

ESTUDO COMPUTACIONAL DA TOXICIDADE DA ETILENOTIOURÉIA EM ENZIMAS DE NEUROTRANSMISSÃO E DEFESA IMUNOLÓGICA

Izabella Gabriel dos Santos, Ellen Alves Santos, Fernanda Fernandes de Souza, Othon Souto Campos, Heberth de Paula.

Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário s/n – Guararema, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil, izabella2002@gmail.com, ellen.alves2003@hotmail.com, fer.chmst@gmail.com, othon.campos@ufes.br, heberth.paula@ufes.br.

Resumo

A molécula etilenotiouréia (ETU) é um subproduto gerado em condições favoráveis pelo agrotóxico mancozebe, amplamente utilizado em plantações de café. Neste estudo, realizou-se análise do seu potencial tóxico frente às enzimas acetilcolinesterase (AChE) e o complexo enzimático, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). Foram realizados cálculos de carga da molécula ETU pelo método *Density Functional Theory* (DFT) e, a partir desses dados, efetuou-se simulações de *docking* molecular. As análises permitiram identificar as interações da molécula no sítio ativo das enzimas, bem como a distância e o tipo de ligações, indicando seu efeito inibitório.

Palavras-chave: Etilenotiouréia. Acetilcolinesterase. NAPH oxidase. Inibição. Docking molecular.

Área do Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra. Química.

Introdução

O Brasil é um país em constante desenvolvimento, especialmente no setor agrícola. A modernização da agricultura trouxe consigo a utilização de insumos, fertilizantes, defensivos agrícolas e mecanização (Silva; Santos, 2023). Entretanto, o uso intensivo de agrotóxicos tem impactos diretos na saúde humana e no meio ambiente. O mancozebe, por exemplo, é um fungicida da classe dos etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), classificado como extremamente tóxico (Gris; Júnior; Júnior, 2014; Hadad; Santos, 2021). Esse composto apresenta instabilidade em determinadas condições ambientais, podendo originar subprodutos como a etilenotiouréia (ETU), associada a efeitos mutagênicos e carcinogênicos em estudos com animais de laboratório (Musumeci; Rüegg; Campacci, 1987).

A ETU pode ser detectada em solos, plantas, animais e seres humanos, resultante da oxidação dos EBDCs (Fukuto, 1990). Dados da literatura apontam que a ETU apresenta potencial tóxico relevante, incluindo a inibição da enzima tireoide peroxidase, essencial para a síntese de hormônios tireoidianos. Há ainda evidências de que sua exposição pode estar associada a más formações em camundongos (Pezzini, 2022). Apesar disso, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos, o que evidencia a ausência de dados da literatura sobre como essa molécula interage com as enzimas-chave do ser humano representa uma brecha para a pesquisa científica, dificultando a avaliação precisa dos riscos associados à exposição ao mancozebe e seus derivados.

Nesse contexto, se faz necessário uma investigação do efeito da ETU sobre as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e o complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). A AChE é responsável por finalizar impulsos nervosos pela hidrólise da acetilcolina, e sua inibição pode gerar a uma série de efeitos adversos no organismo, como colapsos no sistema nervoso central, paradas cardiorrespiratórias, convulsões e, em casos extremos, até óbito (Nunes; Ciarapica; Silva, 2024; Vieira *et al.*, 2023). Por sua vez, a NADPH oxidase atua na defesa imunológica, catalisando a produção de ânion superóxido (O_2^-), mas sua inibição pode provocar a um desequilíbrio redox, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) para além dos níveis fisiológicos. Esse excesso pode desencadear um quadro de estresse oxidativo, caracterizado por danos a componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA (Alcantara *et al.*, 2023; Cavalcante *et al.*, 2023). A química computacional surge como uma ferramenta para investigar essas interações inibitórias, permitindo uma análise detalhada do potencial de toxicidade da ETU em nível molecular.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial de inibição da ETU sobre a enzima AChE e o complexo enzimático NADPH oxidase, investigando a ocorrência de interações

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

inibitórias por meio de simulações computacionais. Ao investigar a ocorrência de interações moleculares, essa pesquisa buscar contribuir com dados relevantes para futuros estudos na área de química computacional aplicada à toxicologia molecular e para a compreensão dos riscos associados à exposição a esses compostos.

Metodologia

Para a estruturação da molécula de etilenotriuréia (ETU), foi utilizado o editor molecular Avogadro 1.9 (Hanwell *et al.*, 2012) para preparar o *input* e o Chemcraft 1.8 (Andrienko, 2010) para análise dos resultados.

Os cálculos de otimização geométrica e espectro de infravermelho foram realizados com o pacote ORCA 5.0.3 (Franz, 2022), utilizando o funcional PBE (Perdew; Ernzerhof; Burke, 1998) e os conjuntos de base ZORA-def2-tzvp(-f)/def2-tzvp/c (Hellweg *et al.*, 2007; Weigend, 2006; Weigend; Ahlrichs, 2005), em ambiente de vácuo; a análise de infravermelho verificou que a molécula estava em seu mínimo global de energia.

O estudo de *docking* molecular foi conduzido com o software GOLD 2021.2.0, tendo como alvo biológico a enzima acetilcolinesterase, cuja estrutura foi obtida do *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/), (PDB ID: 5HFA, resolução = 2.20Å). As cargas parciais atômicas da proteína foram calculadas pelo método de Gasteiger-Hückel, via SYBYL-X 2.1.1 (Certara Inc).

As configurações ideais foram determinadas a partir de testes de *redocking*, com variações nas funções de *score*, tamanho da cavidade e flexibilização de resíduos do sítio ativo. As moléculas de água foram removidas para evitar interferências nas interações de hidrogênio.

As melhores poses foram selecionadas com base no menor valor de RMSD (*Root-Mean-Square Deviation*), maior *Fitness Score* e o valor da energia de Gibbs para função ChemScore. As interações mais relevantes entre ligante e proteína foram visualizadas e destacadas com o auxílio do software PyMOL v2.4.1.

Resultados

A enzima AChE humana possui um sítio ativo composto principalmente pelos seguintes resíduos de aminoácidos: Trp286 (triptofano 286), Tyr72 (tirosina 72), Asp74 (aspartato 74), Tyr124 (tirosina 124), Tyr341 (tirosina 341), Phe297 (fenilalanina 297), Phe295 (fenilalanina 295), Tyr337 (tirosina 337), Gly122 (glicina 122), Gly121 (glicina 121), Ala204 (alanina 204), Trp86 (triptofano 86), His447 (histidina 447), Ser203 (serina 203), Glu334 (glutamato 334) e Trp236 (triptofano 236) (Goulart *et al.*, 2021). Para a NADPH oxidase, buscou-se inibir apenas uma subunidade enzimática, conhecida como p47^{phox}, pois essa subunidade transporta as outras proteínas citosólicas para a ativação do complexo (Gitti, 2023). Seu sítio ativo é constituído por diferentes serinas como a Ser303, S304, S315, S320, S328, S345, S348, S359, S370A, S379 (Liu, 2024).

Com isso, a análise dos dados pode ser observada nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. A Figura 1 representa as poses com melhores resultados avaliados, com menor valor de RMSD e maiores valores de Fitness no sítio da AChE e NADPH oxidase.

Tabela 1 – Menores valores de RMSD para AChE.

Função	5Å	7Å	10Å	OBS
CHEMPLP	0,3532	0,4724	0,4656	
CHEMSCORE	0,4103	0,3770	0,6519	
CHEMPLP	0,7723	-	-	*FLEX
GOLDScore	0,6199	0,7126	0,4943	
ASP	0,3943	0,4762	0,6997	

FLEX: Flexibilização de aminoácidos (Trp86 e His447)

Fonte: elaborado pela própria autora.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Tabela 2 – Maiores valores de *Fitness* e seus respectivos valores de RMSD para AChE.

Função	RMSD			FITNESS		
	5Å	7Å	10Å	5Å	7Å	10Å
CHEMPLP	3,9013	12,5577	11,7132	52,9760	57,7719	63,5489
CHEMSCORE	4,0813	8,5463	8,7786	23,6462	23,9022	25,0120
CHEMPLP-FLEX	4,3707	-	-	58,3564	-	-
GOLDScore	3,7437	12,6776	11,7907	41,0230	42,2045	44,2835
ASP	3,7049	10,0814	10,9624	27,8711	30,7363	33,2111

Fonte: elaborado pela própria autora.

Tabela 3 – Menores valores de RMSD para NAPH oxidase.

Função	5Å	7Å	10Å	OBS
CHEMPLP	0,5880	0,6906	0,4656	
CHEMSCORE	0,9755	1,2470	0,6337	
CHEMPLP	0,9044	-	-	*FLEX
GOLDScore	1,1818	0,6718	0,6587	
ASP	0,8884	0,9638	1,0512	

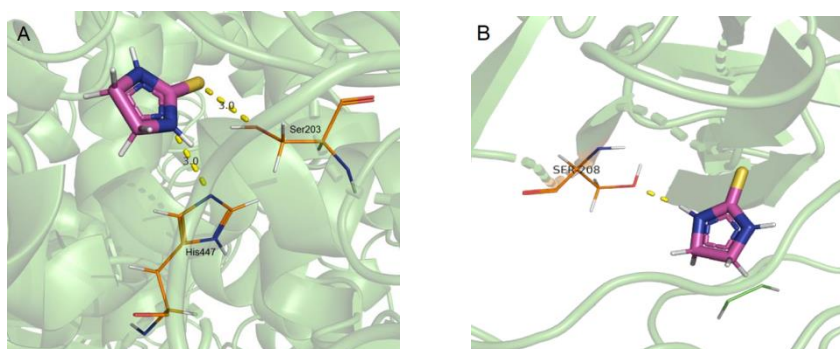
Fonte: elaborado pela própria autora.

Tabela 4 – Maiores valores de *Fitness* e seus respectivos valores de RMSD para NADPH oxidase.

Função	RMSD			FITNESS		
	5Å	7Å	10Å	5Å	7Å	10Å
CHEMPLP	0,5880	0,6906	0,6349	53,8993	55,5518	54,8650
CHEMSCORE	5,6391	6,1914	7,6514	24,6771	24,5167	25,4066
GOLDScore	3,0570	0,6718	0,6587	49,4397	52,0306	52,5914
ASP	3,0744	7,4192	2,9482	36,9566	38,0493	37,3805

Fonte: elaborado pela própria autora.

Figura 1 – Posição da ETU em relação aos sítios ativos: ETU interagindo com a AChE nos resíduos Ser203 e His447; B) ETU interagindo com a NADPH oxidase no resíduo Ser208.



Fonte: elaborado pela própria autora.

Para cada enzima, foram analisadas 100 poses diferentes. A pose selecionada em ambas as enzimas apresentou o menor valor de RMSD, e foi observado o valor médio de Fitness Score dos resultados obtidos. Para a AChE, utilizou-se a função ChemPLP com diâmetro de 5 Å, sendo escolhida a pose da solução 20, que apresentou interação com os resíduos de aminoácidos His447 e Ser203. Quanto à NADPH oxidase, também foi utilizada a função ChemPLP com diâmetro de 5 Å, sendo

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

selecionada a pose da solução 9, que interagiu com o resíduo de aminoácido Ser208, indicando um possível efeito inibitório.

Discussão

A Figura 1 ilustra a interação da molécula de ETU com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas, evidenciando o potencial de inibição. Essa interação é corroborada pelos dados da Tabela 1, que indicaram valores de RMSD consideravelmente baixos, demonstrando que as poses encontradas estão bem ajustadas ao sítio ativo da enzima AChE. Entre as funções analisadas, a que apresentou melhor desempenho foi a ChemPLP com diâmetro de 5 Å, especificamente a solução 20, que evidenciou interações com os resíduos His447 e Ser203, sugerindo um encaixe estável e relevante no sítio ativo.

Na Tabela 2, os valores de *Fitness Score* foram elevados, indicando interações mais fortes e maior afinidade do ligante ETU com o alvo. No entanto, a seleção final da pose também considerou o valor de RMSD, reforçando a confiabilidade da análise. Assim, a função ChemPLP 5 Å destacou-se novamente, apresentando um *Fitness Score* de aproximadamente 57,77 e um RMSD de 3,90 Å, o que reforça a qualidade do encaixe obtido. Os dados da Tabela 3 e 4 também apresentaram baixos valores de RMSD e elevados valores de *Fitness Score*, com destaque, mais uma vez, para a função ChemPLP 5 Å. Nesse caso, observou-se uma interação de ligação de hidrogênio entre o resíduo Ser208 e o ligante cristalográfico do PDB selecionado. Além disso, a molécula de ETU, contendo enxofre com ligação dupla ao carbono e um orbital p disponível, favoreceu interações adicionais que contribuíram para a estabilização do sítio ativo do alvo biológico, sugerindo um potencial efeito inibitório.

Entre as 100 poses analisadas, apenas 9 apresentaram ligação de hidrogênio com o resíduo S208 e, dessas, apenas 3 exibiram interações $\pi-\pi$ com o resíduo W263, ambas consideradas interações importantes para a inibição da enzima. Por fim, para a padronização do software, a pose com menor energia de ligação foi escolhida como referência. A pose selecionada foi a pose 12, com energia de -5,15 kcal·mol⁻¹, indicando maior estabilidade no complexo ligante-enzima.

Conclusão

Os resultados obtidos nas simulações reforçam que a ETU apresenta potencial inibitório frente às enzimas AChE e NADPH oxidase. Dessa forma, destaca-se a importância da realização de estudos complementares experimentais, uma vez que a AChE está diretamente relacionada ao desenvolvimento da doença de Alzheimer quando inibida, enquanto a NADPH oxidase desempenha papel fundamental na defesa imunológica do organismo. Assim, os dados sugerem que a ETU, mesmo em uma análise computacional, pode representar risco significativo à saúde humana.

Referências

ALCANTARA, M. M. *et al.* **Avaliação dos benefícios do extrato de semente de uva Masquelier® em agricultores expostos à pesticidas no sul do Brasil.** 2023. 162 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

ANDRIENKO, G. A. **Chemcraft:** graphical software for visualization of quantum chemistry computations. 2010. Disponível em: <https://www.chemcraftprog.com>. Acesso em: 19 set. 2025.

CAVALCANTE, K. L. *et al.* Estresse Oxidativo e Nox: Doenças Relacionadas e Principais Classes de Inibidores Sintéticos e Naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 2, p. 248-261, 2023. DOI: 10.21577/1984-6835.20220113.

DA SILVA, A. O.; DOS SANTOS, F. A modernização da agricultura e seus impactos no campo: uma análise sobre a disseminação dos agrotóxicos em Alagoas (2012-2021). **UÁQUIRI-Revista do Programa de Pós Graduação em Geografia da Universidade Federal do Acre**, v. 5, n. 1, p. 87-111, 2023.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

FRANZ, M.; NEESE, F.; RICHERT, S. Calculation of exchange couplings in the electronically excited state of molecular three-spin systems. **Chemical Science**, v. 13, n. 42, p. 12358-12366, 2022.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental health perspectives**, v. 87, p. 245-254, 1990.

GITTI, V. **Encefalopatia tóxica e sua relação com a inalação de solventes orgânicos**. 2023. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2023.

GOULART, P. N. *et al.* Butirilcolinesterase - BuChE: um potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 90–126, jan./fev. 2021.

GRIS, C. F.; JÚNIOR, G. G. de O.; JÚNIOR, H. B. **Defensivos agrícolas**. Muzambinho, MG: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, 2014. (Coleção Rede e-Tec Brasil).

HADAD, C. S. F.; SANTOS, G. M. **Estudo químico e toxicológico dos principais defensivos agrícolas usados nas monoculturas brasileiras**. 2021. 23 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, Adelfa Repositório Digital, São Paulo, 2021.

HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.

HELLWEG, A. *et al.* Optimized accurate auxiliary basis sets for RI-MP2 and RI-CC2 calculations for the atoms Rb to Rn. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 117, n. 4, p. 587-597, 2007.

LIU, J. **Activation of the phagocyte NADPH oxidase (NOX2) in human neutrophils: study of p47phox phosphorylation during phagocytosis**. 2024. 170 f. Tese (Doutorado) – Université Paris Cité, Paris, França, 2024.

MUSUMECI, M. R.; RÜEGG, E. F.; CAMPACCI, C. A. Studies with 14 C-zineb on aqueous suspension and tomato leaves. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 54, n. 1/4, p. 27-30, jan./dez. 1987.

NUNES, G. H. R.; CIARAPICA, M. H.; SILVA, F. T. REVISÃO INTEGRATIVA DOS EFEITOS NEUROLÓGICOS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS À BASE DE CARBAMATOS EM CRIANÇAS. **REVISTA FOCO**, v. 17, n. 11, p. e6911-e6911, 2024.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Perdew, burke, and ernzerhof reply. **Physical Review Letters**, v. 80, n. 4, p. 891, 1998.

PEZZINI, M. F. **Influência do fungicida Mancozebe na microbiota intestinal em um modelo experimental**. 2022. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/252551>. Acesso em: 19 set. 2025.

VIEIRA, M. F. D. B. *et al.* Relação do desenvolvimento do Alzheimer com organofosforados: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 05, p. 16935-16947, 2023.

WEIGEND, F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn. **Physical chemistry chemical physics**, v. 8, n. 9, p. 1057-1065, 2006.

*A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO***

WEIGEND, F.; AHLRICHS, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 7, n. 18, p. 3297-3305, 2005.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Espírito Santo.