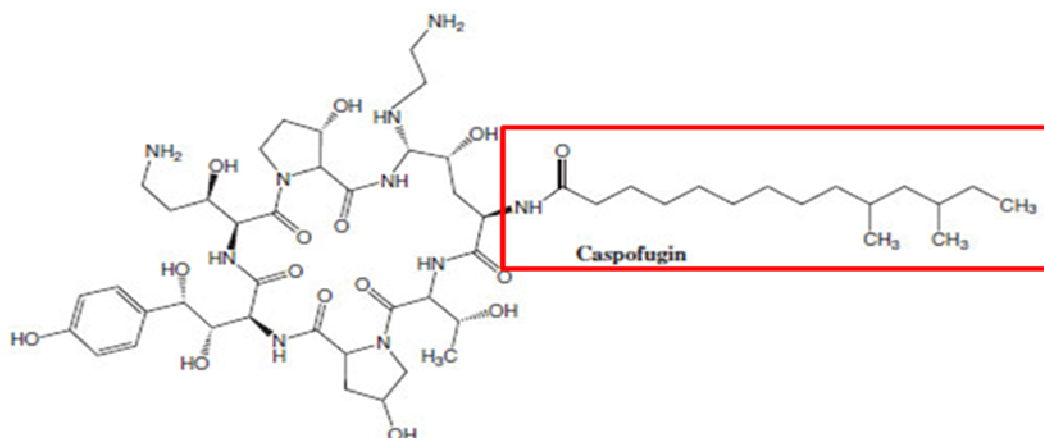


Figura 4: Estrutura da micafungina (destaque no quadrado vermelho a cadeia lateral)
Fonte: Denning, 2003.

Informações relacionadas aos requerimentos estruturais mínimos para atividade antifúngica dos inibidores da beta(1,3)-D-glicano sintase sugerem que modificações grupamento hemiaminal ácido, configuram-se como oportunidades para preparação de análogos adicionais (Balkovec; Black, 1992). Estudos de uma

série de derivados das equinocandinas revelaram que o aumento da lipofilicidade do grupamento hemiaminal ácido promove diminuição da atividade inibitória (Kurtz; Rex, 2001).

Sabe-se que as caspofunginas apresentam ação antifúngica de amplo espectro, com ação fungicida direcionada a uma variedade de fungos e leveduras, incluindo espécies dos gêneros de *Candida* e *Aspergillus*, bem como cepas de *Candida* resistentes aos triazoles (Pfaller et al, 2003; Park et al, 2005).

Apesar da atividade antifúngica relacionada às caspofunginas, existem relatos de reduzida susceptibilidade em *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* atribuídas às alterações no gene FKS1, que codifica um componente essencial do complexo enzimático da beta(1,3)-D-glicano sintase, que acertadamente é descrito como sítio de ação das equinocandinas (Douglas, 1994).

Tratando-se de resistência aos inibidores da beta(1,3)-D-glicano sintase, Rocha et al (2007) afirmam que substituições na posição 678 do aminoácido prolina da proteína FKS1p (integrante do complexo beta(1,3)-D-glicano sintase) promovem resistência à equinocandinas em *Aspergillus fumigatus* e *Candida spp*, revelando ainda que esta modificação se mantém conservada em fungos patogênicos resistentes ao tratamento com drogas desta classe.

Foi relatado também, que a resistência aos fármacos antifúngicos da classe da equinocandinas está associada a mutações em duas regiões altamente conservadas do gene FKS1, conhecidas como *hot spot 1* e *hot spot 2* (Perlin, 2007; Katiyar, 2006). A ocorrência de polimorfismo em regiões altamente conservadas de *hot spot 1* do gene FKS1 de *Candida parapsilosis*, em detrimento ao baixo polimorfismo nas outras espécies de *Candida*, tem sido motivo para reduzida susceptibilidade de *C. parapsilosis* à classe das equinocandinas (Perlin, 2007). Este fato foi comprovado em pesquisa, onde, novamente foi evidenciado que mudanças em aminoácidos naturais da região hot spot 1 do gene FKS1 em não apenas em *C. parapsilosis*, mas também em *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, diminuem a susceptibilidade destes micro-organismos à classe das equinocandinas (Garcia-Effron et al, 2008).

Mutações em FKS1 resultam em CIM (Concentração Inibitória Mínima) de valores elevados, pois, reduz a interação da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase com as equinocandinas em centenas de vezes. O mecanismo bioquímico da diminuição da interação entre o fármaco e o complexo enzimático ainda não é compreendido (Kartsonis et al, 2005). Com relação aos resultados de CIM destes mutantes, foi

possível observar espécies de *Candida* que apresentaram CIM de 4mg/mL para a caspofungina (Park, 2005). Valor superior ao limite de 2mg/mL estabelecido pela CLSI com limiar susceptibilidade. A Tabela 2 relaciona os valores de CIM encontrados em cada estudo:

Tabela 2. Cepas do Gênero *Candida* resistentes à micafungina segundo o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Micro-organismo	CIM (mg/mL)	Fonte
<i>C. albicans</i>	4	(Park et al, 2005)
<i>C. parapsilosis</i>	2.24	(Garcia-Effron et al, 2008)
<i>C. albicans</i>	>8	(Perlin, 2007)
<i>C. krusei</i>	8	(Kahn et al, 2007)

Acredita-se que o processo de resistência possa ser explicado também pelo entendimento das vias biossintéticas de produção dos componentes da parede celular, a parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica e o impedimento da síntese de um componente celular desta estrutura pode levar a um aumento compensatório da produção de outro. Por conseguinte, a inibição da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase pelas equinocandinas leva a um aumento compensatório da síntese de quitina (Walker et al, 2008). Esta ativação da síntese de quitina mediada pela proteína quinase é capaz de reduzir a susceptibilidade às caspofunginas em *C. albicans* e *A. fumigatus* (Walker et al, 2008). Similarmente mutações que promovem o aumento da produção de quitina promovem a diminuição da susceptibilidade de *C. albicans* à caspofunginas (Plaine et al, 2008).

Além das equinocandinas, outras abordagens têm sido desenvolvidas no intuito de inibir a formação do beta(1,3)-D-glicano. Uma destas, parte do pressuposto que, derivados de carboidratos (semelhantes ao substrato UDP-glicose), que foram modificados no grupo hidroxila, incorporados durante o crescimento da cadeia, poderiam precipitar o processo de encerramento da formação da cadeia de beta(1,3)-D-glicano (Danac et al, 2008), esta é uma estratégia ainda pouco difundida no desenvolvimento de inibidores do crescimento fúngico, tendo em vista que, ainda não existe nenhuma classe antifúngica no mercado que atue através deste mecanismo de ação, no entanto, com base nos estudo de Goody et al (1991) o

mecanismo de encerramento de cadeia polipeptídica pode ser utilizado no planejamento de anti-retrovirais, onde a destruição do micro-organismo acontece pela utilização de um substrato modificado (base nitrogenada) que induz ao encerramento da formação da cadeia do DNA.

Utilizados como inibidores do crescimento fúngico, os finalizadores de cadeia são desta forma, resíduos de D-glicose, onde o grupamento 3'-OH é modificado. Se estes compostos são processados pelo complexo enzimático beta(1,3)-D-glicano sintase, então a transferência destas unidades monoméricas para o término de uma cadeia de glicano crescente, resultará em um passo de finalização da cadeia, a qual seria somada unidades subsequentes, este processo promove a formação de polímeros incapazes de exercer funções estruturais na parede celular (Danac et al, 2008).

Apesar dos resultados satisfatórios de inibição do complexo enzimático beta(1,3)-D-glicano sintase *in vitro* pelos finalizadores de cadeia, estudo realizado por Danac et al (2008), que fez uso do ensaio sobre a germinação de esporos do fungo *Trichophyton rubrum*, revelaram atividade antifúngica pouco significativa. Acredita-se que estes resultados são explicados através das características físico-químicas destes fármacos, tendo em vista que, os finalizadores de cadeia são compostos hidrofílicos (resíduos de glicose com modificações no grupamento 3'-OH) e não atravessam facilmente a barreira celular.

Frequentemente, outros inibidores do complexo enzimático beta(1,3)-D-glicano sintase tem sido estudados, recentemente foi descoberto que o ácido caféico e os seus derivados apresentaram ação antifúngica decorrente da inibição da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase, esta descoberta pode oportunizar o surgimento compostos químicos análogos com potencial antifúngico (Ma et al, 2010).

Considerações finais

Com base nos estudos realizados a respeito da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase fúngica, pode-se concluir que esta se apresenta como um alvo molecular promissor para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos. Sabendo-se que, o produto desta enzima (beta(1,3)-glicano) é um dos principais componentes da parede celular fúngica e que este sistema enzimático não está presente em células de mamíferos.

O sequenciamento da beta(1,3)-D-glicano sintase foi elucidado em diversas espécies de fungos, mas a estrutura tridimensional desta enzima ainda não foi descoberta, atribui-se a este fato as dificuldades no processo de purificação (proteína transmembrana) e cristalização desta enzima. Este tipo de problema é bastante comum no campo da biologia molecular, onde frequentemente as seqüências de aminoácidos (estruturas primárias) são elucidadas e no entanto, pouco se conhece a respeito de suas respectivas estruturas.

É possível compreender também que o processo de síntese da parede celular e conseqüentemente a atividade enzimática da beta(1,3)-D-glicano sintase, se apresentam relacionados a diversos processos morfofisiológicos em diferentes espécies fúngicas, dessa forma, o entendimento das etapas de regulação através de proteínas, tais como a proteína *Rho* em *A. nidulans* e *S. cerevisiae* e a proteína *Pma1* em *C. albicans*, são de fundamental importância para o surgimento e aperfeiçoamento das abordagens de contenção do crescimento fúngico através do metabolismo de formação da parede celular.

Diante do crescente processo de resistência de algumas espécies de *Candida* e *Aspergillus* às equinocandinas ressalta-se a importância do estudo de novos fármacos que apresentem ação farmacológica inibitória da beta(1,3)-D-glicano sintase, sendo a determinação da sua atividade enzimática e da estrutura tridimensional uma contribuição relevante para estes estudos.

REFERÊNCIAS

- ARELLANO, M; DURAN, A; PEREZ, P. Rho 1 GTPase activates the (1 \rightarrow 3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. **Embo. Journal.** v. 15, p. 4584-4591. 1996.
- AWALD, P et al. Beta-1,3-D-glucan synthase activity of *Neurospora crassa*: identification of substrate-binding protein. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1201, p. 312-320. 1994.
- AWALD, P et al. Purification of 1,3-B-glucan synthase from *Neurospora crassa* by product entrapment. **Exp. Mycol.** v. 17, n. 2, p. 130-14. 1993
- BALKOVEC, J. M; BLACK, R. M. Reduction Studies of Antifungal Echinocandin Lipopeptides: One Step Conversion of Echinocandin B to Echinocandin C. **Tetrahedron Lett.** v. 33, p. 4529-32. 1992.
- BARTIZAL, C; ODDS F.C. Influences of methodological variables on susceptibility testing of caspofungin against *Candida* species and *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47, p. 2100–7. 2003.
- BEAUVAIS, A et al. Characterization of the 1,3-B-glucan synthase of *Aspergillus fumigatus*. **Journal. Gen. Microbiology.** v. 139, n. 1, p. 3071-3078. 1993.
- BEAUVAIS, A et al. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. **Jornal of Bacteriology.** v. 183, p. 2273-2279. 2001.
- BENNETT, J.E. Echinocandins for candidemia in adults without neutropenia. **N. Engl. J. Med.** v. 355, p. 1154–1159. 2006.
- BOWMAN, J.C et al. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, p. 3001–3012. 2002.
- CABIB E; BOWERS B; SBURLATI A; SILVERMAN S.J. Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. **Microbiol. Sci.** v. 5, n. 12, p. 370-375. 1988.
- CABIB, E; KANG, M. S. Fungal 1,3-beta-glucan synthase. **Methods Enzymol.** v.138, p. 637–642. 1987.
- CAPPELLETTY, D. M; JUNG, R. Anidulafungin and its role in candida infections. **Infection and Drug Resistance.** v. 2, p. 51-60. 2009.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard. 3. ed. Wayne, 2008.

DANAC, R et al. Synthesis of UDP-glucose derivatives modified at the 3-OH as potential chain terminators of b-glucan biosynthesis. **Carbohydrate Research**. v. 343, p. 1012–1022. 2008.

DENNING D.W. Echinocandin antifungal drugs. **The Journal-lancet**. v. 362, n. 9390, p. 1142-1151. 2003.

DOUGLAS, C. M et al. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3-beta-D-glucan synthase. **J. Bacteriol**. v. 176, n. 18, p.5686-5696. 1994.

DOUGLAS, C. M et al. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 41, p. 2471–2479. 1997.

DOUGLAS, C. M et al. The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 91, n. 12, p.12907-12911. 1994.

DOUGLAS, C. M. Fungal beta-(1,3)-D-glucan synthesis. **Med. Mycol**. v. 39, p. 55–66. 2001

DOUGLAS, C.M. Understanding the microbiology of the *Aspergillus* cell wall and the efficacy of caspofungin. **Med. Mycol**. v. 44. p. 95–99. 2006.

EDLIND, T. D; KATIYAR, S. K. The echinocandin “target” identified by cross-linking is a homolog of Pil1 and Lsp1, sphingolipid-dependent regulators of cell wall integrity signaling. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 48, p. 4491. 2004.

EL-SHERBINI, M; CLEMAS, J. A. Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 39, p. 200-207. 1995.

FAUCETTE, E.W.K et al. The yeast FKS gene encodes a novel membrane protein, mutations in which confer FK50 and cyclosporin A hypersensitivity and calcineurin dependent growth. **Genetics**. v. 151, p. 61-71. 1994.

GARCIA-EFFRON, G. et al. A Naturally Occurring Proline-to-Alanine Amino Acid Change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* Accounts for Reduced Echinocandin Susceptibility. **Anti. Agent. And Chem**. v. 52, n. 7, p. 2305-2312. 2008.

GEORGOPAPADAKOU, N. H., TKACZ, J. S. The fungal cell wall as a drug target. **Tren. Microbiol**. v. 3, n. 3, p. 98-104, 1995.

GONZALEZ GM, TIJERINA R, NAJVAR LK et al. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis* in vitro and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 45, n. 6, p. 1854-1859, 2001.

- GOODY, R.S; MÜLLER B; RESTLE, T. Factors contributing to the inhibition of HIV reverse transcriptase by chain-terminating nucleotides in vitro and in vivo. **FEBS Lett.** v. 291, n. 7, p. 1–5. 1991.
- GUEST, G.M; LIN, X; MOMANY, M. *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. **Fungal Genetics Biology.** v. 41, p. 13-22. 2004.
- GUILLERMO, et al. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 Mutations on Echinocandin Sensitivity and Kinetics of beta(1,3)-D-glucan synthase: Implication for the Existing Susceptibility Breakpoint. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 53, n. 9, p. 3690-3699. 2009.
- HA, Y.S; COVERT, S.F; MOMANY, M. FsFKS1, the 1,3-beta-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. **Eukaryot. Cell.** v. 5, n. 7, p. 1036-1042. 2006.
- HORA JR, B.T. **Caracterização, clonagem e análise de expressão do gene beta-1,3-glicano sintase de *Crinipellis pernicioso*, o fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauero.** 2006. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, Feira de Santana, 2006.
- INOUE, S.B et al. Characterization and gene cloning of 1,3-b-d-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. **European Journal of Chemistry.** v. 231, n. 3, p. 845-854. 1995.
- INOUE, S.B et al. Signaling toward yeast 1,3-beta-glucan synthesis. **Cell Struct Funct.** v. 21, n. 5, p. 395-402. 1996.
- ISHIGURO, J et al. *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS gene whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. **J. Bacteriol.** v.179, p. 7653-7662.1997.
- ISHIGURO, J. Cps1+, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporine A an papulacandin B. **J. Bacteriol.** v. 179, p.7653-7662. 1997
- JOSEPH, J.M; JAIN, R; DANZIGER, L.H. Micafungin: a new echinocandin antifungal. **Pharmacotherapy.** v. 1, p. 53–67. 2007.
- KAHN, J.N et al. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. **Antimicrob Agents Chemother.** v.51, n. 5, p. 1876-1878. 2007.
- KANG, M et al. Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. **J. of Biological Chemistry.** v. 259, p. 14966-14972. 1984.

KANG, M. S; CABIB, E. Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of beta-1,3-D-glucan synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 83, p. 5808-5812. 1986.

KARTSONIS, N et al. Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 49, p. 3616-3623. 2005.

KATIYAR, S.K; EDLIND T.D. Role for Fks1 in the Intrinsic Echinocandin Resistance of *Fusarium solani* as Evidenced by Hybrid Expression in *Saccharomyces cerevisia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n.5, p. 1772-1778. 2009.

KATIYAR, S; PFALLER, M. EDLIND, T. *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 50, p. 2892–2894. 2006.

KELLNER E.M et al. *Coccidioides posadasii* contains a single 1,3-beta-glucan synthase gene that appears to be essential for growth. **Eukaryot. Cell**. v. 4, n. 1, p. 111-120. 2005.

KELLY, R et al. Isolation of a gene involved in 1,3-beta-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. **J. Bacteriol**. v. 178, p. 4381-439. 1996.

KELLY, R., REGISTER, E., HSU, M. J., KURTZ, M. B., AND NIELSEN J. B. Isolation of a gene involved in 1,3-β-glucan synthase in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. **J. Bacteriol**. v. 178, n. 15, p. 4381-4391. 1996.
KURTZ M.B; DOUGLAS C.M. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. **Journal of Medicine Veterinary and Mycology**. v. 35, n. 2, p. 79-86. 1997.

KURTZ, M. B et al. Characterization of echinocandin- resistant mutants of *Candida albicans*: genetic, biochemical, and virulence studies. **Infect. Immun**. v. 64, p. 3244–3251. 1996.

KURTZ, M.B; REX, J.H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. In: RICHARDS F.M; EISENBERG, D.S; KIM, P.S (Org.). **Advances in protein chemistry: drug discovery and design**. Pennsylvania: Academic Press. v. 56, p. 424-475. 2001.

LATGE, J.P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. **Mol. Microbiol**. v. 66, p. 279–290. 2007.

LEON, M; SENTANDREU, R; ZUECO, J. A single FKS homologue in *Yarrowia lipolytica* is essential for viability. **Yeast**. v.19, p. 1003-1014. 2002.

LESAGE, G; BUSSEY, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 70, n. 2, p. 317-343. 2006.

LIPKE, P.N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. **Journal of Bacteriology**. v.180 n.15, p. 3735-3740, 1998.

MA, C.M et al. Synthesis, anti-fungal and 1,3-b-D-glucan synthase inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 7009-7014. 2010.

MA, D; DIXON, C. Echinocandin binding domain of 1.3-beta-glucan synthase. **European patent application**. 98310497.7. 1999.

MAZUR, P et al. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. **Mol. Cell. Biol.** v. 15, n. 10, p. 5671-5681. 1995.

MIO, T et al. Cloning of *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 and its involvement in beta-1-3-glucan synthesis. **J. Bacteriol.** v. 179, p.4096-4105. 1997.

MONK, B.C; PERLIN, D.S. Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 20, n. 3, p. 209-223. 1994.

MORRIS, G.J et al. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. v. 132, p. 2023-2034. 1986.

MORRIS, M.I; VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. **Am. J. Health Syst. Pharm.** v. 63, p. 1693–1703. 2006.

MORRISON, V.A. Echinocandin antifungals: review and update. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** v. 4, p. 325–342. 2006.

NOGAMI, S; OHYA, Y. Biosynthetic Enzymes for (1-3)-beta-glucans, (1-3;1-6)-beta-glucans from yeast: Biochemical properties and molecular biology. In: BACIC, A; FINCHER, G.B; STONE, B.A (Orgs.). **Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides**. London: Academic Press, 2009. p. 259-354.

ODDS, F.C et al. Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* species. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p.3475–3482. 2004.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. **Micron**. v. 29, n. 3, p. 207-233. 1998.

PARK, S et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 49, n.8, p. 3264-3273. 2005.

PEREIRA, M et al. Molecular cloning and characterization of a glucan synthase gene from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Yeast**. v. 16, p. 451-462. 2000.

PERLIN, D.S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resist. Updat.** v. 10, n. 3, p. 121-130. 2007.

- PFALLER, M. A et al. In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida spp* and fluconazole-resistant isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47. n. 3, p. 1047-1068. 2003.
- PLAINE, A et al. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. **Fungal. Genet. Biol.** v. 45, p. 1404–1414. 2008.
- QADOTA, H et al. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. **Science.** v. 272, n. 5259, p. 279-281. 1998.
- REINOSO-MARTIN, C et al. The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slr2p mitogen-activated protein kinase signaling. **Eukaryot. Cell.** v. 2, p. 1200-1210. 2003.
- RIBAS, J. C.; DÍAZ; M.; DURÁN, A; PÉREZ, P. Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3)-b-D-glucan. **Journal of Bacteriology.** v. 173, n. 11, p. 3456-3462, 1991.
- ROCHA, E.M.F et al. A Ser678Pro Substitution in Fks1p Confers Resistance to Echinocandin Drugs in *Aspergillus fumigates*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 10, p. 1128-1132. 2007.
- RUIZ-HERRERA, J. Biosynthesis of beta-glucans in fungi. **Pharmacol. Ther.** v. 2, n. 60, p. 337-345. 1991.
- SCHIMOLER-O'ROURKE et al. *Neurospora crassa* FKS protein binds to the (1,3)beta-glucan synthase substrate, UDP-glucose. **Curr. Microbiol.** v. 46, n. 6, p. 408-412. 2003.
- SCHOMBURG, D; STEPHAN, D. **Enzymes handbook.** New York: Springer, 1996. p. 335.
- SHEMATEEK. ,M; CABIB, E. Biosynthesis of the yeast cell wall. Regulation of p-(1 +3) glucan synthetase by ATP and GTP. **Journal of Biological Chemistry.** v. 255, p. 895-902. 1980
- SHIMOLER-O'ROURKE, R; RENAULT, S; MO, W; SELITRENNIKOFF, C.P. *Neurospora crassa* FKS protein binds to the (1,3) beta-glucan synthase substrate. UDP-glucose. **Curr. Microbiol.** v. 46, n.6, p.408-412. 2003.
- SKIPPER, N et al. Secretion of a Bacterial Cellulase by Yeast. **Science.** v. 230, n. 4728, p. 958-960.
- SZANISZLO, P.J; KANG M.S; CABIB, E. Stimulation beta-1,3-D-glucan synthetase of various fungi by nucleotide triphosphates: generalized regulatory mechanism for cell wall biosynthesis. **J. Bacteriol.** v. 161, p.1188-1194. 1985.

THOMPSON, J.R et al. A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* in sigle copy and encodes an essential function. **J. Bacteriol.** v. 2. n. 1, p. 444-453. 1999.

TOMAZETT, P.K et al. 1,3-b-D-Glucan synthase of *Paracoccidioides brasiliensis*: recombinant protein, expression and cytolocalization in the yeast and mycelium phases. **BMS.** v. 114, p. 809-816. 2010.

WALKER L.A et al. Fungal echinocandin resistance. **Fungal Genetics and Biology.** v. 47, p. 117-126. 2010.

WALKER L.A et al. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. **PLos. Pathog.** v. 4, p. 1000-1040. 2008.

YOUNG-SIL, H; COVERT, S.F; MOMANY. M. FsFKS1, the 1,3- β -Glucan Synthase from the Caspofungin-Resistant Fungus *Fusarium solani*. **American Society for Microbiology.** v. 5, n. 7, p. 1036-1042. 2006.

CAPÍTULO 2²

HOMOLOGY MODELING STUDIES OF BETA(1,3)-D-GLUCAN SYNTHASE OF *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA*²

² Artigo será submetido à Revista Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

HOMOLOGY MODELING STUDIES OF BETA(1,3)-D-GLUCAN SYNTHASE OF *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA*

ABSTRACT

The Witches' Broom Disease, caused by the hemibiotrophic basidiomycete fungus *Moniliophthora perniciosa*, drastically reduced the production of cocoa in Brazil. The *M. perniciosa* colonize meristematic tissues decreasing the productivity and the lifetime of the host plant. Phytosanitation, chemical control, genetic resistance strains and biological control, still has flaws in disease eradication process. Effort has been expended in the elucidation of molecular targets, in particular the structural components of fungal cell wall, like the beta(1,3)-D-glucan synthase. This enzyme is essential for the wall cellular construction, which catalyzes the beta(1,3)-D-glucans formation. Protein structure homology modeling approach are able to determine the structure of proteins without performing experimental steps, considering the barriers related to experimental methods for structure determination of molecular targets. The presence of the conserved catalytic residues in members of the same glycosyltransferase family and overall structural analyze suggests that they catalyze glycosyl transfer reactions by similar mechanisms. Therefore, the objective of this study was determine the three-dimensional model of the enzyme beta(1,3)-D-glucan synthase of *M. perniciosa* by homology modeling. Two procedures were performed for build the models: a comparative modeling by satisfaction of spatial restraints in MODELLER and a modeling by assembly of rigid bodies in the SWISS-MODEL software. The models were elected based on analysis of the stereochemistry quality and a quantitative assessment of similarity from the obtained models and to templates. Was obtained reasonable structural model of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme (BegS1), this model agree well with general structure from GT-2 enzyme family.

Keywords: Witches' Broom Disease, *Moniliophthora perniciosa*, homology modeling, beta(1,3)-D-glucan synthase, glycosyltransferase.

1. Introduction

The culture of *Theobroma cacao* L. (Cocoa) has great economic importance. This plant is cultivated for more than two million farmers in over 50 countries.¹ *Moniliophthora perniciosa*; the causal agent of Witches' Broom Disease (WBD) in cacao is a hemibiotrophic basidiomycete fungus² The plant pathogenic represents one of the most devastating diseases of cacao in the Americas³.

Several crops has been abandoned because of the disease, traditional farmers remain in other areas, but with an incidence of low income.⁴ The WBD shows distinct stages: a biotrophic and a saprotrophic phase, in the biotrophic phase happens the production of wider convoluted intercellular hyphae that lack clamp connections and hypertrophy and hyperplasia of the tissues (green broom). In the saprotrophic phase happens necrosis and death of infected tissues distal from the original infection site (dry broom).^{5,6}

There are four major strategies in treatment of cacao disease: phytosanitation, chemical control, genetic resistance and biological control. This four methodologies still has flaws.⁷ Currently effort has been expended in the elucidation of molecular targets, in particular the structural components of fungal cell wall.⁸⁻¹⁰ The fungal cell wall that functions in a number of important processes is a crucial component for the life of the pathogen. Because it promotes sufficient mechanical strength to withstand changes in osmotic pressure imposed by the environment.¹¹

The beta(1,3)-D-glucan is a major and most important structural polymer of yeast and fungal cell walls. The synthesis of this polymer is achieved by the catalytic action of the beta(1,3)-D-glucan synthase (EC 2.4.1.34). The UDP-glucose acts as a substrate of reaction of beta(1,3)-D-glucan formation. The beta(1,3)-D-glucan

synthase is an essential glucosyltransferase of the cell wall formation.¹² The production of chitins and glucans provides components of cell membranes unique and essential to fungi. These data suggest that beta(1,3)-D-glucan synthase can be an effective drug target.¹³

Two groups of antifungals interfere with the formation of beta(1,3)-D-glucan: the papulacandins and the echinocandins, which they carry a non-competitive inhibition of the beta(1,3)-D-glucan synthase activity,¹⁴ causing osmotic disruption or lysis of fungal cells. These inhibitors of synthase provide an alternative to the ergosterol-directed antimycotic agents,¹⁵ as well as beta-lactam antibiotics these compounds, which have specific action directed at the cell wall enzymes from microorganisms.¹⁶ The development of new antifungal drugs and detailed understanding the mechanism of inhibition of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme depends on the determination of its structure.

The modern approach to drug discovery focuses on identifying and describing biochemical targets and subsequently matching those targets with small molecules that have the properties needed to inactivate them, i.e. structure-based drug design.¹⁷

The objective of this study was to determine the three-dimensional model of the enzyme beta(1,3)-D-glucan synthase of *M. perniciosus* by homology modeling. Comparative modeling can generate a 3D model of a protein (target) from its amino acid sequence with reliability.¹⁸ Successful model building requires at least one experimentally solved 3D structure that has a significant amino acid sequence similarity to the target sequence.¹⁹

The genetic sequence of beta(1,3)-D-glucan synthase has been elucidated in several fungi.²⁰⁻²⁴ These sequences are generally referred to *FKS* gene and encodes

the enzyme beta(1,3)-D-glucan synthase.²⁵ The molecular characterization of *FKS* gene in *M. perniciosus* revealed the presence of, at least, two paralogous *FKS* genes, referred as *Cpfks-contig06* and *Cpfks-contig25*. Evidence suggests that *Cpfks-contig06* expression is cell cycle regulated and more abundant during vegetative growth, while *Cpfks-contig25* expression is less frequent and important for efficient sporulation.²⁶ Likewise the *M. perniciosus* *Cpfks-contig06* sequence is highly homologous to the *FKS* protein sequences of several fungi, especially in the predicted cytoplasmic loop region expected to contain the catalytic site.

Although the structure and mechanisms for a number of glycosyl hydrolases was described,²⁷ the structure for only a few beta-glycosyltransferases have been determined until now.²⁸ The active site structure of *SpsA* may serve as a prototype for the organization of the UDP-binding site in other family GT-2 inverting synthases, including beta(1,3)-D-glucan synthase of *M. perniciosus*. This region is a central cavity occupied by the conserved aspartic acid residues (D1, D2, D3, D4 motif) that have been implicated in substrate binding.²⁸⁻³⁰

Processive glycosyltransferases stay attached to the growing end of a glucan chain, and there is considerable interest in identifying the amino acid residues and the structure of the region that is involved in holding the glucan chain.²⁸ beta(1,3)-D-glucan synthase acts through an inverting catalytic reaction (converts α -D-UDP-glucose in beta(1,3)-D-glucan polymer). This enzyme belongs to the glycosyltransferase family 2 (GT-2),³¹ and its molecular weight and isoelectric point were respectively 9.55 and 53.58 kDa obtained by ExPASy compute pI/Mw tool.³²

The presence of the conserved catalytic residues in members of the same glycosyltransferase family and hydrophobic cluster analysis suggests that they catalyze glycosyl transfer reactions by similar mechanisms and in all enzymes of the

family, there are very similar active-site architecture.²⁸ Based on the presence of residues in the conserved motif, aspartic acid residues (D,D,D,D) sequence, probably present in all the β -glycosyltransferases. Thus, several evidences indicate that the binding of FKS to UDP-glucose should be universal for the fungal FKS proteins.³³ Structurally, GT-2 glycosyltransferase family are known to share a common fold for a mixed α/β protein with two domains and featuring a central β -sheet core flanked by α -helices.³⁴

2. Computational Methods

2.1 Alignment, template selection and models building

The *M. perniciosus* beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme sequence was obtained in a study conducted by Hora.²⁶ The sequence has deposited in *M. perniciosus* database Genome Project (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>). After obtaining the sequence, a search for models was carried out by PSI-BLAST,³⁵ FASTA,³⁶ and CATH³⁷ servers.

Were selected templates that showed sequence identity above 30% for the models were built.³⁸⁻³⁹ Other models were also selected from evolutionary information (structures of proteins from the same family - GT2),⁴⁰ and multiple alignment of sequences.^{41,42}

Alignments were performed by Swiss PDB Viewer⁴³ and BLAST-server.⁴⁴ During this stage, the templates that showed best profiles of aligned regions versus gaps were selected, also the multiple alignment provided important information for

targeting conserved regions, so that these regions were constructed consistently from the template coordinator.

After the templates selection, the process of models building was initiated. At this stage three different approaches were used to build the models.

In the first protocol, model named BegS1 was build through the methodology modeling by assembly of rigid bodies, were the *M. perniciosus* beta(1,3)-D-glucan synthase raw sequence was fitted in the CATH³⁷ multiple alignment selected templates through SWISS MODEL software (PDB: 1ZOD and 17DU).

Structures that show similarities were superimposed and a composite multiple structure template was created from the most conserved fragments for building of the model BegS1. The core of the model was generated in this procedure, where the backbone atom positions of the template structure was averaged. Non-aligned regions (insertions or deletions in the target-template alignment) were built using constraint space programming (CSP), were ensemble of fragments compatible with the neighboring stems was selected using a scoring scheme, which accounts for force field energy, steric hindrance and favorable interactions like hydrogen bond formation. A loop library derived from experimental structures was searched to find compatible loop fragments.

Model named BegS2 was constructed over the second protocol execution, in this step was used the same methodology of the BegS1 building, except the initial alignment, it was directed by the choice of two proteins with known structure tridimensional evolutionarily related to *M. perniciosus* beta(1,3)-D-glucan synthase (GT2-family, PDB 3A8E and PDB 37LI).⁴⁵ The sequences were aligned by Blast server and then that the model was built. The 'project mode' option from SWISS-MODEL server was used, the ability to interact with this server allowed semi-

automatic editing of sequence, where the sequence of the beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme was fragmented with percentage increase the identity between the pieces from the raw sequence and the templates.⁴⁶

The third model (BegS3) was constructed through the comparative modeling by satisfaction of spatial restraints in the computer program MODELLER.⁴⁴ First, the submitted sequence was aligned with template 3D structures in the MODWEB modeling server (<http://salilab.org/modweb>).⁴⁵ In this case the models were constructed from a variety of fold-assignment methods, including sequence–sequence (identical sequences), profile–profile and profile–sequence alignments (gaps). The server automatically generated model was obtained choosing a better structure between 10 models produced, such selection was carried out for model quality criterion that includes the sequence identity implied by the sequence–structure alignment, coverage of the modeled sequence, the compactness of the model, the fraction of gaps in the alignment, and various statistical potential Z-scores.

2.2 Refinement and evaluation of the models

In order to determine the accuracy and improve the loops and side chains modeling, energy minimization and molecular dynamics (MD) techniques were performed. All generated models have undergone a process of refinement. The simulations were carried on a cluster of SGI Origin 2400 and 3800 servers with a total twenty-four 500 MHz R12000 CPUs and 128 GBytes of memory using the AMBER ff03a atom force field.⁴⁶

The models structures were first energy minimized with an initial step size of 0.01 nm and a maximum of 1000 steps (steepest descent and conjugate gradient),

where cut-off distance for nonbonded interactions was 14 Å and solvation pairwise Generalized Born (GB) model was used for the MD. Follow Molecular dynamics simulations were carried out at 325 K with a canonical (constant T) ensemble and 12 Å maximum distance between atom pairs.

Temperature elevations slight might increase the effectiveness of Molecular dynamics. In general, the RMSD after of simulation at 325 K it is lower than the RMSD after of simulation at 300 K.³⁰

The total simulation time for each generated model was 8 nanoseconds. Study which was conducted using molecular dynamics simulations performed using atomic-based empirical force fields in explicit solvent for the refinement of protein structures highlights the fact that to achieve significant local refinement, simulations on an appropriate time scale (3-5 nanoseconds) are minimally required.³⁷

Different approaches were utilized to evaluation of the generated models. First, the quality of the models was then evaluated by visual inspection and with PROCHECK,⁴⁷ a method designed to detect stereochemistry quality of the model. Sequentially, a quantitative assessment of similarity of protein structure was carried out by the TM-Score, this procedure showed the similarity of topologies between templates and the generated models.⁴⁸ With the purpose of compare the structural similarity, RMSD (root-mean-square deviation) was also calculated. However, RMSD it is less sensitive than TM-Score assessment.⁴⁹

3. Results and discussion

3.1 Alignment and search templates

CATH search server³⁷ submission from the sequence of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme was performed to all the known proteins in PDB, and the results showed that 1QLE, 1ZOD and 1D7U respectively had sequence identity of 32.50%, 31.11% and 31.11%. The E-value were 0.016, 3e-4, and 3e-4 for 1QLE, 1ZOD and 1D7U respectively. The numbers of gaps were 3.0, 2.10 and 2.10 for 1QLE, 1ZOD and 1D7U respectively.

Table 1 – CATH search-server selected templates.

Structures PDB	Identidade*	E-value*	Residue quantity	Gaps*
1QLE	32.5%	0.016	196	3.0
1ZOD	31.11%	3e-4	264	2.10
1D7U	31.11%	3e-4	264	2.10

* BLASTp alignment

```

pdb|1zedA02      -----HPEIVSVIG-----EYAGKLDHLFS---EMLSRPVVDLALRNLITP 39
pdb|1d7uA02      -----HPEIVSVIG-----EYAGKLDHLFS---GMLSRPVVDLALRNLITP 39
glucan          FLGIVQFFISVVATLLFAIMSGRMFGDRVAGKSRKYLASQITFTASYPSLGRGSRLLSILL 60
                . . . . .          *** . . . . .          * * . . . . .
                . . . . .          . . . . .          . . . . .

pdb|1zedA02      PGDRALLLSTGAESNEAAIRMAKLVTKYIEIVGFAQSWHGMTGAASATYSAGRKGVGP 99
pdb|1d7uA02      PGDRALLLSTGAESNEAAIRMAKLVTKYIEIVGFAQSWHGMTGAASATYSAGRKGVGP 99
glucan          WALVFGFKFTESYFFLTLSFKDPIQVMVGMKIQQCNDRLFGNALCTNQAQAFLLTIMYIMD 120
                . * . . . . .          . . . . .          . . . . .          . . . . .

pdb|1zedA02      AAVG-----SFAIPADFTYRPRFER--NGAYDYLAELDYAFDLIDRQSSGNL 144
pdb|1d7uA02      AAVG-----SFAIPADFTYRPRFER--NGAYDYLAELDYAFDLIDRQSSGNL 144
glucan          LVLFFLDITFLWFIINWTVFSIGRSFSLGLSINTPKWDIFTRLPKRIYSKLLASQDIEVKY 180
                . . . . .          . . . . .          . . . . .          . . . . .

pdb|1zedA02      AAFIAEPILSSGGIIELPDGYMAALKRKCCEARGMLLILDEAQTGVGRGTGMFACQRD--- 201
pdb|1d7uA02      AAFIAEPILSSGGIIELPDGYMAALKRKCCEARGMLLILDEAQTGVGRGTGMFACQRD--- 201
glucan          KPKVLVSQIWNNAVIISMRYREHLLSIDHVQKLLYHQVDTGEGGRSRSLRAPPFFISQRDKAF 240
                . . . . .          . . . . .          . . . . .          . . . . .

pdb|1zedA02      -----GVTPDILTILSKTLGAGLPLAAIVTSAAIERAEHELGYLFYITHVSDP 248
pdb|1d7uA02      -----GVTPDILTILSKTLGAGLPLAAIVTSAAIERAEHELGYLFYITHVSDP 248
glucan          KGEFFPKGSEAERRISFFAQSLTITNMPPLPVDAMPTFTVLTPHYSEKILLSLREIITREE 300
                . . . . .          . . . . .          . . . . .          . . . . .

pdb|1zedA02      -----LPAAVYLRVLDVVQRD---EDP-----AES-----DDL----- 264
pdb|1d7uA02      -----LPAAVYLRVLDVVQRD---EDP-----AES-----DDL----- 264
glucan          DKQTRVTLLEHLKQLHPIEWENFVVDTKILAXESAMFNGPSPFGEKQSKTDLLPFYFI 360
                . . . . .          . . . . .          . . . . .          . . . . .

pdb|1zedA02      -----
pdb|1d7uA02      -----
glucan          GFKSAAPEFTLRTRIWASLRAQTLYRTVSGGGNYSKAIKLLYRVENPEVVQLFGGNTDKL 420

pdb|1zedA02      -----
pdb|1d7uA02      -----
glucan          ERLELRMSRRKFKFVSMQRYSKFNKEEHENAEFLLRAYPDY 462

```

Figure 1. Multiple sequences alignment in Blastp-server of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme sequence (glucan) and PDB models (1D7U and 1ZOD). Active site defined by dashed red.

The PDB 1QLE template was not selected because there was no alignment in the region of the catalytic site and was shorter length, Table 1 shows these and other features that guided the selection of the models.

The BegS1 model was based on multiple sequences alignment by the Blast server (Figure 1). Despite was observed that the docking performance was comparable to crystal structures when the sequence identity between target and template was >50%, when sequence identity between model and template in catalytic region was higher, expect the model derived from here to be suitable for docking performance applications.⁵⁰ Usually when the sequence identity exceeds 30%, reliable homology models can be built.⁵¹

BegS2 model alignment was relied on structural similarity from GT-2 family enzymes, where the two proteins with known structure of this family were used (PDB 3A8E and 37LI). On the Blast server, the obtained values were below 20% of identity for each individual alignment of GT-2 structure with the problem sequence. After sequence split in two identity favorable regions, the alignment achieved was 32% (3A8E template PDB) and 52% (37LI PDB template) of identity (Figure 2).

```

query      -FFLDTLWFIIWNTVFSIGRSFSLGLSIWTPWKDIFTR-LPKRIYSKLLASQDIEVKYK 58
3a8e      MTIFEKKPDFTLFLQTLSEIDQVGVIEVRNELLREVGRGMGTRIMPPPCQTVDKLQIEL 60
           :::  *  ::  ::*  .  .:*:::  .  .  *  :  .**  .  :  *

query      PKVLVSIWNAVIISMYR-EHLLSIDHVQKLLYHQVDTEGEGRRSLRAPFFF---ISQRD 114
3a8e      NALLALIGWGTVLELLESDQSLRIVHENLPQVGSAGEPSGTWLPVLEGLYGRWVTSQA 120
           :*  .  *:*  ::  :  :  *  *  *  :  .  .  .  .  *  :  :  :  :  :

query      KAFKGEFFPKGSEAERRISFFAQSLTTNMPPPL----- 147
3a8e      GAFGDYVWTRDVAEDLNAVPRQTIIMYMRVRSATHHHHHH 162
           **  .  .  .  .  .  :**  .  .  *::  *

query      -----PVDAMPT 7
3L7I      RFIDLDENSGHAHARNIALEEVEPYFHFLDADDELASYAITFYLEKFNNTDGLIAPHS 120
           :  .  .  :

query      FTVLTPHYSEKILLSLREIIPREEDQ-----TRVTLELTKQLHP-IE 49
3L7I      FTTQRPFVVDLDRVVEYFNKENINSFLRKQSACNIIFRTAIVRAHHIRFNENLNTYVD 180
           **.  *::  :  :  :  .  :  :  :  :  :  .  *  .  :  :  :  :  :

query      WENFVKTKILAEESANFNQPSFFG-----LEK 77
3L7I      MSFVLEHMEYVVKFVRIFFNFPPFYRGEVYDPPFETLTLSEQNFDILFKDYVNSFYDAIRA 240
           *  .  .  :  :  *  :  :  :  :  :  *  *  *

query      GQSKTDDLPPFYFIG----- 91
3L7I      TNPKVDELLIVTKMGNKIANEFKPTRYDINERYQTHKDTLVELSKFLHVHLVKNQKLINKI 300
           :  .  *  .  **  .  :  *

query      -----FKSAAPEFLRTRIVASLRAQT-----LYRTV 118
3L7I      ETILLMNNETDKAFKVNQFRKTLRHVKMIVLRRNKERSLYDLTDKEDNVKPKTIVFESF 360
           **  .  *  *  .  *  *  *  .  .  .  .  :  :  .  .

query      SG-----HMNYSKAIKLLYRVENPE----- 138
3L7I      GGKNYSDSPKYIYEYMQYYPNYRYIWSFKNPDKNVVPGSAEKVRNSAEYYQAYSEASH 420
           .  *  .  *  *  .  :  :  :  :  :  :  :

query      -----VVQLFGGNTDKLERELERMSRRKF 162
3L7I      WVSNAARTPLYLNKKENQTYIQTHGTPKRLANDMKVVRHMPGTTTPKYKRNFRNRETSR-N 479
           **::  *  .  *  *  *  :  :  :  :  :  :  :

query      KVVSMQRY-----KFNKE-----HENAFLLRAYPDY----- 192
3L7I      DYLISPNRYSTEIFRSAPWHEERILEIGYPRNDVLVNRANDQEYLDEIRTHLNLPDCK 539
           .  :  :  *  :  :  *  *  *  .  *  :  .  .  .  .  *

```

Figure 2. BegS2 model alignment in Blastp-server of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme sequence (query) and PDB models (3A8E and 3L7I). Active site defined by dashed red.

The benefits of using multiple templates rather than a single template for homology modeling were evident in low alignment identity (<30%) and different templates have similar sequence identities to the problem sequence.⁵²

Both sequence and structural features were developed to construct multiple structures in the MODWEB modeling server⁴⁵ for achieved alignment for BegS3. The structure and sequence combination methods showed a greater ability to identify

related residues, and provide better recognition and better alignments than standard only sequence-profile methods.⁵³

3.1 Construction, refinement and evaluation of the models

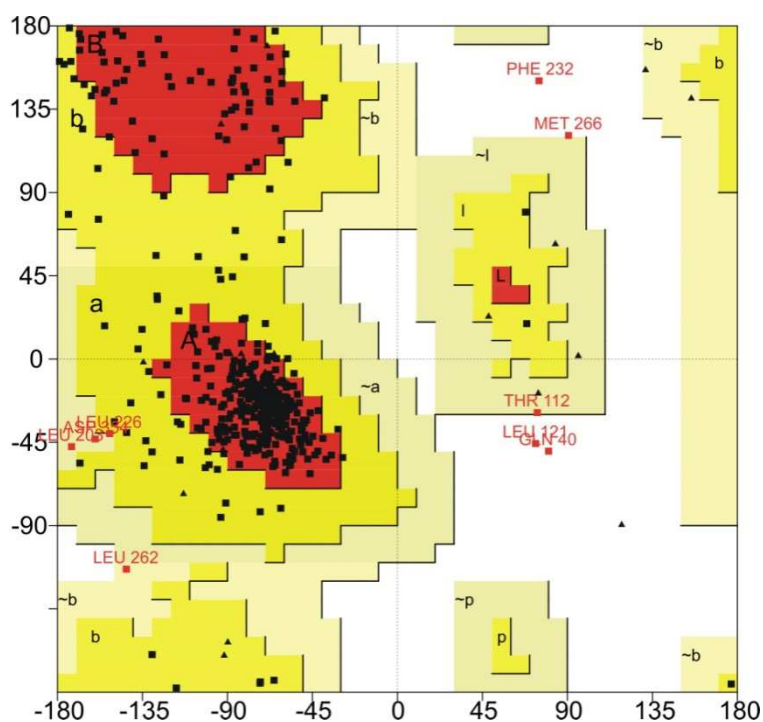
The BegS1 initial model built at the Swiss-pdb View project had total energy 1122,9 kcal/mol and 96.5% amino acid in central regions. The BegS2 construction result brought a model that features: total energy of the model was 2786,4 kcal/mol and Ramachandran plot with 95.0% amino acid in central regions. The satisfaction of spatial restraints method in Modeller modbase portal, used to build the BgS3 model, enabled to obtain an initial model with: 5392,5 kcal/mol total energy and Ramachandran plot with 90.7% amino acid in central regions. Stereochemical quality of a model is acceptable when more than 90.0% amino acids are in central regions (most favored regions and additional allowed regions) according to the Ramachandran plot.⁴¹ However the presence of 5.0% of residues in disallowed regions favored the reduction stereochemical quality from the BegS3 model. This fact might partially being explained by the process of building the models, where some programs sacrifice the stereochemistry for a more correct backbone.⁴²

After minimization, the molecular dynamics simulation stages was performed, where the total simulation length was possible to improve the stereochemistry quality of models, according showed in Table 2.

Table 2 – Stereochemical parameters after models refinement.

Model	Total Energy kcal/mol	% amino acids in central regions (Ramachandran plot)	% amino acids in disallowed regions (Ramachandran plot)
BegS1	-1472,794	97.7	1.0
BegS2	-1445,93	96.5	0.3
BegS3	647,612	93.3	2.5

Ramachandran plot of BegS1 and BegS2 (figure 3 and figure 4) models showed better physical and chemical parameters, these models with the lowest energy and acceptable stereochemical quality were selected for further analysis in TM-score server (similarity assessment). According to Ramachandran plot (Figure 3), the BegS1 model had only 1% of amino acids in unfavorable regions (residues PHE232, MET266, LEU121), such do not form part of the enzyme active site.

**Figure 3:** Ramachandran plot of BegS1 (Procheck 3.0)

Model evaluation was checked if the overall fold of the three-dimensional model structure was acceptable, in this approach, the protocol generally depends on the chosen templates, and whether the alignment is correct with the query sequence.

For this similarity analysis TM-score and RMSD methods were chosen. RMSD is measure most commonly used means to compare protein structures. When there are low identities, the value RMSD of 4.30 Å for C α atoms reflects the limit of how well one can hope to model a target on a template.^{54,55} The RMSD value found for BegS1 model was 2.37 Å, and 3.17 Å for BegS2 model. Comparing the two models obtained (BegS1 and BegS2) from each other, the 8.83 Å RMSD value was found.

However, RMSD measures is not ideal for comparing all cases, mainly when there are multiple alignment (structures are substantially different).⁵⁶ Amongst the problems this methodology can be pointed out: tends to increase value with protein size,⁵⁶ more sensibility to the local evaluation rather than global topology,⁴⁹ and wrong parts of a model affect the RMSD most dramatically.

The Table 3 represents obtained results in the template-model comparing. The BegS1 model showed better TM-score (0.88), where value between 0.0 and 0.17 denote random structural similarity and value between 0.5 and 1.00 about the same fold,⁴⁹ i.e., template-model pairs with a TM-score >0.5 are mostly in the same fold while those with a TM-score <0.5 are mainly not in the same fold.³¹

Table 3 – TM-Score and RMSD from templates-models

Model	Template (PDB code)	TM-score	RMSD (Å)
BegS1	1ZOD and 1D7U	0.8808	2.37
BegS2	3A8E and 37LI	0.1464	3.17

According to showed in the Ramachandran plot (Figure 3), the BegS2 model had proper stereochemistry quality, Nevertheless, low native structure similarity, confirmed by TM-score and RMSD measurements.

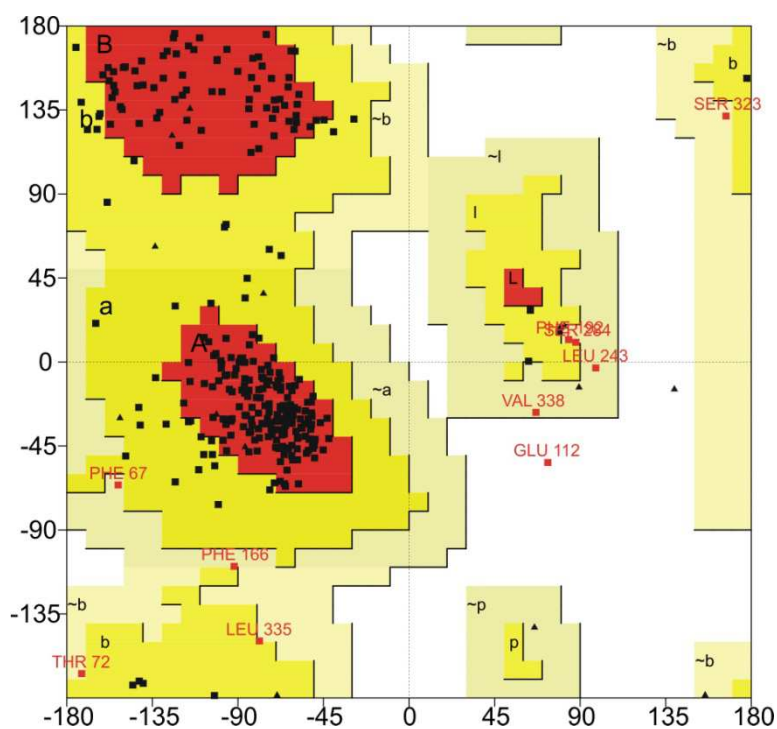


Figure 4: Ramachandran plot of BegS2 (Procheck 3.0)

3.1 Structural description

The BegS1 model showed two distinct α/β domains, as feature inverting glycosyltransfer family, and the topology of folded structure showed 7 strands and 13 alpha-helices (figure 5).

Along with the information that the enzyme is located in transmembrane regions,⁵⁷ as others structures of GT-2 enzyme family, frequent alpha-helices configuration shaped interesting data found. There are many evidences that the

transmembrane segments, expected to have the alpha-helices conformation, and can contain only ten or fewer residues.⁵⁸ Hence these found alpha-helices regions in the BegS1 model are the most probable to be the transmembrane segments of *M. pernicios*a beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme.

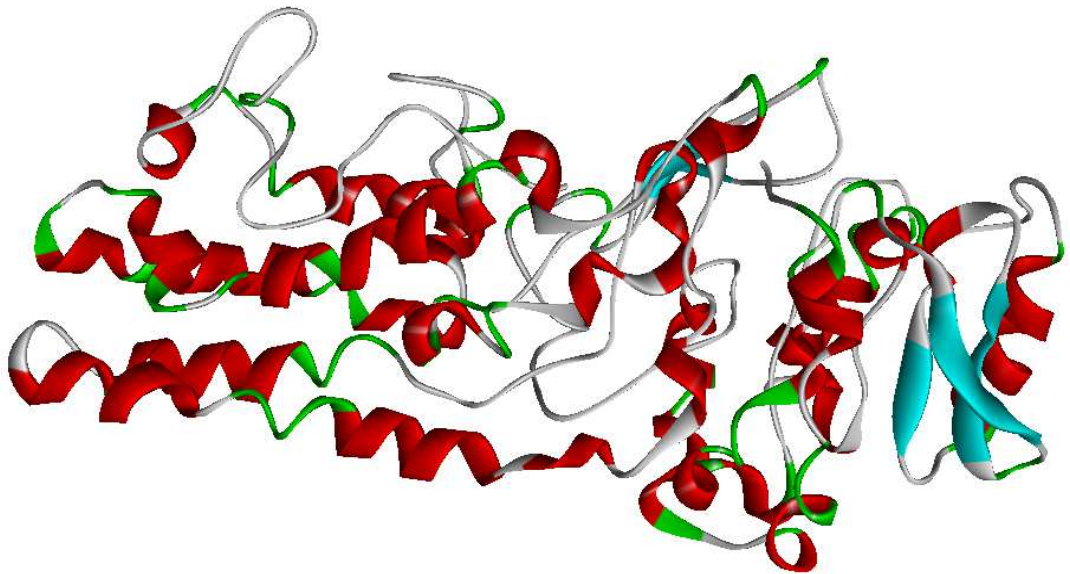


Figure 5: The structure of *M. pernicios*a beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme. Helical are colored red and, and sheet, coil, and loops secondary structures in BegS1 are colored red, blue, green and gray, respectively. Visualization in the program Discovery Studio 3.0

Beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme showed structural characteristics in agreement to others structures of the GT-2 enzyme family,³⁰ as: domains central beta-sheet core flanked by alpha-helices, the classical nucleotide-binding domain, i.e, n-terminal region of parallel beta-strands flanked on either side by alpha-helices and is the binding site for substrate and the acceptor binding region (aspartate domain), visualized in Figure 6.

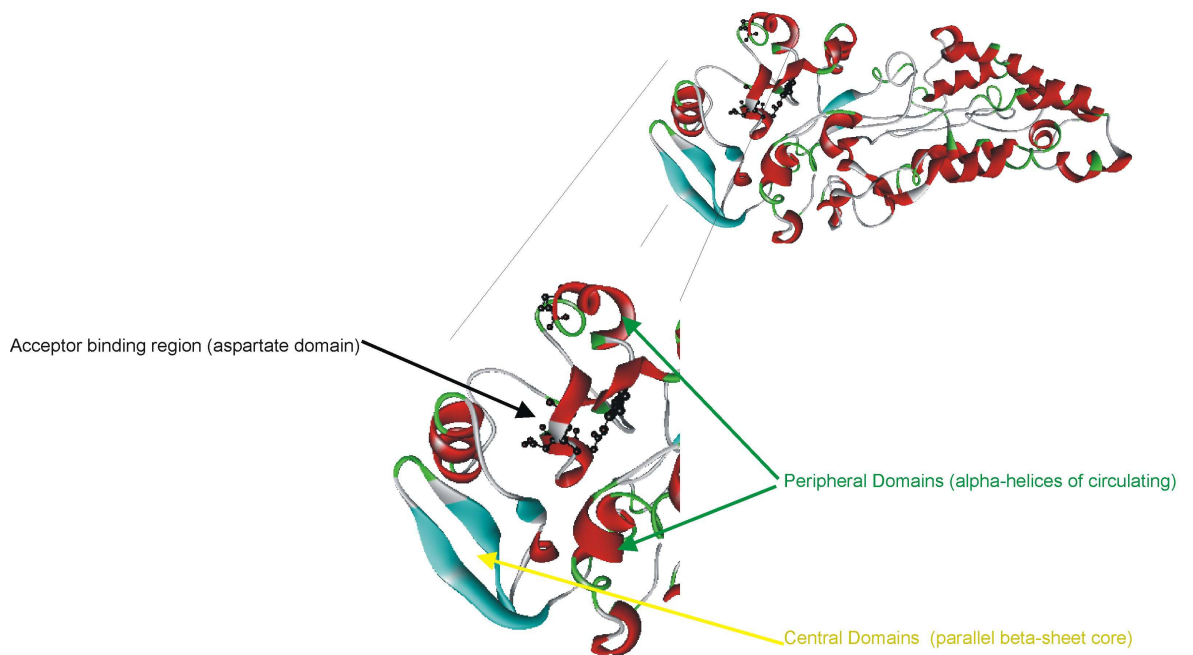
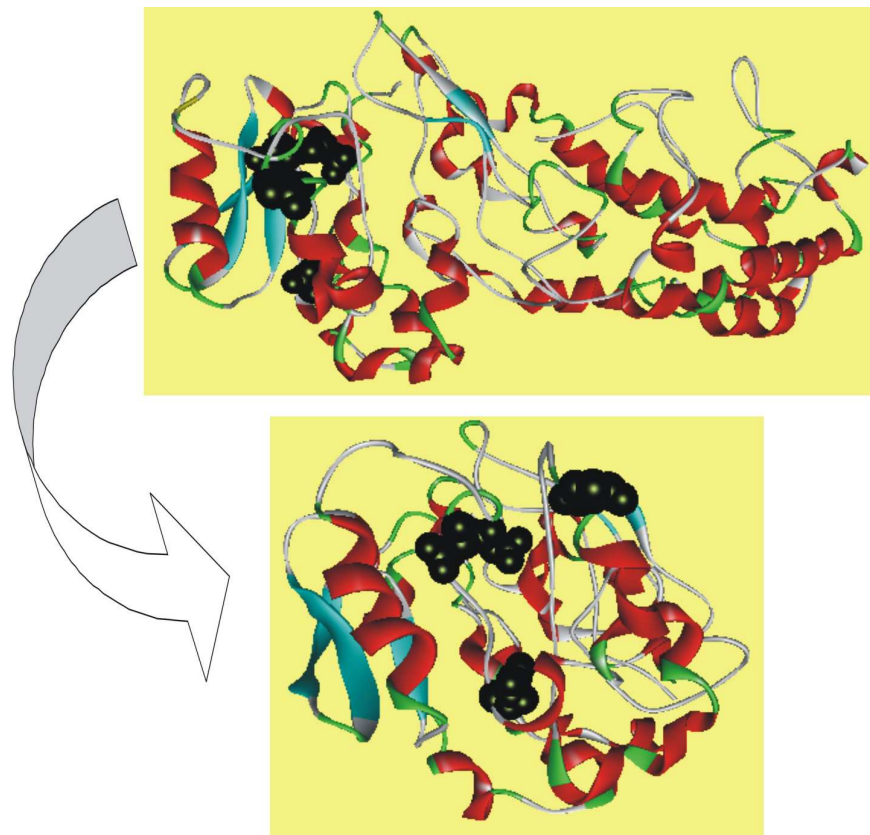


Figure 6: The characteristic structures of the GT-2 family in the *M. pernicioso* beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme. Visualization in the program Discovery Studio 3.0

Bioinformatics techniques used to structural predict begin with share the assumption that proteins that are evolutionarily related might exhibit common structural and functional features corresponding to detectable patterns in their sequences, particularly the GT-2 family that has structural similarity.^{28,30} Thus, it was possible to obtain the structure of catalytic site of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme. The BegS1 model showed the presence of a catalytic cavity formed by the conserved aspartic acid residues (Asp326, 345, 353 and 354 DDxD motif) implicated in substrate binding²⁸ and/or catalysis.³⁰ In the BegS1 model this cavity it is close by a loop region, as was seen in the GT-2 family structure.



```

FLGIVQFFISVVATLLFAIMSGRMFGDRVAGKSRKYLASQTTASYP SLGRGSRLASILL
WALVFGFKFTESYFFLTL SFKDPIQVMVGMKIQQCNDRLF GNALCTNQA AFTLTIMYIM
DLVLF LD TFLWFIWNTVFSIGRSFSLGLSIWTPWKDIFTRLPKRIYKLLASQDIEVKY
KPKVLVSQIWNVAIISMYREHLLSIDHVQKLLYHQVDTGEGGRRSLRAPPFFISQRDKA
FKGEFFPKGSEAERRISFFAQSLTTNMPPPLPVDAMPTFTVLT PHYSEKILLSLREIIRE
EDKQTRVTLLEYL KQLHPIEWENFVKDTKILAEESAMFNGPSPFGDEKGGSKTDDL PF
YFIGFKSAAPEFTLRTRIWASLRAQTLYRTVSGMMNYSKAIKLLYRVENPEVVQLFGGN
TDKLERELERMSRRKFKFVSMQRYSKFNKEEHENA EFLLRAYPDY

```

Figure 7: Flat ribbon representation of BegS1 model with active site amino acid residues represented in space-filling form and amino acid sequence of beta(1,3)-D-glucan synthase of *Moniliophthora perniciosa* with active site amino acid residues indicated by red color. Visualization in the program Discovery Studio 3.0.

Figure 7 shows the sequence and active-site structure modeled in the BegS1 model for beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme from *Moniliophthora perniciosa*. In SpsA protein from *Bacillus subtilis* (GT-2 enzyme), Asp98 (DxD motif-Asp98 and Asp99) is involved in hydrogen bonding to the ribose of UDP, whereas in the beta(1,3)-D-glucan synthase of *Moniliophthora perniciosa* model (BegS1), the equivalent amino acid aligned was Asp354 (DxD motif Asp353 and 354). In SpsA,

Tyr11 is positioned to allow effective stacking of the uracil moiety of UDP in the binding site region. The equivalent residue in the beta(1,3)-D-glucan synthase model is Tyr311. The UDP-glucose binding domain is well-conserved in GT-2 family and the critical amino acids “DD(x)D” that interact with UDP-glucose are invariant.²⁸ Despite different numbers of amino acids may separate them, the conserved residues in GT-2 family are predicted to be present at structurally similar positions in the active site.³⁰

4. Conclusion

Homology modeling methodology was used to generate a model of the beta(1,3)-D-glucan synthase from *M. perniciososa*, in this enzyme the binding site is located at amino acids Asp353, Asp354 and the residues which contribute to this region are in accordance with experimental data from the GT-enzyme family (Asp345, Asp324, Tyr311).

Some reasonable structural models of beta(1,3)-D-glucan synthase enzyme were obtained, including BegS1, BegS2, and BegS3, through molecular modeling. The modeling studies provided an insight into the folding pattern and the arrangement of amino acids. The model with the broadly value of the TM-score and acceptable stereochemistry assessment (BegS1) was selected as the best model structure. It is encouraging to find that the model BegS1 agree well with general structures from GT-2 enzyme family.

Previously the complete structure of beta(1,3)-D-glucan synthase is determined through experimental assays, the BegS1 model serves as a helpful reference for featuring the interactions between beta(1,3)-D-glucan synthase and its antagonists. Whereas which that has been the first work about of the enzyme, first

structure-function characterization will stimulate further research and be an incentive for new studies.

5. References

1. Sereno, M. L.; Albuquerque, P.S.B.; Vencovsky, R.; Figueira, A. *Conservation Genetics*. **2006**, 7, 13-23.
2. Purdy, L.H.; Shmidt, R.A. *Annual Review of Phytopathology*. **1996**, 34, 573-594.
3. Meinhardt, I.W.; Bellato, C. M.; Rincones, J.; Azevedo, R.A.; Cascardo, J.C.M.; Pereira, G.A.G. *Current Microbiology*. **2006**, 52, 191-196.
4. Rudgard, S. A.; Andebrhan, T.; Maddison, A. C. *Disease management in cocoa: comparative epidemiology of witches's broom disease*, Chapman & Hall: London, 1993.
5. Ceita, G. DE O.; Macêdo, J. A.; Santos, T. B.; Alemanno, L.; Gesteira, A. S.; Micheli, F.; Mariano, A. C.; Gramacho, K. P.; Silva, D. C.; Meinhardt, L.; Mazzafera, P.; Pereira, G. A. G.; Cascardo, J. C. *Plant Science*. **2007**, 173, 106-117.
6. Garcia O.; Macêdo J.N.A.; Tiburcio R.; Zapparoli G.; Rincones J.; Bittencourt L.M.C.; Ceita G.O.; Micheli F.; Gesteira A.S.; Mariano A.C.; Schiavinato M.A.; Medrano F.J.; Meinhardt L.W.; Pereira G.A.G.; *Mycological Research*. **2007**, 111, 443-455.
7. Meinhardt, L.W.; Johana, R.; Bryan A. B.; Aime M. C.; Griffith G.W.; Zhang D.; Pereira, A.G. *Molecular Plant Pathology*. **2008**, 9, 577-588.
8. Lopes, M.A.; GOMES, D.S.; KOBILIZ, M.G.B.; PIROVANI, C.P.; Cascardo, J.C.M.; Góes-Neto, A.; Micheli, F. *Mycological Research*. **2008**, 112, 399-406.
9. Santos Jr, M.C.; Taranto A.G.; Assis S.A.; Goes-Neto, A. *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*. **2009**, 5, 133-153.

10. Souza, C. S.; Oliveira B. M.; Costa G.G. L.; Schriefer, A.; Selbach-Schnadelbach A.; Uetanabaro A.P.T.; Pirovani C.P.; Pereira G.A.G; Taranto, A.G; Cascardo, J.C.M. *The Journal of Microbiology*. 2009, 47, 431-440.
11. Bowman S.M.; Free, S.J. *BioEssays*. 2006, 28, 799–808.
12. Eleanor M. S, James, A.B. *Journal of Biological Chemistry*. **1980**, 255, 888-894.
13. Georgopapadakou, N. H., Tkacz, J. S. *Tren. Microbiol*. **1995**, 3, 98-104.
14. José, P. *Rev. Iberoam. Micol*. **2008**, 25, 78-82.
15. Onishi, J.; Meinz, M.; Thompson, J.; Curotto, J. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2000**, 44, 368-377.
16. Mochalkin, I.; Lightle, S.; Zhu, Y.; Ohren, J.F.; Spessard, C.; Chirgadze, N.Y.; Banotai, C.; Melnick, M.; McDowell, L. *Protein Science*. **2007**, 16, 2657-2666.
17. Ruge, E.; Korting, H.C.; Borelli, C. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **2005**, 26, 427–441.
18. Tramontano, A; Leplae, R; Morea, *Proteins*. **2001**, 45, 22–38.
19. Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M.C. *Nucleic Acids Research*. **2003**, 31, 3381–3385.
20. Douglas, C. M. *J. Bacteriol*. **1994**, 176, 5686-5696.
21. Mio, T. *J. Bacteriol*. **1997**, 179, 4096-4105.
22. Thompson, J.R. *J. Bacteriol*. **1999**, 2, 444-453.
23. Pereira, M. *Yeast* . **2000**, 16, 451-462.
24. Guillermo G. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2009**, 53, 3690-3699.
25. Kelly, R. *J. Bacteriol*. **1996**, 178, 4381-439
26. Hora, J,B.T. *Department of Biological Sciences – UEFS*. **2006**, 48-50.
27. Davies, G.; Henrissat, B. *Structure*. **1995**, 3, 853–859.

28. Saxena I.M.; R. Brown Jr, M.; Dandekar T. *Phytochemistry*. **2001**, 57, 1135-1148.
29. Karnezis, T.; Epa, V. C.; Stone, B.A.; Stanisich, V.A. *Glycobiology*. **2003**, 13, 693-706.
30. Charnock, S.J.; Davies, G.J. *Biochemistry*. **1999**, 38, 6380-6385.
31. Zhang, Y.; Skolnick, J. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. **2004**, 57, 702–710.
32. Bjellqvist, B.; Hughes, G.J.; Pasquali, C.H.; Paquet, N.; Ravier, F.; Sanchez, J.; Frutiger, S.; Hochstrasser, D.F. *Electrophoresis*. **1993**, 14, 1023-1031.
33. Chothia, C.; Lesk, A.M. *EMBO J*. **1986**, 5, 823–826.
34. Tarbouriech, N.; Charnock, S.J.; Davies, G.J. *J. Mol. Biol.* **2001**, 314, 655-661.
35. Fiser, A. *Protein Structure to function with bioinformatics*. Springerlink: Liverpool, 2009.
36. Pearson, W.R. *Method Mol. Biol.* **2000**, 132, 185-219.
37. Chen, J.; Brooks, C.L. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. **2007**, 67, 922–930.
38. Kopp, J.; Schwede, T.; *Pharmacogenomics*. **2004**, 4, 405–416.
39. Vitkup D.; Melomud, E.; Moulton, J.; Sander, C.; *Nature Struct Biol.* **2001**, 6, 559-566.
40. Qian, B.; Ortiz, A. R.; Baker, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 15, 346–351.
41. Cozzetto, D.; Tramontano, A. *Proteins*. **2005**, 58, 151-157.
42. Lindahl, E.; Elofsson, A.; *J Mol Biol.* **2000**, 295, 613–625.
43. Guex, N.; Diemand, A; Peitsch M.C. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 364-367.
44. Sali, A.; Blundell, T.L. *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 779–815.
45. Quian, B.. Ortiz, A.R.; Baker, D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 15, 346-351.

46. Ginalski, K. *Current Opinion in Structural Biology*. **2006**, 16, 172–177.
47. Blundell, T.L.; Sibanda, B.L.; Sternberg, M.J.; Thornton, J.M.; Nature. 1987, 326, 347–352.
48. Cozzetto, D.; Kryshchuk, A.; Fidelis K.; Moulton, J.; Rost, B.; Tramontano, A. *Proteins*. **2009**, 77, 18–28.
49. Melo, F.; Devos, D.; Depireux, E.; Fiytmans, E. *Intelligent Systems for Molecular Biology*. **1997**, 97, 110-113.
50. Summa, C.M.; Levitt, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 3177–3182.
51. Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R.J. *Journal of Computational Chemistry*. **2005**, 26, 1667-1688.
52. Wallner, B.; Elofsson, A. *Protein Science*. **2005**, 14, 1315–1327.
53. Ohlson, T.; Wallner, B.; Elofsson, A.; *Proteins*. **2004**, 57, 188–197.
54. Petrey, D. Honig, B.; *Molecular Cell*. **2005**, 20, 811–819.
55. Xu, J.; Zhang, Y. *Structural bioinformatics*. **2010**, 26, 889–895.
56. Venclovas, C.; Zemla, A.; Fidelis, K.; Moulton, J.; *Proteins*. **1997**, 1, 7–13.
57. Nayeem, A.; Sitkoff, D.; Krystek Jr, S. *Protein Science*. **2006**, 15, 808–824.
58. Skipper, N. *Science*. **1985**, 230, 958-960.

CAPÍTULO 3³

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *MONILIOPHthora* *PERNICIOSA* POR COMPOSTOS ORGÂNICOS¹

³ Artigo será submetido à Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *MONILIOPTHORA PERNICIOSA* POR COMPOSTOS ORGÂNICOS³

Resumo

A lavoura cacaueteira enfrenta uma redução em sua produção desde 1989 com a chegada da praga denominada vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*. Embora existam diversas alternativas no controle da vassoura-de-bruxa, estas ainda estão incipientes. Assim, existe a necessidade de buscar novas formas de controle. Conforme relatado em literatura, os glicolípídeos são compostos orgânicos capazes de inibir a enzima beta(1,3)-D-glicano sintase e promovem a morte celular pela deficiência de beta(1,3)-D-glicano, um importante componente da parede celular. Objetivou-se no trabalho avaliar a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* por compostos orgânicos. O crescimento micelial foi aferido após o cultivo de um disco de 0,5 cm do fungo em placas contendo meio BDA com concentrações de 4,0 µg/mL, 2,0 µg/mL, 1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL dos compostos em estudo. A concentração inibitória mínima foi considerada aquela onde existiu inibição de 100% do crescimento micelial. Dos 23 compostos testados apenas 6 apresentaram atividade fungitóxica, sendo que um derivado com estrutura de dois anéis fundidos (pirimidínico e fenólico) apresentou CIM de 2µg/mL. Foi possível através deste trabalho, realizar uma triagem inicial de compostos, tendo como objetivo direcionar procedimentos posteriores para o desenvolvimento de um antifúngico.

Palavras-chave: Organics compounds, *Moniliophthora Perniciosa*, beta(1,3)-D-glicano sintase, antifúngicos, CIM.

Abstract

The cocoa crop shows a reduction in your production since 1989 with the advent of the pests termed Witches' Broom Disease, caused by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. Although there are several alternatives to control the Witches' Broom Disease, they are still incipient. Therefore, there is a need to search new control procedures. According to reported in the literature the glycolipids organics compounds are compounds capable to inhibiting the enzyme beta(1,3)-D-glucan synthase and promotes the cell death by a deficiency of beta(1,3)-D-glucan, this is a important cell wall component. The objective these study to evaluate *in vitro* inhibition of mycelial growth of *M. perniciosa* by organics compounds. Mycelial growth was assessed after cultivation of a disk of 0.5 cm from the fungus in *Petri* dishes containing PDA medium with concentrations of 4.0 µg/mL, 2.0 µg/mL, 1.0 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL of the compounds under study. The MIC was considered one which there was 100% inhibition of mycelial growth. From 23 compounds tested only 6 were fungitoxic activity, where one derived from structure with two fused rings (pyrimidine and phenol) showed MIC of 2 µg/mL. In this study, was performed an initial screening of compounds, with the purpose guiding procedures further to the development of one antifungal.

Keywords: glycolipids, *Moniliophthora perniciosa*, antifungals, inhibition, Witches' Broom, MIC

INTRODUÇÃO

A doença da vassoura-de-bruxa é causada pelo fungo *M. perniciosa*, que apresenta duas fases bem características: uma parasítica (vassoura-verde, com micélio monocariótico e intercelular) e outra saprofítica (vassoura-seca, com micélio dicariótico e intracelular). O *M. perniciosa* coloniza tecidos meristemáticos reduzindo a produtividade bem como o tempo de vida da planta hospedeira (RUBINI et al, 2005).

A enfermidade causada pelo *M. perniciosa* tem grande importância no Brasil, principalmente, na Amazônia e na região sul da Bahia, pois foi responsável por reduzir de maneira significativa a produção de cacau, resultando numa crise econômica, porque esta localidade era fortemente dependente da exportação das sementes de cacau para fabricação de chocolate (COUTO, 2000). Além do Brasil, nas Ilhas do Caribe houve diminuição da produção devido a esta doença, sendo o *M. perniciosa* o principal patógeno relacionado aos prejuízos na cultura do cacau (RUBINI et al, 2005).

Com o objetivo de estabelecer alternativas para a resolução deste problema, foi estruturada uma rede composta por seis instituições, (UESC, UEFS, UFBA, CEPLAC, EMBRAPA e UNICAMP) tendo esta rede como objetivo final a elucidação de alvos moleculares que poderão levar ao desenvolvimento de diversas estratégias de controle da doença através do sequenciamento genético do fungo. Dentre os diversos alvos moleculares que o fungo possa apresentar as enzimas associadas ao metabolismo dos principais carboidratos da parede celular, quitina e glicanos, são atrativos alvos moleculares (PIROVANI et al, 2005).

Compostos químicos vêm sendo testados com o objetivo de prevenir ou erradicar a vassoura-de-bruxa, porém não foram obtidos bons resultados, pois o rápido crescimento da superfície dos frutos durante os dois ou três meses de desenvolvimento do fungo faz com que o fungicida tenha que ser aplicado

freqüentemente, inclusive isto se torna difícil em árvores muito altas (SOBERANIS et al., 2000).

Estudos iniciais demonstraram que as células fúngicas destituídas de parede celular somente sobrevivem em condições de laboratório, onde o suporte osmótico previne a sua lise. Estes achados sugerem a parede celular com um importante alvo na busca de uma defesa efetiva, justificada por ela ser essencial para os fungos e por não estar presente em mamíferos. Conseqüentemente, as rotas biossintéticas das moléculas que compõem a parede celular são alvos importantes para o desenvolvimento de agentes inibidores do crescimento destes patógenos (GEORGOPAPADAKOU; TKACZ, 1995).

O papel crucial no metabolismo de formação da parede celular de *M. perniciososa* faz da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase um importante alvo de inibição do desenvolvimento do fungo (YOUNG-SIL et al, 2006). A interferência neste alvo promove a instabilidade da parede celular do fungo, levando à destruição das hifas. Como resultado, ocorre a inibição do crescimento do patógeno (GEORGOPAPADAKOU, TKACZ, 1995).

Dentre os compostos orgânicos inibidores da formação da parede celular, as papulacandinas apresentam alto grau de toxicidade seletiva aos fungos patogênicos, o que vem atraindo grupos de pesquisa tanto na área biológica (BALACHAR; O'DOHERTY, 2005) quanto na área de síntese química (CANETERO et al, 1999).

As papulacandinas e as caspofunginas são compostos orgânicos relatados em literatura capazes de inibir a ação da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase em algumas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Candida* (DESNOS-OLLIVIER et al., 2008). No entanto, a região catalítica e o mecanismo da inibição destas drogas ainda não foram totalmente elucidados (PARK et al, 2005). As papulacandinas são caracterizadas quimicamente como glicolipídeos, onde existe grupamento espiroglicosídico ligado a uma cadeia de ácido graxo insaturado na posição C-3 da D-glicose (CANETERO et al, 1999).

De forma similar com o ocorrido com o desenvolvimento de antibióticos, compostos que atuam nesta via metabólica como vancomicina, β -lactâmicos, e cefalosporinas são de eficácia clínica comprovada (MOCHALKIN et al, 2007). Conseqüentemente, a interferência nestes alvos promove a instabilidade da parede celular do fungo, levando à destruição das hifas. Como resultado, ocorre a inibição do crescimento do patógeno (GEORGOPAPADAKOU; TKACZ, 1995).

As informações descritas na literatura à cerca da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase, bem como, seu papel na formação da parede celular, justificam este trabalho, que tem como objetivo avaliar a inibição do crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* por compostos obtidos através de síntese orgânica.

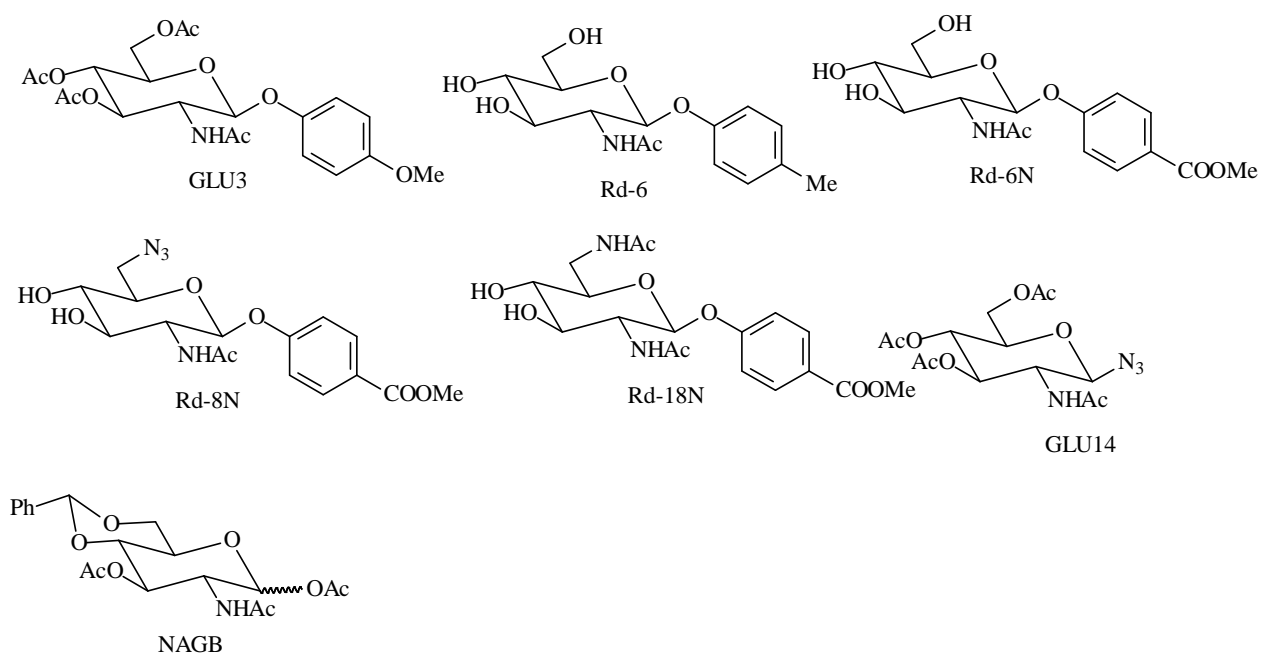
MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos de inibição *in vitro* do crescimento micelial do fungo *M. perniciosa* foram realizados no Laboratório de Enzimologia (LAEN), localizado na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana/BA.

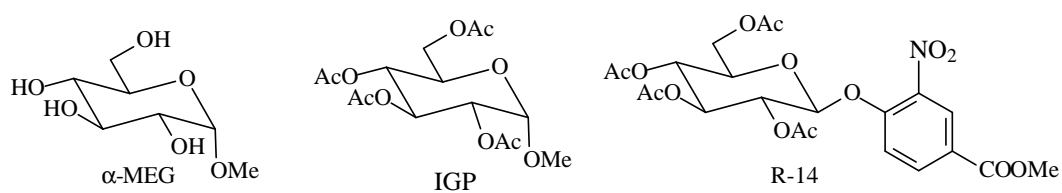
Compostos

Os compostos foram gentilmente doados pelo Laboratório de Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia da UFMG. A estrutura dos mesmos podem ser visualizadas nas Figuras 1, 2 e 3.

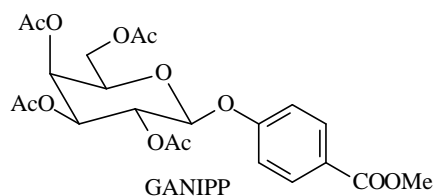
DERIVADOS DE N-ACETILGLICOSAMINA



DERIVADOS DE D-GLICOSE



DERIVADO DE D-GALACTOSE



DERIVADO DE LACTOSE

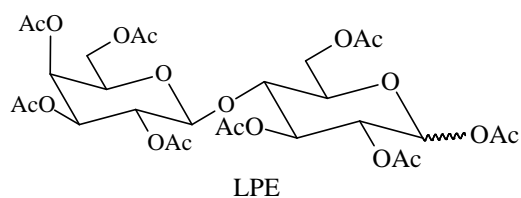
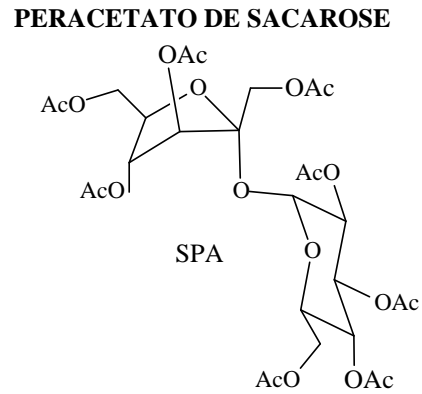
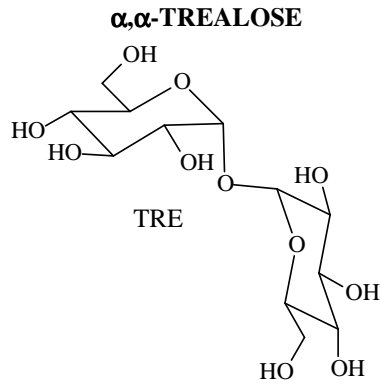
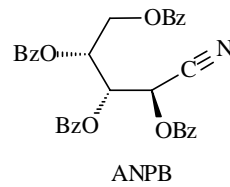
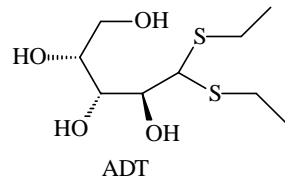


Figura 1: Estrutura dos compostos estudados



DERIVADOS DE D-ARABINOSE



ESTRUTURAS DIVERSAS

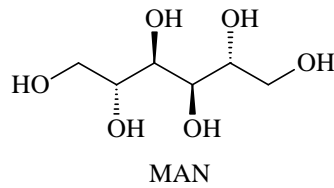
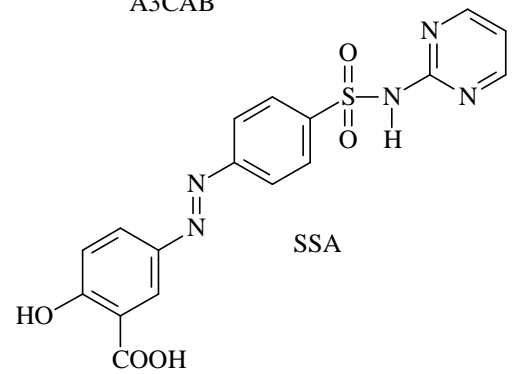
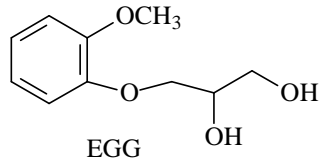
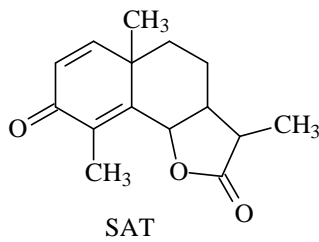
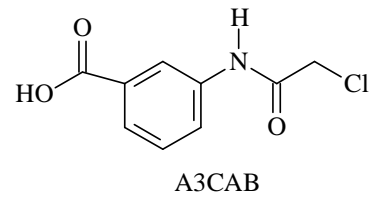
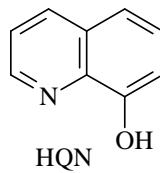
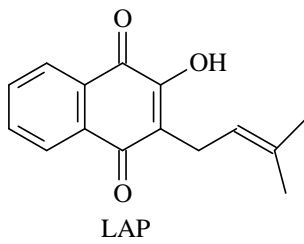


Figura 2: Estrutura dos compostos estudados

Micro-organismo

O fungo *M. pernicioso* (CCMB 0257) foi gentilmente cedido pela Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB).

Preparação das amostras

Diferentes concentrações dos compostos foram preparadas através da dissolução dos mesmos em volumes adequados. O diluente utilizado foi o metanol esterilizado por filtração em membrana filtrante com porosidade de 0,22 µm. Após este processo, em capela de fluxo laminar, as soluções obtidas foram dissolvidas assepticamente em meio estéril BDA fundente de forma a se obter concentrações de 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 4 µg/mL.

Instalação do ensaio

A realização dos ensaios de inibição *in vitro* do crescimento micelial foi realizada pelo método de diluição em Agar (SOYLU et al. 2007) com posterior avaliação da taxa de crescimento radial (ZAMBONELLI et al., 1996). Os meios de cultura com as diferentes concentrações obtidas foram transferidos para placas de Petri. Discos de ágar de 5 mm de diâmetro do crescimento ativo do micélio de *M. pernicioso*, ou seja, retirados da região periférica do micélio após 13 dias de crescimento, foram transferidos individualmente para o centro de cada uma das placas componentes de cada concentração e incubadas a 28°C em estufa. Placas de Petri com apenas BDA e metanol foram utilizados como controle positivo de crescimento.

Avaliação

A avaliação do crescimento micelial foi realizada após 11 dias de incubação. O efeito dos extratos sobre o crescimento micelial foi quantificado através de medições do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas) tendo como referência o desenvolvimento

da placa controle, sendo posteriormente calculada uma média dos valores obtidos. Foram realizados cinco tratamentos e três repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC). As médias de diâmetro da colônia aferidas na etapa anterior foram expressas em porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM), usando a fórmula, $MGI (\%) = [(d_c - d_t) / d_c] \times 100$, onde d_c = significa o diâmetro de crescimento micelial encontrado em placas de Petri contendo o controle positivo e d_t significa o diâmetro de crescimento micelial a partir de placas de Petri contendo os compostos orgânicos (PANDEY et al., 1982). A concentração inibitória mínima (CIM) do composto foi considerada a menor concentração do composto orgânicos testado que resultou em 100% de inibição no crescimento micelial (DAOUK, et al 1995).

Análise de dados

Os dados obtidos foram analisados através do programa SISVAR – Sistema de Análise de Variância (FERREIRA, 2000), onde foi realizada a análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antifúngica contra o *M. pernicioso* foi avaliada nas 23 substâncias doadas pelo laboratório de química da UFMG, dentre as quais, apenas 6 substâncias apresentaram atividade fungitóxica, nos outros 17 compostos testados não houve diferença significativa dos valores de inibição encontrados em relação aos resultados do controle. Os resultados inibição do crescimento micelial dos compostos com atividade fungitóxica podem ser observados na Tabela 01, onde é possível visualizar que, quando comparadas com o controle, os seis compostos de melhor atividade, forneceram graus diferenciados de inibição do crescimento micelial do fungo *M. pernicioso*.

De acordo com as informações visualizadas na Tabela 2, as concentrações 0,25 µg/mL da amostra MAN (estrutura na Figura 2), 0,25 µg/mL da amostra ANPB (estrutura na Figura 3) e 0,25 µg/mL da amostra R14 (estrutura da Figura 2) não revelaram valores significativamente diferentes aos resultados observados na amostra controle.

As Figuras 04, 05, 06, 07, 08 e 09, demonstram os resultados de inibição para as seis amostras que apresentaram atividade fungitóxica. É possível verificar a partir dos resultados, um aumento gradual dos valores de inibição do crescimento fúngico atrelado à elevação das concentrações em estudo.

Os resultados obtidos (Tabela 02) permitem concluir que apenas um composto apresentou inibição total do crescimento micelial na faixa de concentração trabalhada (0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL e 4 µg/mL), sendo este composto identificado como HQN (estrutura na Figura 3) com MIC de aproximadamente 2 µg/mL.

Tabela 01. Efeito *in vitro* de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*.

Amostras	Concentração (µg/mL)					
	Controle	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
HQN	5,50 a	4,17 b	3,69 b	3,60 b	0,00 c	0,00 c
MAN	5,50 a	5,32 a	3,58 b	3,22 b	2,91 c	2,58 c
RD6	5,50 a	5,00 a	4,50 b	3,50 c	3,10 d	2,80 d
EGG	5,50 a	3,82 b	3,79 b	3,61 b	3,58 b	3,30 b
ANPB	5,50 a	5,37 a	5,00 b	4,61 b	4,14 c	3,66 d
R14	5,50 a	5,20 a	4,50 b	4,40 b	4,39 b	3,80 c

Médias seguidas por letras distintas na horizontal diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott

Não foram encontrados na literatura ensaios de inibição do crescimento de *M. pernicioso* pelos compostos orgânicos utilizados no ensaio, no entanto existe amplo conhecimento da ação fungitóxica de substâncias orgânicas em outras espécies de fungos. Pode-se citar que, em ensaio realizado com as papulacandinas L-687 e L-781, foi detectada atividade biológica destes compostos contra espécies de *Candida*, onde os valores de MIC encontrados situaram-se na faixa de 0,02 a 2 µg/mL (BARTIZAL, 1992). Foi revelado também que a papulacandina B apresentava atividade fungicida contra *Schizosaccharomyces pombe*, atividade esta grandemente relacionada à presença das cadeias lipídicas e dos resíduos fenólicos contidos na molécula da papulacandina B (VARONA, R.; PÉREZ, P.; DURÁN, 1983). Em trabalho realizado por Souza (2010), análogos da papulacandina apresentaram CIM de 200 µg/mL para espécies de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

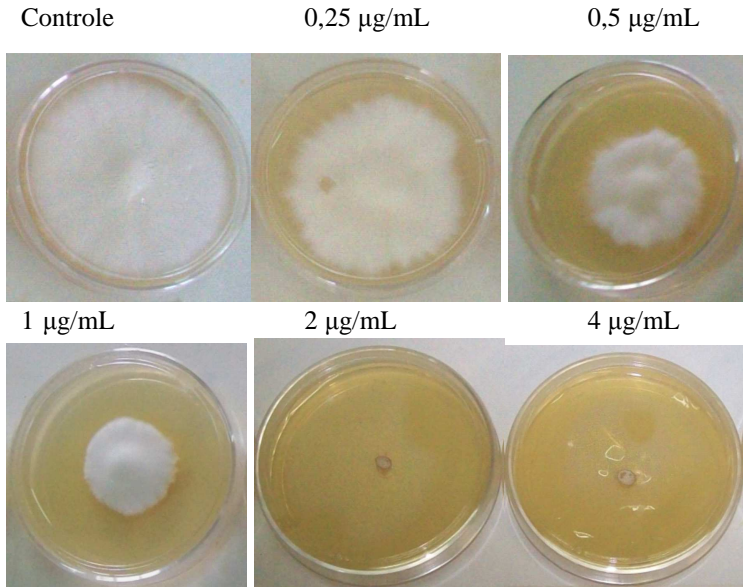


Figura 03: Atividade antifúngica do composto HQN (estrutura localizada na figura 3)

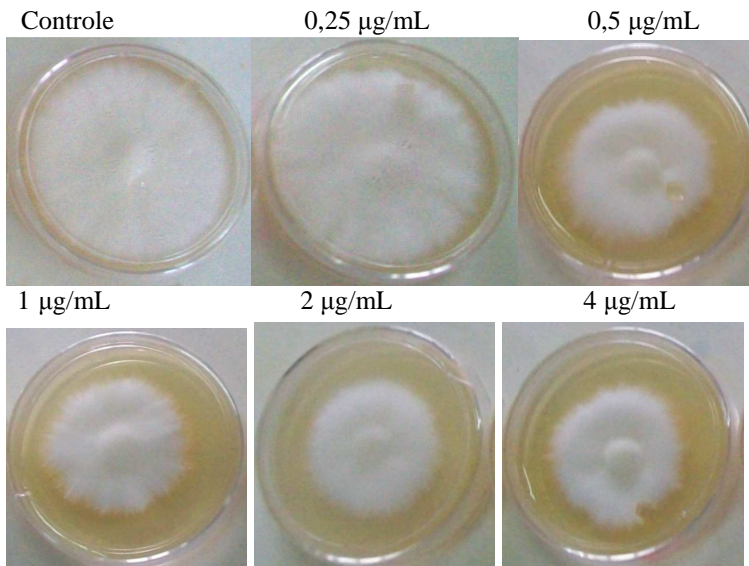


Figura 04: Atividade antifúngica do composto MAN (estrutura localizada na figura 3)

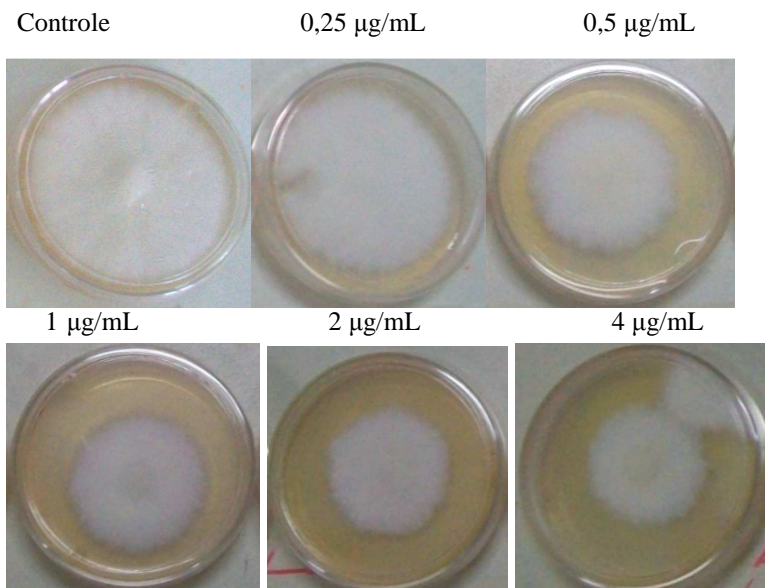


Figura 05: Atividade antifúngica do composto RD6 (estrutura localizada na figura 2)

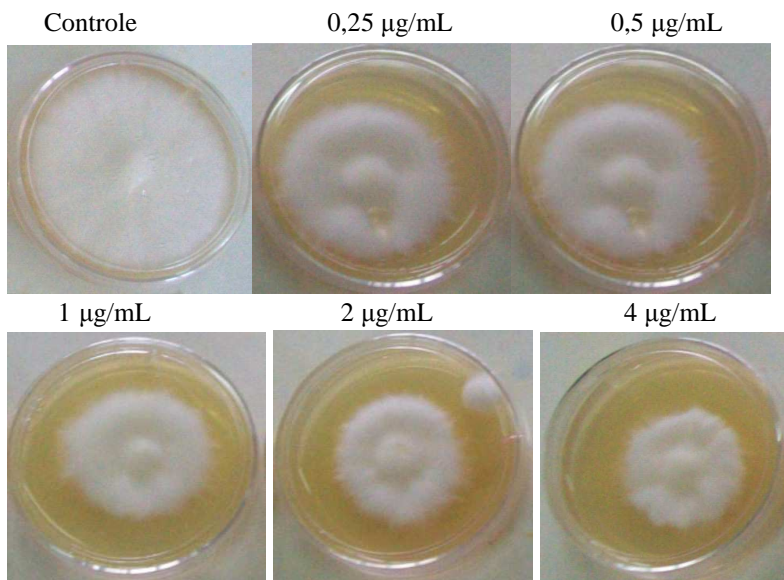


Figura 06: Atividade antifúngica do composto EGG (estrutura localizada na Figura 3)

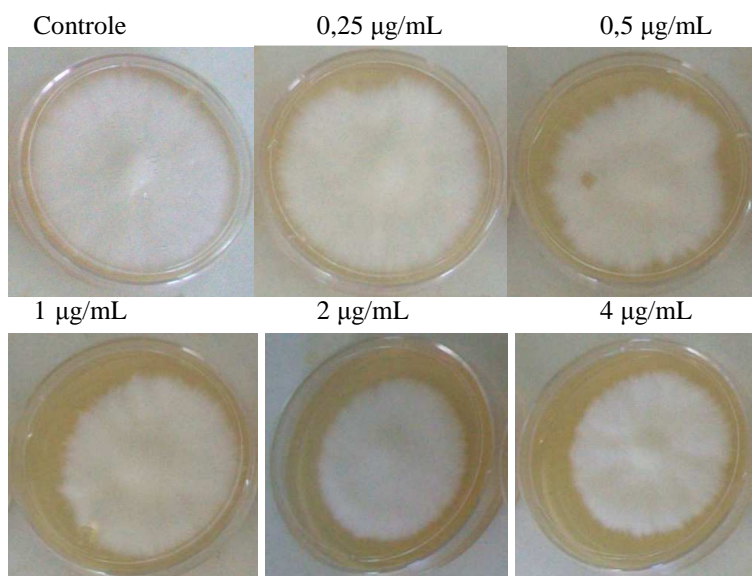


Figura 07: Atividade antifúngica do composto ANPB (estrutura localizada na figura 3)

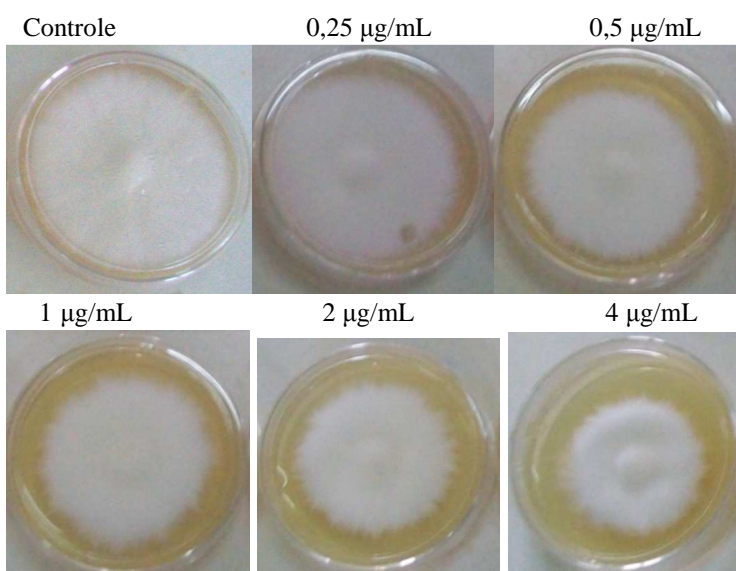


Figura 08: Atividade antifúngica do composto R14 (estrutura localizada na figura 2)

Tabela 02 – Efeito *in vitro* (% de inibição) de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*.

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento micelial (%)
HQN	
0,25	24,0
0,5	32,0
1,0	34,0
2,0	100,0
4,0	100,0
MAN	
0,25	-
0,5	32,7
1,0	39,0
2,0	45,0
4,0	51,0
RD6	
0,25	9,0
0,5	18,0
1,0	36,0
2,0	43,0
4,0	49,0
EGG	
0,25	29,0
0,5	29,0
1,0	33,0
2,0	34,0
4,0	38,0
ANPB	
0,25	-
0,5	7,0
1,0	14,0
2,0	23,0
4,0	32,0
R14	
0,25	-
0,5	18,0
1,0	20,0
2,0	20,0
4,0	30,0

-: inativo

As cadeias lipídicas auxiliam no processo de entrada destes compostos na célula fúngica, tendo em vista a relação favorável dos compostos lipídicos com a membrana celular. A atividade fungicida das papulacandinas geralmente é direcionada aos fungos filamentosos, no entanto o que se sabe é que existe uma susceptibilidade variada conforme a espécie em questão, geralmente os zigomicetos

e outros fungos que apresentam reduzida produção de beta(1,3)-D-glicano mostram-se menos susceptíveis à ação destes fármacos (QUINDÓS, 2007).

Os estudos da inibição do crescimento fúngico de *M. pernicioso* por derivados azoles realizados por Mota et al., (2010), usando substâncias como ciproconazol, tebuconazol e metconazol, a metodologia utilizada foi a de difusão em disco com utilização de suspensão homogênea de UFC's (Unidades Formadoras de Colônias), sendo assim de difícil comparação com os resultados obtidos neste trabalho (MOTA; BARROS; CASTILHO, 2010).

Tratando-se de um inibidor da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase, existem restrições na relação entre o processo de redução do crescimento micelial e a inibição da ação enzimática (queda da produção de glicanos), pois, racionalmente presume-se que, nem sempre os valores de MIC são correspondentes aos dados de inibição enzimática (KURTZ; REX, 2001). Contudo, pode-se inferir que a baixa atividade inibitória do crescimento micelial fúngico na maioria das 23 moléculas testadas, pode estar atribuída à ausência de grupos farmacofóricos relevantes para o processo de inibição da enzima beta(1,3)-D-glicano sintase. Conforme visualizado nas Figuras 1, 2 e 3 pode-se perceber que, existem nos compostos a presença característica dos grupamentos lipofílicos e glicosídicos, no entanto, os compostos estudados não apresentam as duas cadeias de carbono insaturadas (cadeias de ácido graxo) que são consideradas muito importantes para a atividade antifúngica dos glicolipídios (HAMDOUCHI et al, 2002; VARONA, R.; PÉREZ, P.; DURÁN, 1983).

Outros processos podem estar relacionados à baixa eficácia antifúngica relacionada compostos à maioria dos compostos testados, como: a possibilidade do aumento compensatório da síntese de quitina em circunstâncias onde há inibição da produção de glicanos (WALKER et al, 2008), sendo que, a ativação da síntese de quitina mediada pela proteína quinase é capaz de reduzir a susceptibilidade do micro-organismo aos glicolipídeos (WALKER et al, 2008).

A substância que apresentou melhor perfil de atividade contra *M. pernicioso* foi a HQN, esta apresenta estruturalmente dois anéis fundidos (piridina e fenólico). Apesar do valor de 2 µg/mL de CIM, não foi possível investigar se esta ação está relacionada ao processo de inibição da enzima beta(1,3)-glicano sintase, para esta pesquisa, seria necessário um ensaio com a substância HQN juntamente com a

proteína purificada (AWALD et al, 1994) ou membranas microssomais que contenham a enzima (DOUGLAS et al, 1992).

CONCLUSÕES

Glicolípídeos são compostos que fazem parte de uma nova e importante geração de fármacos antifúngicos, cujo modo de ação é ligar-se a enzima beta(1,3)-D-glicano sintase levando à redução da síntese de beta(1,3)-D-glicano, e dessa forma, promovendo danos para a integridade da parede celular, apesar da seletividade deste mecanismo de ação não existem registros da utilização destas substâncias no tratamento da Doença-de-Bruxa.

Os resultados permitem concluir que o composto HQN é um candidato promissor para participar das etapas seguintes do processo de desenvolvimento de um fármaco antifúngico.

A partir de estudos relacionados ao esclarecimento do mecanismo de ação inibitória do crescimento micelial fúngico por substâncias orgânicas, novos compostos poderão surgir com atividade biológica satisfatória, este processo envolve tanto as etapas laboratoriais ou experimentais como a purificação da beta(1,3)-D-glicano sintase, realização de ensaios enzimáticos, realização de ensaios *in vivo*, quanto as etapas *in silico*, como modelagem estrutural da beta(1,3)-D-glicano sintase, determinação do seu sítio catalítico, realização de estudos de acoplamento molecular.

REFERÊNCIAS

- AWALD, P et al. Beta-1,3-D-glucan synthase activity of *Neurospora crassa*: identification of substrate-binding protein. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1201, p. 312-320. 1994.
- BALACHARI, D.; O'DOHERTY, D. Sharpless Asymmetric Dihydroxylation of 5-Aryl-2-vinylfurans: Application to the Synthesis of the Spiroketal Moiety of Papulacandin D. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 4151–4155. 2005.
- BARTIZAL, K. et al. In Vitro Antifungal Activities and In Vivo Efficacies of 1,3-D-Glucan Synthesis Inhibitors L-671,329, L-646,991, Tetrahydroechinocandin B, and L-687,781, a Papulacandin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, N. 8, p. 1648-1657, 1992.
- CANETERO, J.C. ET AL. New approach to the stereoselective synthesis of the spiroketal moiety of papulacandins. **Tetrahedron**, v. 55, n. 52, p. 15159-15166. 1999.
- COUTO, V.A. **O Território do Cacau no Contexto da Mundialização**. Salvador: Bahia Análise & Dados. v. 9, n. 4, p. 38-52, 2000.
- DESNOS-OLLIVIER, M. et al. Mutations in the *fkp1* Gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antifungal Susceptibility testing. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n, 9, p. 3092-3098, 2008.
- DOUGLAS, C. et al. Activity of a new echinocandin, L-688,786, against filamentous fungi. **Microbiol. American Society for Microbiology**, v. 7, p. 999-108, 1992.
- ELEANOR M. S, JAMES A.B et al. Biosynthesis of the Yeast Cell Wall. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 255, n. 3, p. 888-894, 1980.
- GEORGOPAPADAKOU, N. H., TKACZ, J. S. The fungal cell wall as a drug target. **Tren. Microbiol.** v. 3, n. 3, p. 98-104, 1995.
- HAMDOUCHI, C. et al. A novel approach to the regioselective acylation of spirocyclic C-glucoside of papulacandins. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 3875–3878, 2002.
- KURTZ, M.B; REX, J.H. Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. In: RICHARDS F.M; EISENBERG, D.S; KIM, P.S (Org.). **Advances in protein chemistry: drug discovery and design**. Pennsylvania: Academic Press. v. 56, p. 424-475. 2001.
- MOCHALKIN, I. et al. Characterization of substrate binding and catalysis in the potential antibacterial targets N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (GlmU). **Protein Science**. v. 16, p. 2657-2666, 2007.

MOTA, S.G. R.; BARROS, T. F.; CASTILHO, M.S. *In vitro* screening and chemometrics analysis on a series of azole derivatives with fungicide activity against moniliophthora perniciosa. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 21, n. 3, p. 510-519, 2010.

PARK, S et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida sp.* Isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3264-3273, 2005.

PIROVANI, C. P et al., Knowledge Discovery in genome database: the chitin metabolic pathway in *Crinipellis Perniciosa*. **Proceedings of International Symposium on Mathematical and Computational Biology**. 2005.

QUINDÓS, G; ERASO E. Atividade antifúngica in vitro de la anidulafungina. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 24. p. 83-91.

RUBINI, M.R et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 24-33, 2005.

SOBERANIS, W. et al. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cocoa (*Theobroma cacao* L.) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protection**, v. 18, p. 667-685, 2000.

SOUZA, Thiago Belarmino de. **Síntese de análogos da papulacandina D por simplificação molecular e avaliação de sua atividade Antifúngica**. 2010. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VARONA, R.; PÉREZ, P.; DURÁN, A. Effect of papulacandin B on β -glucan synthesis in *Schizosaccharomyces pombe*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 20, n. 2, p. 243-247, 1983.

WALKER L.A et al. Fungal echinocandin resistance. **Fungal Genetics and Biology**. v. 47, p. 117-126. 2010.

YOUNG-SIL H., SARAH F. C, MICHELLE M. Fks1, the 1,3- β -Glucan Synthase from the Caspofungin-Resistant Fungus *Fusarium solani*. **Eukaryot Cell**. v. 5, n. 7, p. 1036-1042, 2006.

CAPÍTULO 4⁴

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *MONILIOPHTORA* *PERNICIOSA* POR EXTRADOS DE *LIPPIA* E *HYPTIS*

⁴ Artigo será submetido à Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *MONILIOPTHORA PERNICIOSA* POR EXTRATOS DE *LIPPIA* E *HYPTIS*

RESUMO

A lavoura cacaueteira enfrenta uma redução em sua produção desde 1989 com a chegada da praga denominada vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*. Extratos vegetais tem se tornado uma estratégia bastante utilizada na agricultura para o controle do crescimento de microorganismos patogênicos, tendo em vista o crescente processo de resistência aos produtos sintéticos e dos prejuízos ambientais atrelados ao uso desse tipo de manejo. Trabalhos desenvolvidos com extratos brutos ou óleos essenciais, obtidos a partir de plantas medicinais têm indicado o potencial destes produtos no controle de fitopatógenos. A atividade antimicrobiana dos gêneros *Lippia* e *Hyptis* é largamente conhecida. Neste trabalho objetivou-se avaliar a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* por extratos de *Lippia* sp. e *Hyptis* sp. O crescimento micelial foi aferido após o cultivo de um disco de 0,5 cm do fungo em placas contendo meio BDA com concentrações de 4000 µg/mL, 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL dos extratos em estudo. A concentração inibitória mínima foi considerada aquela onde existiu inibição de 100% do crescimento micelial. Todas as amostras testadas apresentaram atividade fungitóxica, com destaque para as amostras da espécie *L. alnifolia* que apresentou a menor CIM (1000 µg/mL). De acordo com os resultados obtidos, a utilização de extratos vegetais pode configura-se como uma alternativa de baixo custo e segura do ponto de vista toxicológico e ambiental para o controle do fungo patogênico *M. perniciosa*.

Palavras-chave: *Lippia*, *Hyptis*, *Moniliophthora perniciosa*, fungo, inibição, vassoura-de-bruxa

ABSTRACT

The cocoa crop shows a reduction in your production since 1989 with the advent of the pests termed Witches' Broom Disease, caused by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. Vegetal extracts have become a strategy widely employed in agriculture to control the growth of pathogenic microorganisms given the process growing of resistance to synthetic products and environmental harm linked to the use of this type of management. Studies carried with raw extracts or essential oils obtained starting from medicinal herbs has shown the potential of such products in the control of phytopathogens. The genus antimicrobial activity from *Lippia* and *Hyptis* it is wide known. The objective this study to evaluate *in vitro* inhibition of mycelial growth of *M. perniciosa* by extracts from *Lippia* and *Hyptis*. Mycelial growth was assessed after cultivation of a disk of 0.5 cm from the fungus in Petri dishes containing PDA medium with concentrations of 4000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL of the compounds under study. The MIC was considered one which there was 100% inhibition of mycelial growth. All tested samples had fungitoxic activity, particularly the samples from *L. alnifolia* species showed the lowest MIC (1000

µg/mL). According with the results obtained, the use of plant extracts could be configured such as toxicological and environment safer, and alternative lower cost for to control the fungal pathogen *M. perniciosus*.

Keywords: *Lippia*, *Hyptis*, *Moniliophthora perniciosa*, fungi, inhibition, Witches' Broom, antifungals

INTRODUÇÃO

Atualmente existe uma diminuição considerável da produção mundial de cacau em função das infecções fúngicas (ANEJA et al, 2005; MEINHARDT et al, 2008; MEJIA et al, 2008). No início do século XX o estado da Bahia no Brasil era um dos maiores produtores de cacau do mundo (LASS, 1985). Após a disseminação da doença da vassoura-de-bruxa houve uma grande queda na produção cacaueira na Bahia, de forma que, no ano de 2000 foi registrada uma redução de 50% da colheita (FAO, 2002).

Como resultado dessa limitação, é possível constatar prejuízos econômicos diretos conseqüentes da menor produção de cacau: como alteração no uso da terra, venda de propriedades, nível de emprego e danos ao meio ambiente. Neste sentido, os governos e produtores vêm discutindo medidas para resolver ou atenuar o problema nas lavouras de cacau. Atualmente, uma das recomendações da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) para a recuperação de plantas suscetíveis à vassoura-de-bruxa é o uso de variedades clonais resistentes, por meio da enxertia, combinado com aplicação de fungicidas cúpricos, como o óxido cuproso, para o controle da doença (ROSA, 1998).

A doença da vassoura-de-bruxa é causada pelo fungo *M. perniciosus*, que apresenta duas fases bem características: uma parasítica (vassoura-verde, com micélio monocariótico e intercelular) e outra saprofítica (vassoura-seca, com micélio dicariótico e intracelular). Esta enfermidade tem grande importância no Brasil, principalmente, na Amazônia e na região sul da Bahia, pois foi responsável por reduzir de maneira significativa a produção de cacau, resultando numa crise econômica, na qual esta localidade era fortemente dependente da exportação das sementes de cacau para fabricação de chocolate (COUTO, 2000).

Os mecanismos bioquímicos e fisiológicos de resistência do cacauzeiro ao *M. pernicioso* são praticamente desconhecidos (NOJOSA et al., 2003) e atualmente as medidas de controle químico, biológico e as podas fitossanitárias, são insipientes na erradicação da doença (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Existe uma restrição quanto ao uso de fungicidas sintéticos, devido à fitotoxicidade, efeitos residuais, espectro de ação, e resistência pelo patógeno, e esse fato tem levado a procura de biofungicidas, tais como, extratos vegetais e óleos essenciais, sendo este tipo de procedimento bastante promissor no controle de fitopatógenos em diversas culturas (BENATO et al, 2000).

As plantas aromáticas são usadas por gerações não apenas como ingredientes alimentares, mas também para o tratamento de uma infinidade de patologias, têm sido amplamente publicado que diversas ervas e óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana (TOGNOLINI et al, 2006). Os óleos essenciais são misturas de compostos naturais voláteis oriundos do metabolismo secundário de plantas, compostos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos), são isolados pela metodologia de destilação a vapor e suas propriedades antibacterianas e antifúngicas são conhecidas desde a antiguidade (LOPES-LUTZ et al, 2008).

Alguns dos obstáculos limitantes para a melhor utilização dos extratos vegetais são: a variação de sua composição por conta de fatores relacionados às espécies em questão ou fatores ambientais e a complexa composição química destes óleos, estas questões dificultam o processo de isolamento e identificação dos compostos bioativos. (ALVIANO; ALVIANO, 2009). De forma que, muitas vezes é conhecida a ação antifúngica de um óleo essencial, mas, não se conhece o mecanismo de ação.

Extratos vegetais derivados de espécies do gênero *Lippia* apresentam atividade antifúngica amplamente descrita na literatura, espécies como: *L. alba*, *L. alba f. intermedia* e *L. origanoides*, apresentaram ótimos resultados de zonas de inibição de crescimento fúngico para as espécies de *Candida albican*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyllum rubrum*, e *Fonsecaea pedrosoi* (OLIVEIRA et al, 2006; OLIVEIRA et al, 2007).

Extratos vegetais obtidos a partir do gênero *Hyptis* também mostraram atividade relacionada à diminuição do crescimento fúngico. É possível relatar que a

partir de *Hyptis suaveolens* foram obtidos óleos que diminuíram o crescimento micelial *in vitro* de espécies do gênero *Aspergillus* (MOREIRA et al, 2010), de forma similar *Hyptis ovalifolia* apresentou atividade antifúngica contra os dermatófitos: *M.canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* (SOUZA, 2003).

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* por extratos e óleos essências de *Lippia sp.* e *Hyptis sp.*

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos de inibição *in vitro* do crescimento micelial do fungo *M. perniciosa* foram realizados no Laboratório de Enzimologia (LAEN), localizado na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana/BA.

Coleta das Plantas

O material botânico (Tabela 1) foi coletado em diferentes localidades do estado da Bahia e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) e identificada pela Prof^a Dra. Tânia Regina Silva.

Tabela 01 : Data, local de coleta e identificação das espécies de *Lippia* e *Hyptis* coletadas no Semi-árido da Bahia em diferentes épocas do ano estudadas no presente trabalho

AMOSTRA	DATA DA COLETA	LOCAL DA COLETA	IDENTIFICAÇÃO
LMA	30/4/2006	Mucugê	<i>L. microphylla</i> Cham.
LMB	18/8/2006	Rio de Contas	<i>L. microphylla</i> Cham.
LAA	18/8/2006	Rio de Contas	<i>L. alnifolia</i> Schauer
LTA	19/8/2006	Rio de Contas	<i>L. thymoides</i> Martius & Schauer
LTB	20/12/2006	Feira de Santana	<i>L. thymoides</i> Martius & Schauer
LAB		Feira de Santana	<i>L. alnifolia</i> Schauer
HF		Feira de Santana	<i>Hyptis fruticosa</i> Salzm ex Benth

Obtenção dos extratos brutos

Os extratos brutos foram preparados no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON/UEFS) pela Msc Cristiana da Purificação Pinto. Os órgãos das espécies selecionadas foram secos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até peso constante, para estabilização do material e foram pulverizadas em moinho de facas. As extrações foram obtidas a partir de folhas e caules, através de maceração em recipientes de vidro utilizando-se como solvente o metanol, por cerca de 10 dias. Os extratos brutos foram concentrados em evaporadores rotatórios, sob pressão reduzida, em temperaturas relativamente baixas (40-42°C). O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão. A água residual presente em alguns extratos foi liofilizada para, então, serem armazenados em frascos de vidro.

Obtenção dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos das folhas e caules pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 3 horas. Os óleos obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro e armazenados a baixa temperatura (-20 C) até o momento da análise.

Micro-organismo

O fungo *M. perniciosus* (CCMB 0257) foi gentilmente cedido pela Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB).

Preparação das amostras

Diferentes concentrações dos extratos e óleos essenciais de *Lippia* e *Hyptis* foram preparadas através da dissolução dos mesmos em volumes adequados. O diluente utilizado foi o metanol esterilizado por filtração em membrana filtrante com porosidade de 0,22 µm. Após este processo, em capela de fluxo laminar, as

soluções obtidas foram dissolvidas assepticamente em meio estéril BDA fundente de forma a se obter concentrações de 250, 500, 1000, e 4000 µg/mL.

Instalação do ensaio

A realização dos ensaios de inibição *in vitro* do crescimento micelial foi executada pelo método de diluição em Agar (SOYLU et al. 2007) com posterior avaliação da taxa de crescimento radial (ZAMBONELLI et al., 1996). Os meios de cultura com as diferentes concentrações obtidas foram transferidos para placas de *Petri*. Discos de ágar de 5 mm de diâmetro do crescimento ativo do micélio de *M. perniciosus*, ou seja, retirados região periférica do micélio após 13 dias de crescimento, foram transferidos individualmente para o centro de cada uma das placas componentes de cada concentração e incubadas a 28°C em estufa. Placas de *Petri* com apenas BDA e metanol foram utilizados como controle positivo de crescimento.

Avaliação

A avaliação do crescimento micelial foi realizada após 11 dias de incubação. O efeito dos extratos sobre o crescimento micelial foi quantificado através de medições do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametricamente opostas) tendo como referência o desenvolvimento da placa controle, sendo posteriormente calculada uma média dos valores obtidos. Foram realizados cinco tratamentos e três repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC). As médias de diâmetro da colônia aferidas na etapa anterior foram expressas em porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM), usando a fórmula, $MGI (\%) = [(d_c - d_t) / d_c] \times 100$, onde d_c = significa o diâmetro de crescimento micelial encontrado em placas de *Petri* contendo o controle positivo e d_t significa o diâmetro de crescimento micelial a partir de placas de *Petri* contendo os óleos essenciais (PANDEY et al., 1982). A concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos ou extratos foi considerada a menor concentração que resultou em 100% de inibição no crescimento micelial (DAOUK, et al 1995).

Análise de dados

Os dados obtidos foram analisados através do programa SISVAR – Sistema de Análise de Variância (FERREIRA, 2000), onde foi realizada a análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados de inibição tratados estatisticamente e visualizados na tabela 2, assim como visto nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5, pode-se observar que, quando comparadas com o controle, as amostras revelaram graus diferenciados de inibição do crescimento micelial do fungo *M. pernicioso*.

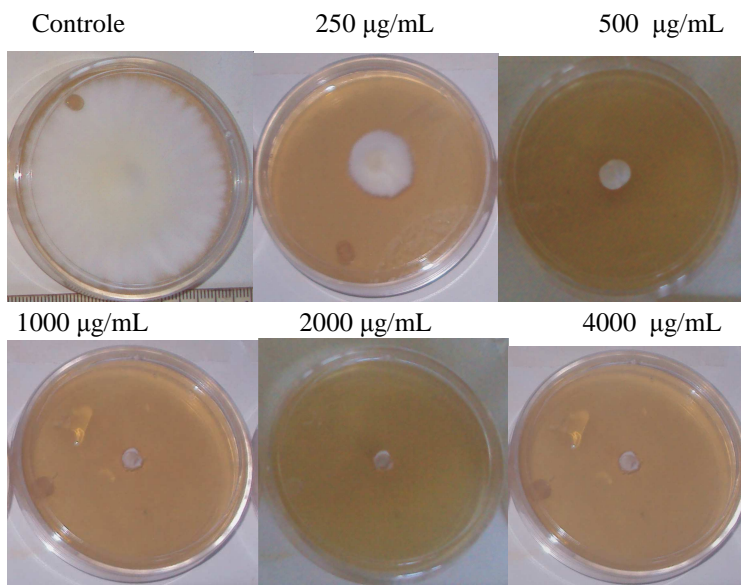


Figura 1: Atividade antifúngica do extrato metanólico das folhas *L. microphylla* (LMA).

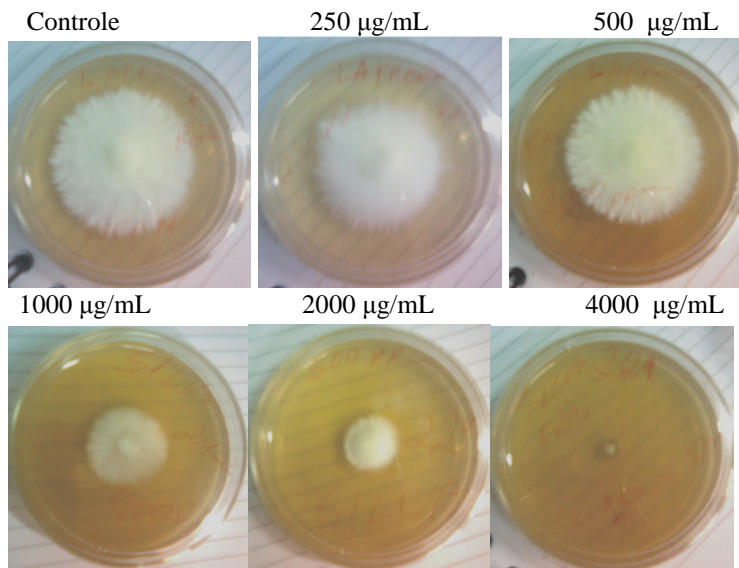


Figura 2: Atividade antifúngica do extrato metanólico das folhas de *L. microphylla* (LMB).

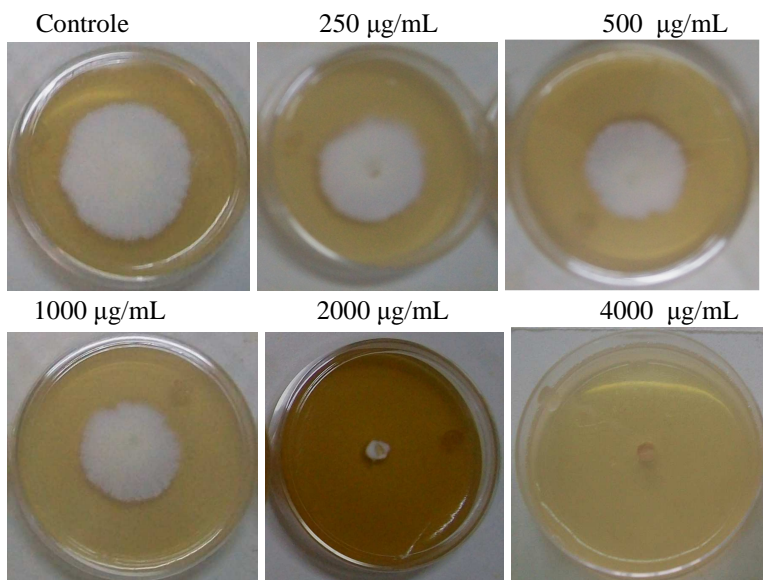


Figura 3: Atividade antifúngica do extrato metanólico do caule de *L. thymoides* (LTA).

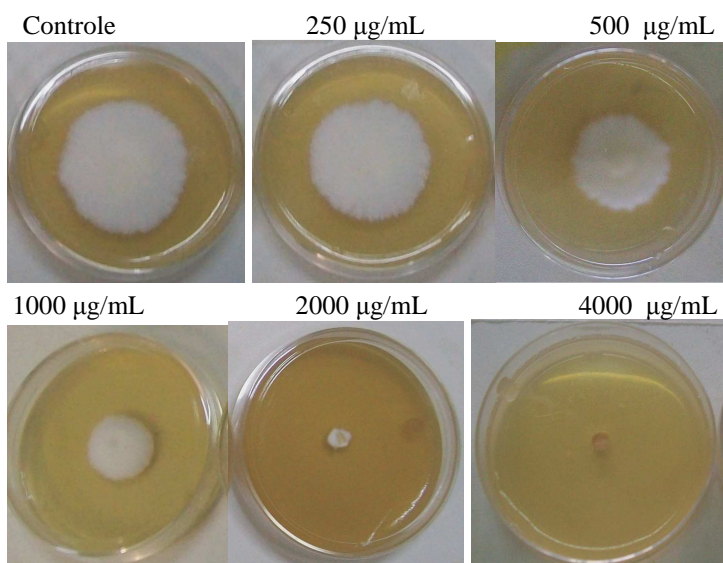


Figura 4: Atividade antifúngica do extrato metanólico do caule *L. alnifolia* (LAA).

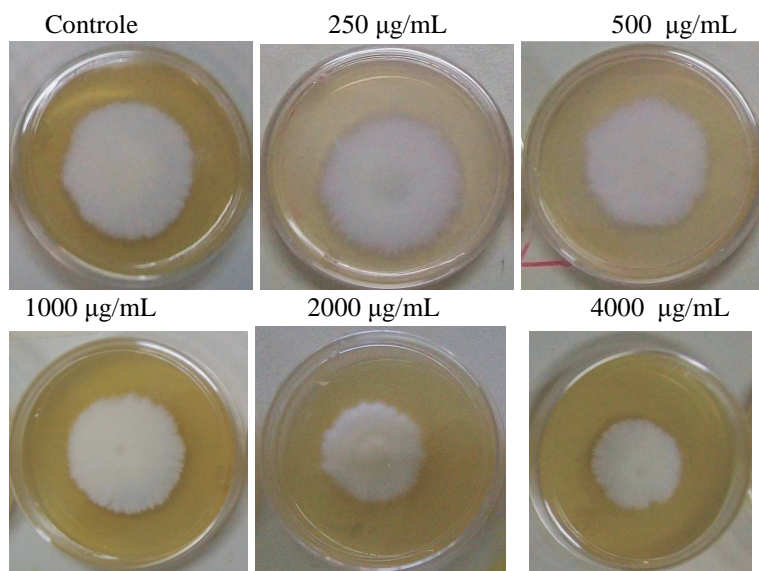


Figura 5: Atividade antifúngica do extrato metanólico das folhas de *L. thymoides* (LTB).

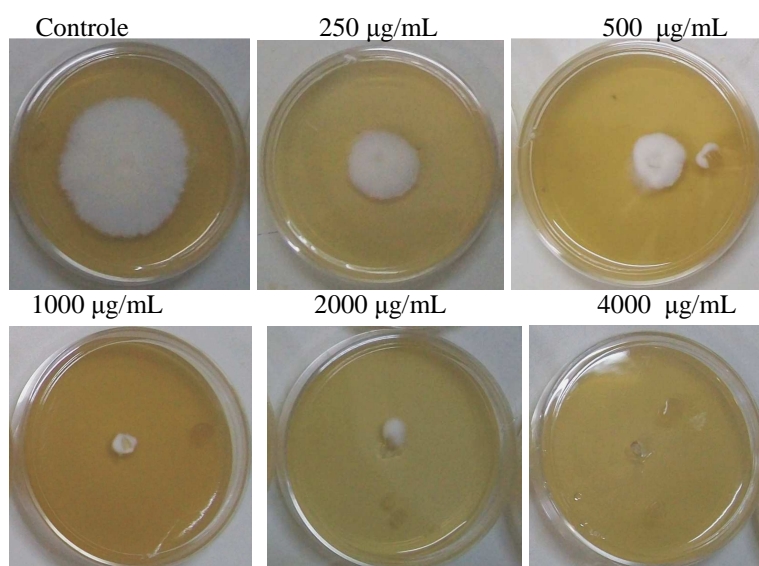


Figura 6: Atividade antifúngica do óleo essencial de folhas *L. alnifolia* (LAB).

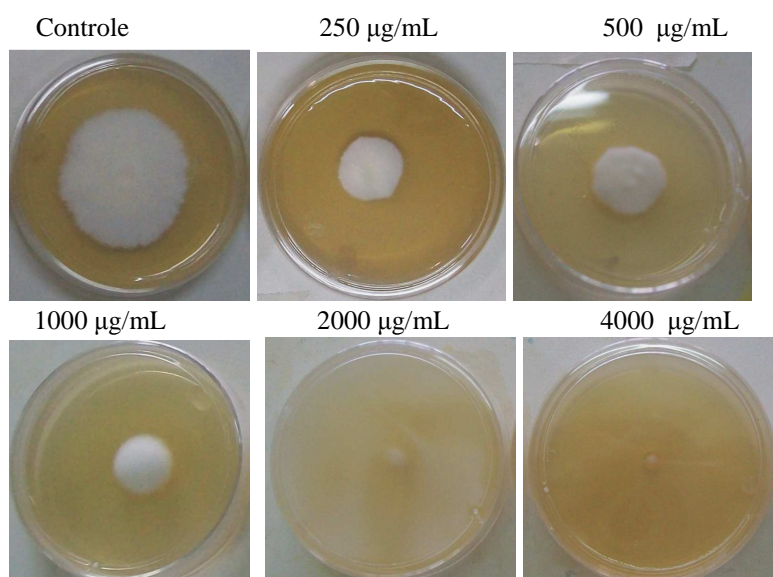


Figura 7: Atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Hyptis fruticosa* (HF)

Conforme visualizado nas Tabelas 2 e 3, é possível observar que, as amostras das espécies de *L. microphylla* (extratos de folhas de LMA e de folhas de LMB), de *L. alnifolia* (extrato de caules de LAA e óleo essencial de folhas de LAB), de *L. thymoides* (extrato de caules de LTA), e *Hyptis fruticosa* (óleo essencial de folhas de HF), apresentaram resultados de inibição total do crescimento micelial (CIM) em concentrações abaixo de 4000 µg/mL.

Tabela 02. Efeito *in vitro* de extratos vegetais sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*.

Amostras	Crescimento radial (mm)						
	Concentração (µg/mL)	Controle	250	500	1000	2000	4000
Folhas de LMA		6,58 a	2,52 b	1,01 c	0,21 d	0,00 e	0,00 e
Caule de LMA		6,58 a	6,15 a	6,25 a	6,29 a	6,26 a	6,44 a
Folhas de LMB		5,40 a	5,95 a	5,89 a	3,80 b	2,56 c	0,00 d
Caule de LMB		5,40 a	5,54 a	5,65 a	5,48 a	5,61 a	5,48 a
Folhas de LAA		4,84 a	3,84 b	3,87 b	3,07 c	1,01 d	0,98 d
Caule de LAA		4,84 a	3,65 b	2,81 c	0,91 d	0,00 e	0,00 e
Folhas de LTA		4,84 a	4,61 a	4,69 a	4,71 a	4,78 a	4,77 a
Caule de LTA		4,84 a	3,18 b	3,08 b	2,71 c	2,41 d	2,07 d
Folhas de LTB		4,84 a	4,68 a	4,00 b	3,68 c	3,06 d	3,03 d
Caule de LTB		4,84 a	4,77 a	4,78 a	4,81 a	4,75 a	4,73 a
Óleos essenciais							
Folhas de LAB		4,50 a	2,90 b	1,50 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d
Folhas de HF		4,50 a	2,20 b	2,30 b	1,90 c	0,00 d	0,00 d

Médias seguidas por letras distintas na horizontal diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott

Analisando-se a Tabela 3, onde estão demonstradas as percentagens de CIM, calculadas a partir da metodologia de Pandey et al (1982), é possível perceber que as amostras folhas de LMA, Folhas de LMB, Folhas de LAA, Caule de LAA, Caule de LTA, Folhas de LTB, Folhas de LAB, e Folhas de HF apresentaram atividade fungitóxica, bem como há uma tendência de aumento do percentual da inibição do crescimento micelial com o aumento da concentração das amostras vegetais. Foi possível observar também que, em algumas das concentrações testadas dos extratos de caules de LMA, caules de LMB, folhas de LTA, folhas de LTB e caules de LTB não houve diferença significativa dos resultados encontrados

em relação aos do controle (geralmente as concentrações mais baixas, 250 e 500 µg/mL).

De acordo com os dados plotados na Tabela 3 foi possível visualizar que o óleo essencial obtido de *L. alnifolia* (LAB) apresentou o menor valor de CIM (1000 µg/mL). De forma complementar, a amostra do extrato metanólico desta mesma espécie, obtida a partir do caule de *L. alnifolia* (LAA), apresentou CIM de 2000 µg/mL e assim como na amostra do óleo essencial, valores elevados de porcentagens de inibição do crescimento micelial (24,62%, 42,02%, 81,30%, 100,0% e 100,0%). Não existem relatos na literatura de outros estudos descrevendo os resultados da atividade de inibição do crescimento micelial de *M. perniciosus* pela *L. alnifolia*, porém, as propriedades antimicrobianas deste gênero são bastante conhecidas (BASSOLE et al, 2003; VILJOEN et al, 2005), além disso, foram obtidos trabalhos que descreveram a atividade antifúngica de outras espécies deste gênero, como o estudo realizado por Fontenelle et al (2007), onde, 1250 µg/mL foi o valor de CIM obtido para a *Candida tropicalis* através do ensaio com o óleo essencial de *Lippia sidoides*, este óleo também apresentou atividade biológica contra as espécies de *Candida tropicalis* e *M. canis*.

A amostra de óleo essencial da espécie *Hyptis fruticosa* apresentou máxima inibição do crescimento micelial nas concentrações de 2000 µg/mL e 4000 µg/mL. Não foi possível encontrar na literatura valores de MIC relacionados à *Hyptis fruticosa* contra *M. perniciosus*, no entanto, Malele et al (2003) relataram uma forte atividade antifúngica para o óleo de *H. suaveolens* nas concentrações 500 e 1000 µg/mL contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor sp.* e *Fusarium moniliforme*, enquanto Asekun et al. (1999) relataram que o óleo das folhas de *H. suaveolens* (500 µg/mL / L) apresentaram atividade inibitória significativa contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), e leveduras (*Candida albicans*). Recentemente Moreira et al (2010) obtiveram resultados de inibição de cepas do gênero *Aspergillus* em concentrações de 80 µg/mL do óleo essencial derivado da espécie *Hyptis suaveolens*.

Tabela 03 – Efeito *in vitro* (% de inibição) de extratos vegetais e óleos essenciais sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*.

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento micelial (%)	Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento micelial (%)
Folhas de LMA		Caules de LTA	
250	61,7	250	34,3
500	84,7	500	36,4
1000	96,9	1000	44,0
2000	100,0	2000	50,20
4000	100,0	4000	57,2
Caules de LMA		Folhas de LTB	
250	-	250	-
500	-	500	17,4
1000	-	1000	24,0
2000	-	2000	36,8
4000	-	4000	37,3
Folhas de LMB		Caules de LTB	
250	-	250	-
500	-	500	-
1000	29,6	1000	-
2000	52,6	2000	-
4000	100,0	4000	-
Caules de LMB		Óleos essenciais	
250	-		
500	-		
1000	-		
2000	-		
4000	-		
Folhas de LAA		Folhas de LAB	
250	20,7	250	35,5
500	20,0	500	66,7
1000	36,6	1000	100,0
2000	79,1	2000	100,0
4000	79,7	4000	100,0
Caules de LAA		Folhas de HF	
250	24,6	250	51,1
500	71,5	500	48,9
1000	81,2	1000	57,8
2000	100,0	2000	100,0
4000	100,0	4000	100,0
Folhas de LTA			
250	-		
500	-		
1000	-		
2000	-		
4000	-		

-: inativo (valores de crescimento radial praticamente iguais ao valor do controle com base no ensaio estatístico, porcentagem de inibição não calculada)

Conforme relatado por Knobloch et al. (1989), as propriedades lipofílicas dos óleos essenciais podem ter auxiliado na atividade fungitóxica das amostras analisadas, pois auxiliam o processo de entrada na membrana plasmática. Além disso, existe a possibilidade de sinergismo entre os diferentes componentes do óleo na atividade antifúngica (FRENCH, 1985). O mecanismo de ação antifúngica dos óleos essenciais pode estar relacionado a dois mecanismos diferentes: um está envolvido com a destruição irreversível da membrana celular e o consequente vazamento de eletrólitos, aminoácidos e açúcares, o outro está atrelado à inserção seletiva dos óleos essenciais em regiões lipídicas da membrana perturbando sua atividade (INOUE et al, 2000).

Existiram diferentes resultados relacionados aos extratos obtidos a partir das folhas e do caule das espécies *L. microphylla*, *L. alnifolia* e *L. thymoides*, isso pode ser explicado pelas diferentes composições encontradas nos extratos provenientes destas diferentes porções anatomo-vegetais, de forma que, os dados adquiridos no estudo poderão direcionar a utilização do órgão que melhor apresentou resultados de inibição do crescimento micelial frente a *M. perniciosa*.

As amostras de folhas de e LMA e LMB, apesar de oriundas da mesma espécie *L. thymoides*, apresentaram resultados de CIM de 2000 µg/mL e 4000 µg/mL respectivamente. Estas variações nos resultados, possivelmente ocorreram em função das coletas terem sido realizadas em períodos e locais distintos, pois a composição química de extratos vegetais pode ser alterada em resposta a fatores genéticos ou edafo-climáticos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

CONCLUSÕES

Considerando os baixos custos, os mínimos riscos ambientais e toxicológicos da utilização de produtos vegetais, os resultados obtidos neste estudo foram relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias racionais de controle do crescimento do fungo patogênico *M. perniciosa*.

Os resultados revelaram que os óleos e extratos de *Lippia* e *Hyptis*, mesmo em baixas concentrações são ativos contra o fungo *M. perniciosa*. Todas as amostras revelaram atividade fungitóxica significativa, com destaque para a espécie *L. alnifolia*, que apresentou os menores valores de CIM encontrados.

Considerando a utilização dos produtos vegetais testados no presente trabalho num cacaueteiro contaminado por *M. pernicioso*, será interessante a realização de ensaios *in vivo* complementares a serem executados em trabalhos futuros, de maneira a corroborar com as evidências elucidadas neste trabalho.

De forma complementar, a descrição química e o detalhado mecanismo de ação fungitóxica dos componentes das amostras utilizadas, também poderão trazer como resultado uma maior eficácia na utilização destes produtos no controle do crescimento do fungo. Geralmente o processo de isolamento dos componentes ativos pode ser efetuado por processos de fracionamentos biomonitorados, a fim de isolar um ou mais compostos responsáveis pela atividade.

REFERÊNCIAS

- ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S. Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, p. 106-121, 2009.
- ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. J.; HEBBAR, P. K. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, p. 304-307, 2005.
- ASEKUN, O.T.; EKUNDAYO, O.; ADENIYI, B.A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, p. 440-442, 1999.
- BASSOLE, I.H.N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkino Faso. **Phytochemistry**, v. 62, p. 209–212, 2003.
- BENATO, E.A.; SIGRIS, J.M.M.; HANASHIRO, M.M.; MAGALHÃES, M.J.M.; BINOTTI, C.S. Avaliação de fungicidas e produtos alternativos no controle de podridões pós-colheita em maracujá-amarelo. **Summa Phytopathologica**. v.28, p. 299-304, 2002.
- COUTO, V.A. **O Território do Cacau no Contexto da Mundialização**. Salvador: Bahia Análise & Dados. v. 9, n. 4, p. 38-52, 2000.
- DAOUK, R.K. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1147-1149, 1995.
- FAO. **Production yearbook**, Rome, v. 54, 2002.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45. 2000. São Carlos, **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255-258.
- FONTENELLE, R.O.S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 59, p. 934-940, 2007.
- FRENCH, R.C. The bio-regulatory action of flavor compounds on fungal spores and other propagules. **Ann. Rev. Phytopathol**, v. 23, p. 173–199, 1985.
- GOBBO-NETO L, LOPES. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova**. v. 30, p.374-381. 2007.
- INOUYE, S. et al. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contac. **Mycoses**, v. 43, p. 17-23, 2000.
- KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **J Essential Oil Res**, n. 1, p. 119–128, 1989.

LASS, R. A. **Diseases**. In: WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. (Ed.) *Cocoa*. 4th ed. London, UK, Longmans. p265-365, 1985.

Lippia javanica (Verbenaceae) leaf essential oils. **J. Ethnopharmacol**, v. 96, p. 271-277, 2005.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1732-1738, 2008.

MALELE, R.S. et al. Essential Oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzania: composition and antifungal activity. **Essent. Oil Res**, v. 15, p. 238-440, 2003.

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, 2006.

MEJÍA, L. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, D.O.I 10.1016/j.biocontrol.2008.01.012, 2008.

MOREIRA, A.C.P. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 28-33, 2010.

NOJOSA, G. B. A. et al. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 148-154, 2003.

OLIVEIRA, D.R, et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* HBK. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, D.R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil**. Ilhéus: CEPLAC/ CEPEC/SEFIT, 2005. p. 132.

ROSA, I. S. **Enxertia do cacauero**. Ilhéus: CEPALC/SUBES/CEPEC, 1998, 42p.
SOUZA, L.K.H. et al. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards Dermatophytes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 963-965. 2003.

SOYLU, S.H. et al. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, n.103, p. 1021-1030, 2007.

TOGNOLINI, M. et al. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Science*, v. 78, p. 1419-1432, 2006.

VILJOEN, A.M. et al. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 271-277, 2005.

ZAMBONELLI, A., ZECHINI D'AULERIO, A., BIANCHI, A., ALBASINI, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 491–496, 1996.