



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS PARNAÍBA
LICENCIATURA EM QUÍMICA**

MARIA ROSANA MARQUES DA SILVA

***Docking molecular de terpenoides de *Rosmarinus officinalis* frente à proteína
spike do vírus SARS-CoV-2***

**PARNAÍBA
2024**

MARIA ROSANA MARQUES DA SILVA

Docking molecular de terpenoides de *Rosmarinus officinalis* frente à proteína *spike*
do vírus SARS-CoV-2

Trabalho de Conclusão de Curso (monografia)
apresentado como exigência parcial para obtenção
do diploma do Curso de Licenciatura em Química
do Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Piauí, Campus Parnaíba.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Buana Carvalho de
Almeida

PARNAÍBA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Maria Rosana Marques da
S586d Docking molecular de terpenoides de *Rosmarinus officinalis* frente à
proteína spike do vírus SARS – CoV-2 / Maria Rosana Marques da Silva.
— 2024.
36 f. : il.color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) –
Instituto Federal do Piauí, Campus Parnaíba, 2024.
Orientadora: Prof^a Dra. Buana Carvalho de Almeida.

1.Química. 2.Bioinformática. 3.COVID -19. 4.Produtos naturais. I.Título.

CDD – 540

Elaborado por Micheline Angélica Aragão Gouveia CRB 3/1244

MARIA ROSANA MARQUES DA SILVA

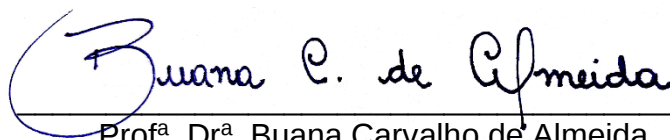
Docking molecular de terpenoides de *Rosmarinus officinalis* frente à proteína spike do vírus SARS-CoV-2

Trabalho de Conclusão de Curso (monografia) apresentado como exigência parcial para obtenção do diploma do Curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Parnaíba.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Buana Carvalho de Almeida

Aprovada em: 17 / 01 / 2024 .

BANCA EXAMINADORA



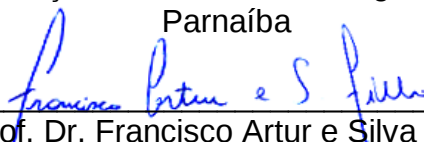
Prof^a. Dr^a. Buana Carvalho de Almeida

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI) – *campus* Parnaíba



Prof. Dr. Bartholomeu Araújo Barros Filho

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI) – *campus* Parnaíba



Prof. Dr. Francisco Artur e Silva Filho

Universidade Estadual do Piauí (UESPI) – *campus* Parnaíba

A Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida e por me dar forças nos momentos difíceis.

Agradeço a minha família, a minha mãe Maria de Fátima pelo amor e pelas palavras de incentivo, ao meu pai Antônio Marques pelas palavras de direção quando eu estava desorientada, ao meu irmão Aclinto Marques por sempre torcer pelo meu sucesso, e a minha irmã Maria Tatiane por me ouvir e me aconselhar.

Agradeço aos meus familiares pelo carinho, aos irmãos em Cristo Jesus pelas orações, aos meus amigos que Deus me deu por sempre incentivarem nos meus estudos.

Agradeço em especial minha professora orientadora Dr^a Buana Carvalho de Almeida por me aceitar como orientanda neste trabalho, por ser minha referência profissional, pela dedicação e carinho.

Agradeço em especial as minhas amigas de turma Letícia Rodrigues, Emanuelle Santos, Rosangela Maria, Gleiciara Lucas e Andressa Rodriguez; por cada momento alegre e pelo apoio nos momentos difíceis.

Agradeço ao Luiz Fernando Barbosa, meu colega de turma, por ter me ajudado no manuseio dos programas computacionais, pela paciência e ensino.

Aos colegas da minha primeira turma, 2019.1, por cada palavra de carinho e pelos momentos felizes.

Aos meus colegas da segunda turma, 2020.1, pela união, carinho, incentivo e pelos lanches.

Agradeço aos meus professores pelo incentivo aos estudos, pelos seus exemplos de vidas e profissionalismo, por repassarem seus conhecimentos com dedicação.

Agradeço a direção e todos os funcionários do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia campus Parnaíba por disponibilizar os recursos possíveis para a elaboração deste trabalho.

Agradeço a todos que de forma direta e indiretamente contribuíram para eu conseguir esta conquista, meus sinceros agradecimentos.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

O novo coronavírus, denominado SARS-CoV-2, causou a principal crise de saúde global dos tempos atuais, sendo apontado como o patógeno principal causador da doença infecciosa coronavírus (COVID-19), ocasionando mais de 6,9 milhões de mortes de pessoas em todo o mundo desde seu surto em dezembro de 2019. A proteína *spike* presente no vírus faz interação com a proteína da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) presentes nas células dos hospedeiros, isto facilita sua entrada e ocasiona a infecção. Sendo assim, o desenvolvimento de inibidores da proteína *spike* deve resultar no bloqueio da infecção viral. Como ainda não existem fármacos específicos para a doença, metabólitos secundários de plantas medicinais estão sendo estudados por meio da técnica de simulação computacional, *docking molecular*. Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a interação de terpenoides de *Rosmarinus officinalis* frente à proteína *spike* do vírus SARS-CoV-2, com e sem o receptor ACE2, contribuindo para a descoberta de possíveis candidatos a fármacos para o COVID-19. O software Gold foi utilizado para a realização do *docking molecular*, o complexo ACE2-RBD-SPIKE foi obtido do *Protein Data Bank* (PDB ID: 6M0J), os ligantes foram escolhidos do núcleo de bioensaios biossíntheses e ecofisiologia de produtos naturais (NuBBE) e preparados pelos programas *MarvinSketch* e *Avogrado*, e os resultados analisados no *Discovery Studio Visualizer*. O ligante 2382 (pontuação score 40,00) se destacou nas interações com os resíduos de aminoácidos (GLN493 e TRY449) do domínio RBM da proteína *spike* e apresentou-se como o melhor candidato a fármaco baseado nos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.

Palavras-chave: covid-19; produtos naturais; bioinformática.

ABSTRACT

The new coronavirus, called SARS-CoV-2, caused the main global health crisis of current times, being identified as the main pathogen causing the infectious disease coronavirus (COVID-19), causing more than 6.9 million deaths. around the world since its outbreak in December 2019. The spike protein present in the virus interacts with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) protein present in the hosts' cells, this facilitates its entry and causes infection. Therefore, the development of spike protein inhibitors should result in blocking viral infection. As there are still no specific drugs for the disease, secondary metabolites from medicinal plants are being studied using the computer simulation technique, molecular docking. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the interaction of terpenoids from *Rosmarinus officinalis* with the spike protein of the SARS-CoV-2 virus, with and without the ACE2 receptor, contributing to the discovery of possible drug candidates for COVID-19. The Gold software was used to perform the molecular docking, the ACE2-RBD-SPIKE complex was obtained from the Protein Data Bank (PDB ID: 6M0J), the ligands were chosen from the bioassay core biosynthesis and ecophysiology of natural products (NuBBE) and prepared by the MarvinSketch and Avogrado programs, and the results analyzed in Discovery Studio Visualizer. Ligand 2382 (score 40.00) stood out in interactions with amino acid residues (GLN493 and TRY449) of the RBM domain of the spike protein and presented itself as the best drug candidate based on the parameters of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity.

Keywords: covid-19; natural products; bioinformatics.

LISTA DE INLUSTRAÇÕES

Figura 1 – SARS-CoV-2	15
Figura 2 – Interação da proteína S com o receptor ACE2	16
Figura 3 - Complexo ACE2 (em verde) com RBD da proteína <i>spike</i> (em ciano) e RBM (em vermelho).	17
Figura 4 - Esquema de formação do complexo proteína-ligante.....	18
Figura 5 - Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	19
Figura 6 - Fórmula estrutural do nirmatrelvir (esquerda) e ritonavir (direita).....	21
Figura 7 – Interações <i>spike</i> -RBM-ligante 2382.....	25
Figura 8 – Interações <i>spike</i> -RBM-ligante 2383 (à esquerda) e <i>spike</i> -RBM-ligante 2378 (à direita).....	26
Figura 9 – Interações de <i>spike</i> -RBM- ligante 2378.....	27
Figura 10 – Interações de <i>spike</i> -RBM-ligante 2385.....	28
Figura 11 – Interações <i>spike</i> -RBM-ligante 2382.....	29
Gráfico 1 – Análise gráfica parâmetros físico-químicos.....	30

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Ligantes e suas respectivas pontuações.....	27
Tabela 2 - Ligantes e suas respectivas pontuações score docking <i>spike</i> -RBM-ligante (sem o receptor ACE2).....	29
Tabela 3 – Análise de ADME.....	31
Tabela 4 – Análise de Toxicidade.....	31
Tabela 5 - Clearance Total.....	32
Tabela 6 – Análises de carcinogenicidade e mutagenicidade.....	32
Quadro 1 – Ligantes terpenoides e seus respectivos ID do NuBBEDB.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação, Toxicidade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHE	Barreira hematoencefálica
CYP450	Citocromo P450 oxidase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
hERG	Human Ether-a-go-go-Related Gene
NuBBE	Núcleo de bioensaios biossínteses e ecofisiologia de produtos naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RBD	<i>Receptor binding domain</i>
RBM	<i>Receptor-binding motif</i>
TPSA	Topological Polar Surface Area
VS	<i>Virtual Screening</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Vírus SARS-CoV-2	15
2. 2 Proteína <i>Spike</i>	15
2.3 <i>Docking Molecular</i>	17
2.4 <i>Rosmarinus officinalis</i>	19
2.5 MEDICAMENTOS APROVADOS PARA COVID-19	21
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 TIPO DA PESQUISA	23
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
4.2.1 Seleção do receptor e dos ligantes	23
4.2.2 Preparação do receptor e dos ligantes	24
4.2.3 <i>Docking Molecular</i>	24
4.2.4 Análise ADMET	24
4.3 TRATAMENTO DE DADOS	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 INTERAÇÕES <i>SPIKE</i> -RBM-ACE2-LIGANTE	25
5.2 INTERAÇÕES <i>SPIKE</i> -RBM-LIGANTE	27
5.3 ANÁLISE DE PARÂMETROS ADMET	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O novo coronavírus denominado SARS-CoV-2 causou a principal crise de saúde global dos tempos atuais, sendo apontado como o patógeno principal causador da doença infecciosa coronavírus (COVID-19) (BARON et al., 2022).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), desde o surgimento em dezembro de 2019 até 24 de dezembro de 2023, 773 milhões de casos foram confirmados e mais de 6,9 milhões de mortes foram notificadas mundialmente. De acordo com Costa (2020), para impedir o avanço da doença, medidas de isolamento social foram tomadas em todo o mundo, o que impactou na vida de quase 2,7 bilhões de trabalhadores.

Atualmente 67% da população global recebeu a série primária completa de uma vacina COVID-19 (OMS, 2023). Contudo, estudos apontam uma diminuição significativa da resposta humoral ao longo do tempo (LEVIN et al., 2021), assim o bloqueio total da infecção viral pode não ser atendida pela vacinação, então novos meios de bloquear o vírus precisam ser estudados o mais rápido possível.

A proteína *spike* presente no vírus SARS-CoV-2 faz interação com a proteína da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) presente nas células dos hospedeiros, isto facilita sua entrada e ocasiona a infecção. Sendo assim, o desenvolvimento de inibidores da proteína *spike* deve resultar no bloqueio da infecção viral (HO et al., 2022).

Nas últimas décadas, a humanidade tem usado cada vez mais plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças. Os fitoconstituintes são bastantes estudados pela comunidade científica por apresentarem atividades farmacológicas já comprovadas como anticancerígena, antioxidantes e anti-inflamatória. Em decorrência da incessante busca por agentes antivirais para SARS-CoV-2, vários estudos já comprovaram alta inibição de compostos bioativos oriundos de plantas medicinais (HOUCHI; MESSASMA, 2022).

Desta forma, o emprego de *docking molecular* é visto como ferramenta eficaz para o estudo e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da COVID-19, com as vantagens de simulações computacionais sem o gasto de reagentes, em comparação com testes experimentais, promovendo baixo custo, menor tempo para obter resultados e disponibilidade de *software* gratuito (VLASIOU; PAFTI, 2021).

Portanto, os estudos sobre produtos naturais são notáveis para o tratamento de diversas enfermidades ao longo do desenvolvimento da sociedade moderna, sendo assim, buscar possíveis candidatos a fármacos provenientes de metabólitos secundários de plantas medicinais presume ser o melhor caminho para o desenvolvimento de um potente antiviral contra SARS-CoV-2.

Além disso, os antivirais existentes não são específicos para o tratamento da doença. Sendo assim, pesquisar e desenvolver novos fármacos para a inibição do vírus responsável pela doença através de técnicas computacionais, como o *docking molecular*, representa uma estratégia bastante promissora.

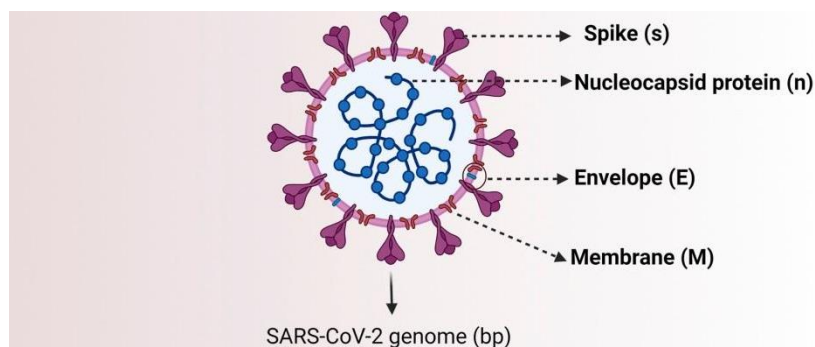
Dessa forma, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a interação de terpenoides de *Rosmarinus officinalis* frente à proteína *spike* do vírus SARS-CoV-2, contribuindo para a descoberta de possíveis candidatos a fármacos para o COVID-19.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 VÍRUS SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 compreende o genoma de um RNA de fita simples envelopado, pertence à família *Coronaviridae* do gênero *Betacoronavirus*, que são eminentemente patogênicos. Cerca de 80% da sequência do genoma do vírus se identifica com a sequência do vírus SARS-CoV e cerca de 50% do vírus MERS-CoV. Foi codificado quatro proteínas estruturais a envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e *spike* (S), esta última é a mediadora da introdução do vírus nas células hospedeiras (Figura 1) (HARRISON; LIN; WANG, 2020).

Figura 1 - SARS-CoV-2



Fonte: Hillary; Ceaser, 2023.

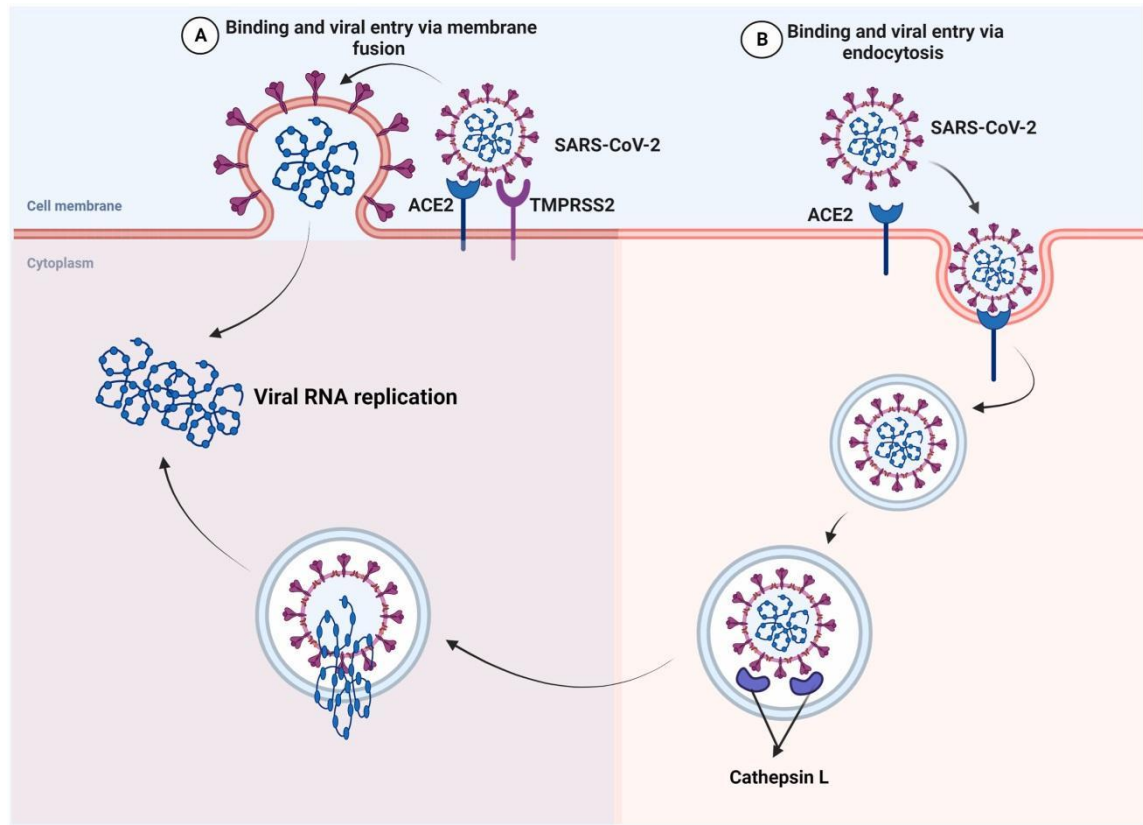
2.2 PROTEÍNA SPIKE

Na superfície do vírus SARS-CoV-2 está presente a proteína *spike* trimérica que compõe a forma de coroa, recebendo o nome comum de “corona”. A proteína *spike* é um fusogênio de classe I (composto estruturalmente por α -hélices) que simplifica a fusão da membrana depois de sofrer rearranjos estruturais que a transpõem de um modo de pré-fusão metaestável para uma condição apta de fusão. Em suma, a fusão da membrana viral juntamente com as membranas celulares e o depósito de RNA genômico viral no citoplasma da célula hospedeira caracteriza pelo início da etapa do ciclo de vida viral (RAFAH et al., 2021).

A ligação da proteína S com o receptor ACE2 ocasiona a absorção do vírus nos endossomos, sua ativação é por meio da cisteína peptidase cathepsina L nos

endolisossomos (HILLARY; CEASER, 2023). Na Figura 2 é demonstrado a entrada do vírus por meio da interação da proteína S com receptor ACE2.

Figura 2 - Interação da proteína S com o receptor ACE2



Fonte: Hillary; Ceaser, 2023.

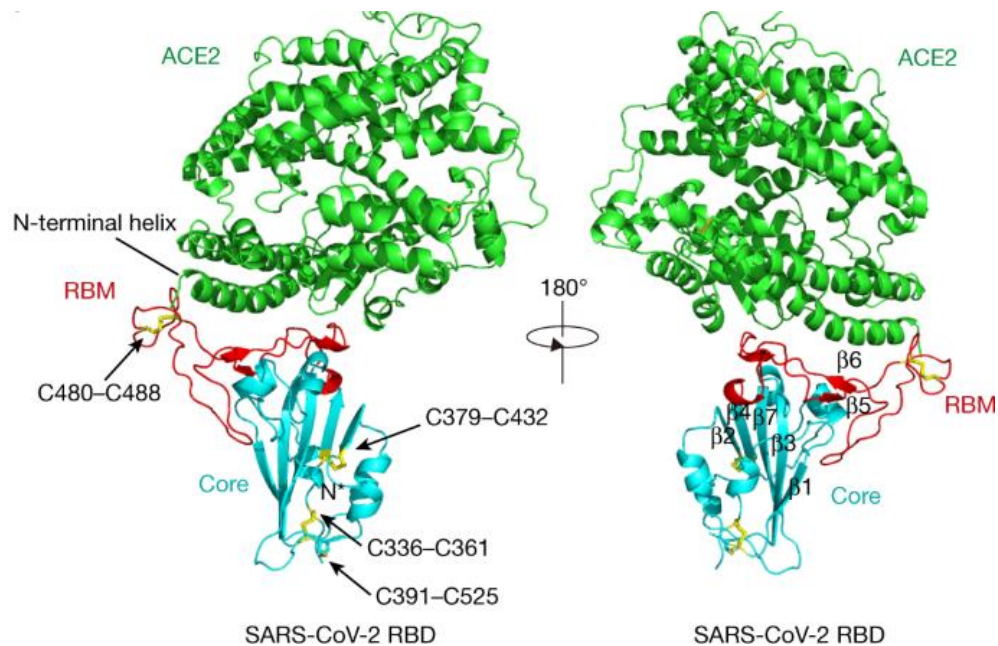
A proteína *spike* do coronavírus possui ectodomínio organizado em dois domínios, o N-terminal denominado S1 sendo o causador da ligação ao alvo biológico e um domínio C-terminal denominado S2 causador da fusão (BELOUZARD et al., 2012).

O domínio S2 na configuração de pré-fusão segue uma conformação com a maior seção da cadeia polipeptídica acondicionada ao redor de uma espiral de três filamentos constituídos pelas hélices principais. Certamente, a estabilidade global da proteína S é devido a interação resultante da formação de um feixe contendo nove hélices (JACKSON et al., 2022).

No domínio S1 está localizado o domínio de ligação ao receptor (RBD - do inglês, *receptor binding domain*) este possui dois subdomínios, o mais importante é o motivo de ligação ao receptor (RBM - do inglês, *receptor-binding motif*), quando a

conformação do RBD está para cima o RBM fica exposto facilitando a ligação com o receptor ACE2 (JACKSON et al., 2022). Na Figura 3 podemos observar o complexo ACE2 e o RBD da proteína S.

Figura 3 – Complexo ACE2 (em verde) com RBD da proteína *spike* (em ciano) e RBM (em vermelho).



Fonte: Jackson et al., 2022.

2.3 DOCKING MOLECULAR

O *docking molecular* é uma técnica *in silico* para identificar a interação de ligação de um complexo proteína-ligante e qualificar sua força usando variadas funções de pontuação para selecionar a melhor interação formada por cada molécula (Figura 4) (ADELUSI et al., 2022).

Figura 4 - Esquema de formação do complexo proteína-ligante



Fonte: Adaptado de Diller; Merz, 2001.

A operação de simulações de *docking* é realizada por *design* simples e demanda somente recursos computacionais básicos. Para ocorrer a simulação é fundamental ter a estrutura do receptor e do ligante. As estruturas dos receptores podem ser adquiridas no Banco de Dados de Proteínas (PDB – do inglês, *Protein Data Bank*) que está em crescimento, ainda assim, poderá ser obrigatório efetuar estágios de preparação da estrutura, como, inclusão de hidrogênios, inclusão de cargas, modelagem de locais ausentes da estrutura da proteína (MORRIS; CORTE, 2021).

No *docking*, a previsão de ligação do ligante pode ser realizada pela Triagem Virtual, (VS - do inglês, *Virtual Screening*), que realiza buscas em uma biblioteca de compostos. Outra estratégia é a previsão de pose que tem como objetivo comprovar que uma técnica pode prever como um determinado ligante pode se acoplar, o que não determina se ele está realmente acoplado (JAIN; NICHOLLS, 2008). Por fim, uma análise também importante é a avaliação de pontuação, quando está com valor negativo significa uma interação com maior intensidade entre proteína e ligante. No planejamento e descoberta de medicamentos, a avaliação de pontuação é empregada para prever quais compostos são candidatos favoráveis a medicamentos (MORRIS; CORTE, 2021).

2.4 *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis L. popularmente, chamada de alecrim (Figura 5), é uma planta natural do Mediterrâneo, pode crescer até 2 metros de altura, arbustiva e possui folhas verdes. Em uma das teorias de origem do nome *Rosmarinus* procede das palavras gregas “rhos” que significa arbusto e “mirrinos” que significa aromático; já o nome *officinalis* vem do seu uso como planta medicinal (BORGES et al., 2019).

O alecrim pertencente à família Lamiaceae, as plantas desta família possuem óleos essenciais com bioativos como terpenos. Além disso, há relatos da presença de compostos fenólicos, flavonoides e iridoides. Alguns destes compostos apresentam atividades farmacológicas como antivirais, antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias (ANDRADE et al., 2018).

Figura 5 - Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L)

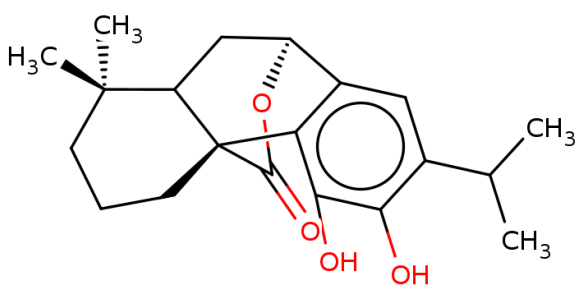
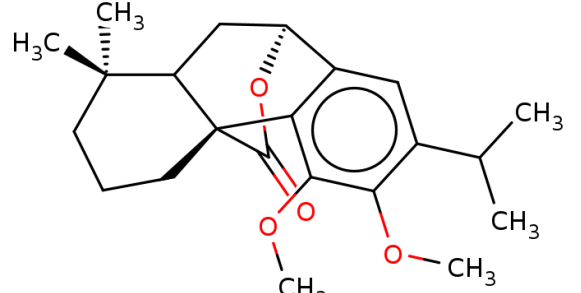
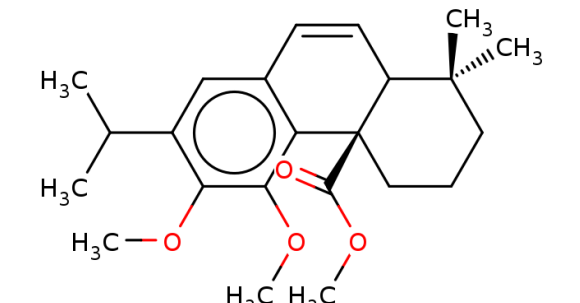
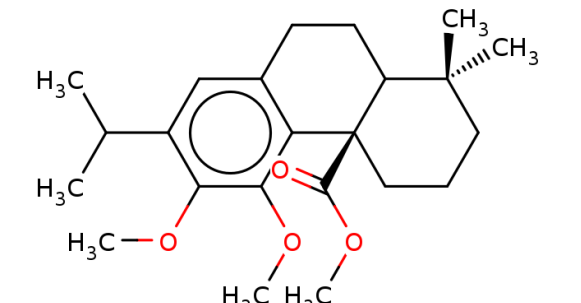
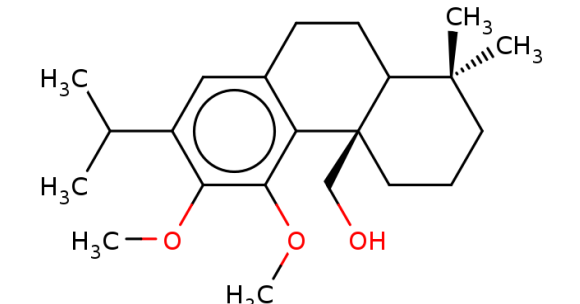
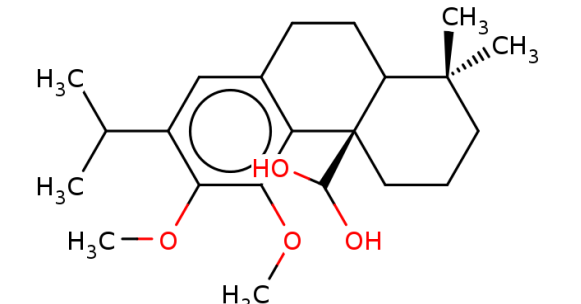


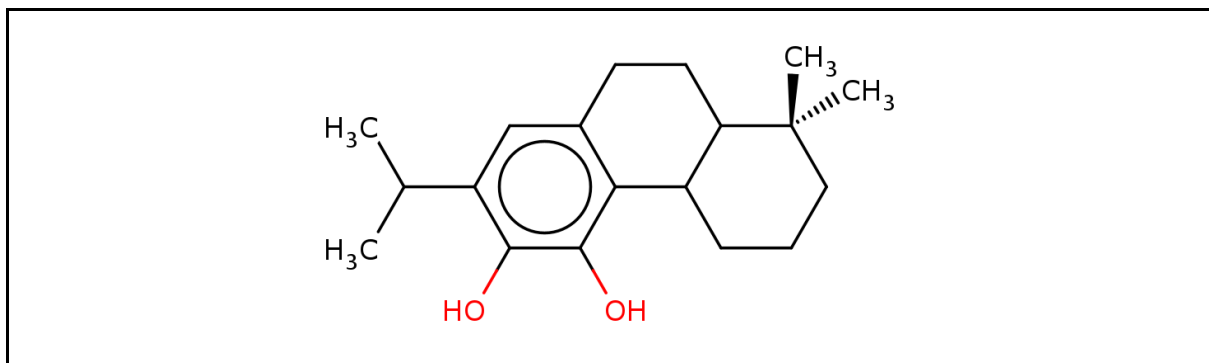
Fonte: Pappachan; Suku; Mohana, 2023.

Os terpenos têm cadeia principal formada a partir da molécula de isopreno. São metabólicos secundários de plantas, quando os terpenos sofrem oxidação, rearranjo e outras alterações bioquímicas são formados os terpenoides (WANI et al., 2021). Os compostos derivados dos terpenos são biologicamente ativos utilizados mundialmente para o tratamento de diversas doenças como malária e câncer, e em pesquisas de

novos compostos anti-SARS-CoV-2, por meio de técnicas de *docking molecular* (MUHSEEN et al., 2020). O núcleo de bioensaios biossínteses e ecofisiologia de produtos naturais (NuBBE) disponibiliza o *download* de metabólitos secundários encontrados em diversas plantas como o alecrim. No Quadro 1 estão as estruturas dos terpenoides utilizados neste trabalho.

Quadro 1 - Ligantes terpenoides e seus respectivos ID do NuBBEDB.

ID 2378	ID 2379
	
ID 2380	ID 2381
	
ID 2382	ID 2383
	
ID 2385	



Fonte: Autoria própria (2023).

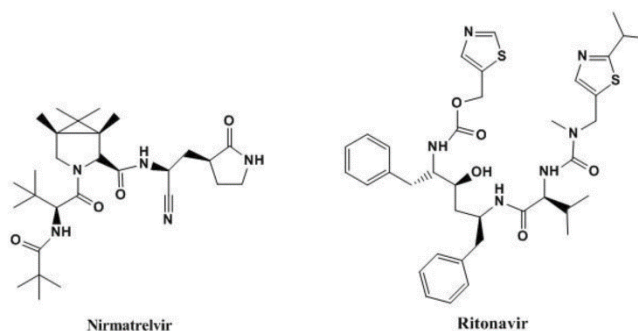
2.5 MEDICAMENTOS APROVADOS PARA COVID-19

A Agência Federal do Departamento de saúde e serviços humanos, Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA - do inglês, *Food and Drug Administration*), dos Estados Unidos autorizou medicamentos para reduzir o risco de hospitalização ou mortes para pacientes com COVID-19 leve a moderado (FDA, 2024).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou medicamentos para COVID-19 de uso emergencial e restrito para ambientes hospitalares, não indicados para profilaxia. O Sotrovimabe é um anticorpo monoclonal que atua contra a proteína *spike* que impede a ligação do vírus com a célula humana (ANVISA, 2024).

Os medicamentos de via oral aprovados pela FDA e ANVISA, são os antivirais Paxlovid (nirmatrelvir e ritonavir) e Lagevrio (molnupiravir) que atuam contra a replicação viral, na Figura 6 podemos analisar a fórmula estrutural do nirmatrelvir e ritonavir.

Figura 6 – Fórmula estrutural do nirmatrelvir (esquerda) e ritonavir (direita).



Fonte: Iman et al., 2023.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de inibição de terpenoides de *Rosmarinus officinalis* frente à proteína *spike* por meio de *docking molecular*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter a estrutura da proteína *spike* através do banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) e dos ligantes utilizando a plataforma NuBBE *Database*;
- ✓ Preparar a proteína *spike* e ligantes utilizados nas simulações;
- ✓ Realizar o *docking molecular* da proteína *spike* frente aos terpenoides de *Rosmarinus officinalis*;
- ✓ Analisar as interações do complexo proteína-ligante;
- ✓ Classificar o potencial de inibição pelos resultados do *docking molecular*.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DA PESQUISA

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa exploratória-descritiva. Segundo Gil (2002), a pesquisa exploratória tem como intenção fortalecer, elucidar e transformar conceitos e ideias, com base em levantamentos bibliográficos e estudos de casos, além de seguir com precisão o planejamento. Ainda, segundo o mesmo autor, a pesquisa descritiva tem como objetivo o detalhamento das particularidades de um grupo por meio de técnicas padronizadas.

Bem como, a pesquisa experimental íntegra em definir um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (GIL, 2002, P.47).

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Seleção do receptor e dos ligantes

A estrutura cristalina tridimensional da proteína *spike* SARS-CoV-2 ligada ao receptor ACE2, foi obtida do *Protein Data Bank* com uma resolução de 2,45 Å (PDB ID: 6M0J) a cadeia A pertence ao receptor ACE2 e cadeia E corresponde ao RBD da proteína *spike*. Os resíduos de aminoácidos do RBM da proteína S (6M0J) são no total 17 (K417, G446, Y449, Y453, L455, F456, A475, F486, N487, Y489, Q493, G496, Q498, T500, N501, G502, Y505) (LAN; et al., 2020). Para a seleção dos ligantes foi utilizado o banco de dados brasileiro NuBBE, onde foi considerada a estrutura de 7 compostos da *Rosmarinus officinalis*, no formato de arquivo mol2.

4.2.2 Preparação do receptor e dos ligantes

A estrutura da proteína *spike* acoplada com o receptor ACE2 foi preparada utilizando o programa *Discovery Studio Visualizer*, a cadeia A foi mantida para o primeiro docking e deletada para o segundo, as águas e resíduos de cristalografia foram deletados, as histidinas tiveram seu estado de protonação corrigido para o pH 7,4 por meio da plataforma online PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>), que gerou um arquivo em formato .pqr, no qual foi transformado para o formato .pbd pelo software *Pymol* e utilizado para o *docking molecular*.

Os ligantes tiveram seus estados de protonação corrigidos para o pH 7,4 através do programa MarvinSketch e otimizados pelo campo de força MMFF94 no software Avogadro.

4.2.3 Docking Molecular

O estudo de *docking molecular* foi realizado no programa *GOLD*, com a função *GoldScore* e função ASP para rescore, no total de 100 poses para cada ligante, com eficiência de busca de 200%, as coordenadas do sítio ativo foram obtidas da plataforma DockThor (<https://dockthor.lncc.br/v2/>) (X = -39.9, Y= 31.0 e Z= 7.5), em uma esfera de 10 Å, todos os hidrogênios da proteína foram adicionados.

Inicialmente realizou-se o *docking* com a proteína *spike*-RBM junto ao domínio do receptor ACE2 e para cada um dos sete ligantes escolhidos da plataforma NuBBE e, em seguida o mesmo foi feito, considerando a proteína *spike* sem o domínio do receptor ACE2.

4.2.4 Análise ADMET

As propriedades farmacocinéticas Absorção (A), Distribuição (D), Metabolismo (M), Excreção e Toxicidade (T), importantes para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos foram realizadas pelas plataformas de livre acesso online. SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017) para absorção, distribuição, metabolismo e excreção; pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>)

(PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) para toxicidade e ProTox II (https://tox-new.charite.de/protox_II/) (BARNEJEE; et al, 2018) para carcinogenicidade e mutagenicidade.

4.3 TRATAMENTO DE DADOS

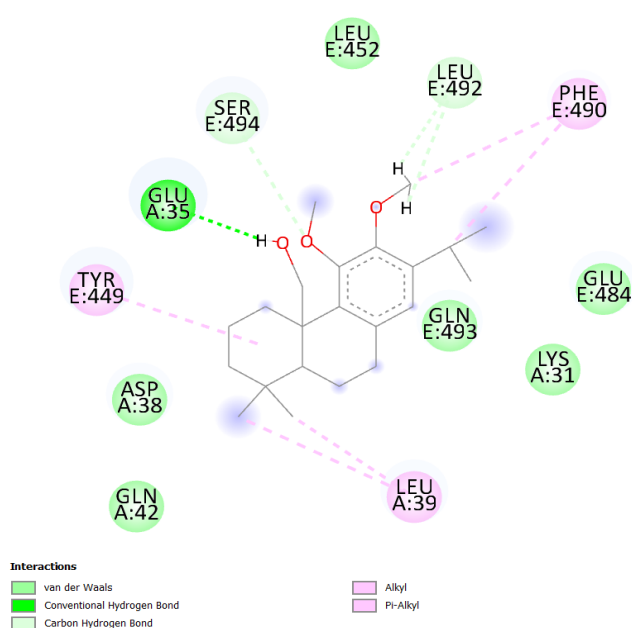
Os resultados do *docking* molecular e parâmetros ADMET foram tabulados e para a visualização e análises das interações dos resíduos de aminoácidos do RBM da proteína *spike* com os ligantes foi utilizado o *software Discovery Studio Visualizer*.

5 RESULTADOS DISCUSSÃO

5.1 INTERAÇÕES SPIKE-RBM-ACE2-LIGANTE

As interações receptor-ligante tiveram seu foco nos resíduos de aminoácidos do sítio ativo da proteína *spike*, o ligante ID 2382 obteve maior pontuação score 40.00 e ASP 16.79, fez interações com dois resíduos do RBM da proteína, GLN493 por interações de Van Der Waals e TRY449 por interações π -alquil, o que pode resultar em uma possível inibição, como é observado na Figura 7.

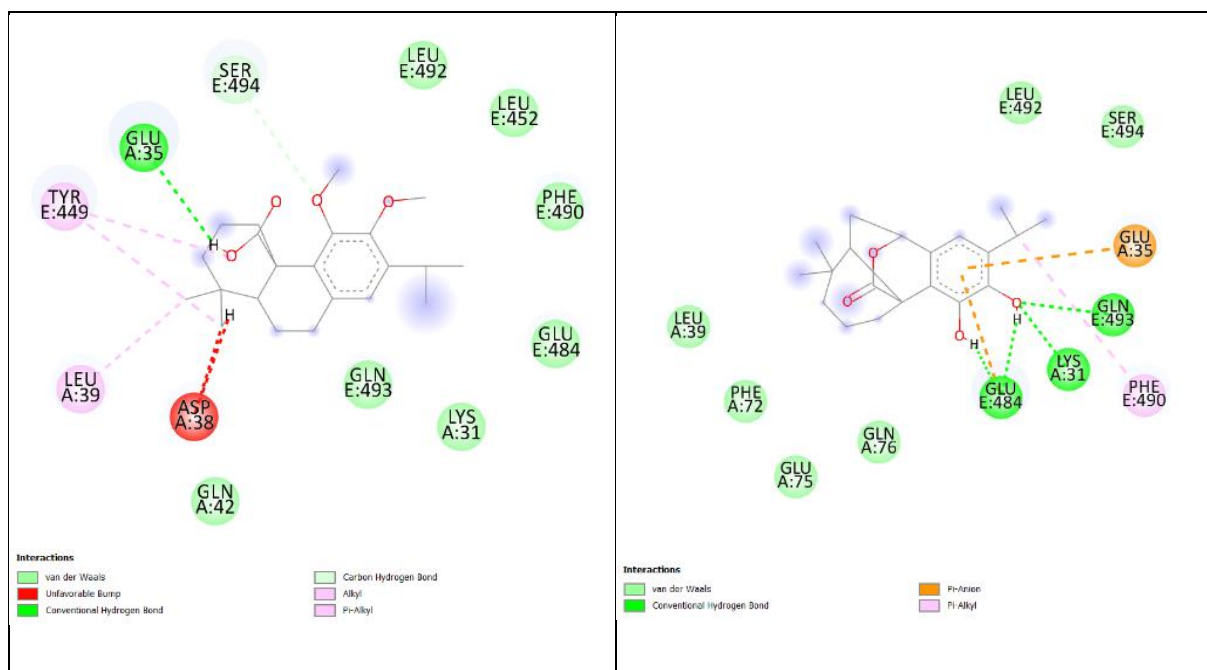
Figura 7 – Interações *spike*-RBM-ligante 2382.



Fonte: Autoria própria (2024).

O ligante 2383 obteve a segunda melhor pontuação *score* 38.69 e ASP 11.23, fez duas interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo do RBM, TRY449 por interação π -alquil e GLN493 por interações de Van Der Waals, mesmas interações do ligante 2382. O ligante 2378, carnosol, obteve a terceira melhor pontuação *score* 37.20 e ASP 15.66, fez apenas uma interação com os resíduos de aminoácidos, GLN493 por ligação de hidrogênio (ver Figura 8).

Figura 8 – Interações *spike*-RBM-ligante 2383 (à esquerda) e *spike*-RBM-ligante 2378 (à direita).



Fonte: Autoria própria (2024).

Segundo Silva (2023) a pontuação *score* representa qual ligante tem maior afinidade com o receptor, quanto mais elevada a pontuação melhores são as interações ligante-receptor. O ligante 2382 obteve a melhor pontuação *score*, é importante ressaltar que os ligantes que obtiveram suas pontuações próximas do maior valor representam também serem possíveis inibidores, na Tabela 1 está resumido os valores de pontuação *score* dos sete ligantes testados.

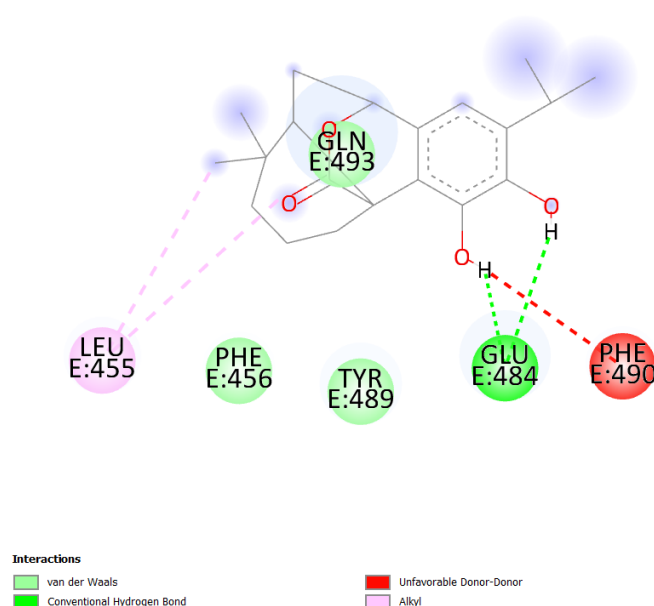
Tabela 1 - Ligantes e suas respectivas pontuações *score*.

ID do NuBBEDB	GoldScore	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(int)
2382	40.00	6.92	24.99	-1,29
2383	38.69	6.52	24.94	-2.12
2378	37.20	14.90	17.89	-2.29
2379	37.12	5.22	23.65	-0.62
2381	35.77	5.97	22.92	-0.92
2380	35.71	1.03	25.89	-0.64
2385	33.05	12.00	17.21	-2.61

Fonte: Autoria própria (2024).

5.2 INTERAÇÕES SPIKE-RBM-LIGANTE

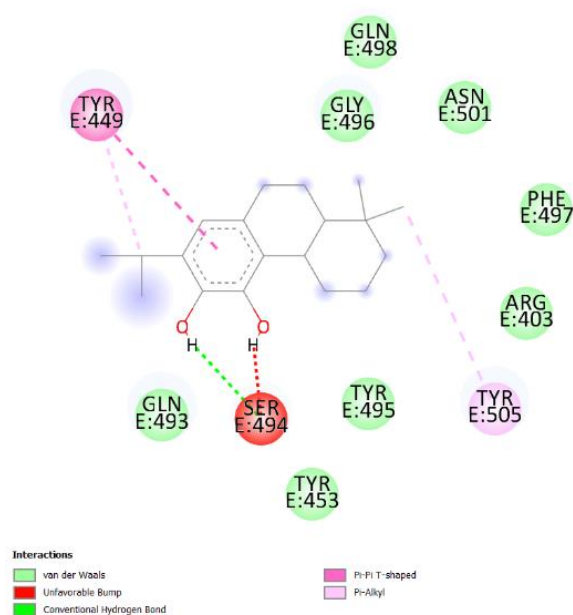
O segundo estudo de *docking molecular* teve o objetivo de analisar as interações do RBM da proteína com os ligantes sem a presença do receptor ACE2. O ligante 2378 obteve a maior pontuação *score* 35.36 e ASP 16.02. Aconteceram quatro interações (ver Figura 9) entre os resíduos de aminoácidos; GLN493, PHE456 e TRY489 por interações de Van Der Waals e LEU455 por interação aquil. Portanto, houve um aumento das interações em comparação com o *docking* com o receptor ACE2.

Figura 9 – Interações de *spike*-RBM- ligante 2378.

Fonte: Autoria própria (2024).

O ligante 2385 obteve a segunda melhor pontuação 33.86 e ASP 13.58 fez sete interações com os resíduos de aminoácidos do RBM como observado na Figura 9. Por interações de Van Der Waals com os resíduos GLY496, GLN498, ASN501, TYR453 e GLN493, por interação π -alquil com TYR505, e interações empilhamento π e π -alquil com TYR449 (ver Figura 10).

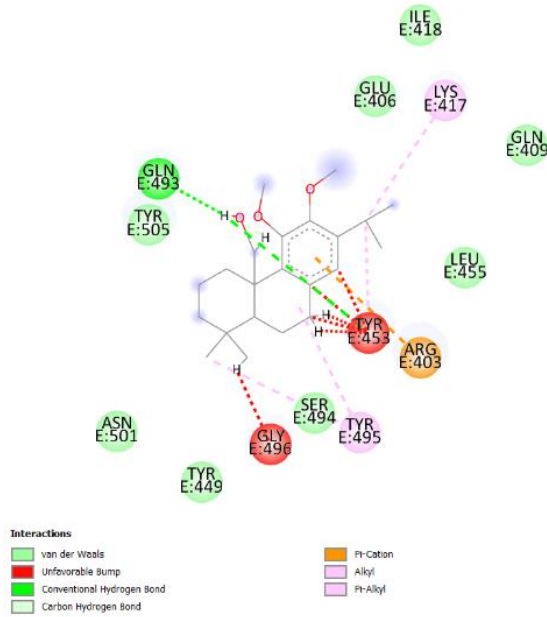
Figura 10 – Interações de *spike*-RBM-ligante 2385.



Fonte: Autoria própria (2024).

O ligante 2382 (Figura 11) fez mais interações com os resíduos de aminoácidos do RBM sem o ACE2 em comparação com o receptor, contudo obteve a terceira melhor pontuação score 32.71 e ASP 17.07, ocorreram interações de Van Der Waals nos resíduos TRY505, TYR449 e ASN501, interação π -alquil em LYS417, e ligação de hidrogênio em GLN493.

Figura 11 – Interações spike-RBM-ligante 2382.



Fonte: Autoria própria (2024).

Como podemos observar na Tabela 2 de pontuação score, a maior pontuação foi do ligante 2378 (35.36) o que diminuiu em relação ao *docking* com o receptor ACE2, o ligante 2382 antes com a melhor pontuação, alcançou a pontuação de 32.71, contudo o número de interações com resíduos aumentou para cinco.

Tabela 2 - Ligantes e suas respectivas pontuações score docking spike-RBM-ligante (sem o receptor ACE2).

ID do NuBBEDB	GoldScore	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(int)
2378	35.36	10.06	18.50	-0.13
2385	33.86	1.18	24.36	-0.82
2382	32.71	0.28	24.77	-1.63
2383	31.96	6.45	21.95	-4.66
2379	31.87	0.72	22.72	-0.10
2380	30.78	2.51	20.58	-0.03
2381	23.46	0.23	18.44	-2.13

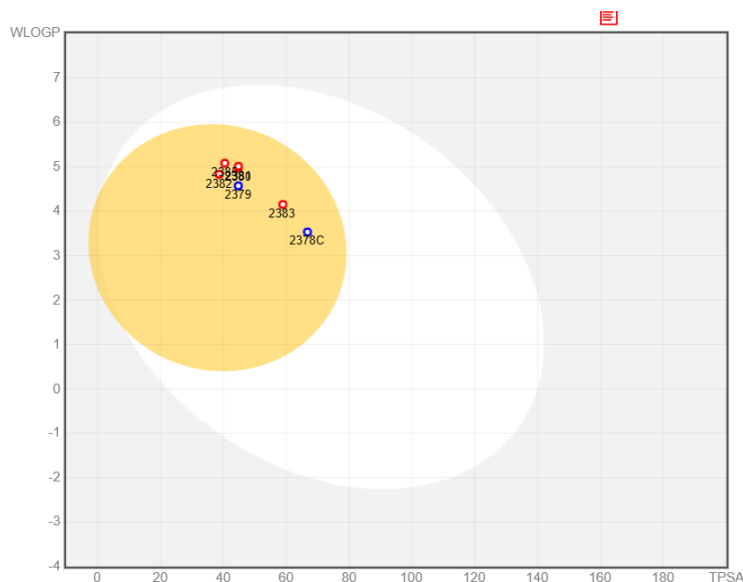
Fonte: Autoria própria (2024).

5.3 ANÁLISE DE PARÂMETROS ADMET

O objetivo da análise ADMET é verificar a possibilidade via de administração do medicamento ser oral, por facilitar a autoadministração pelo paciente. Comparando os parâmetros com a regra dos Cinco de Lipinski, temos as seguintes referências (massa molecular $\leq 500\text{g/mol}$, $\log P \leq 5$, doador de ligação de hidrogênio ≤ 5 e aspectos de ligação de hidrogênio ≤ 10) relacionados a 90% dos medicamentos administrados por via oral alcançando a segunda fase II do estado clínico (LIPINSKI, 2004).

A saída gráfica do SwissADME é o *boiled-egg*, “ovo cozido”, demonstra propriedades físico-químicas, a Área de Superfície Polar Topológica (TPSA - do inglês, Topological Polar Surface Area) e LogP, como mostrado no Gráfico 1, a esfera em amarelo representa a capacidade de passagem ao acesso cerebral, a esfera oval branca representa a capacidade de absorção gastrointestinal passiva (DAINA et al., 2017).

Gráfico 1 – Análise gráfica parâmetros físico-químicos.



Fonte: SwissADME (2024).

O valor de TPSA elevado significa maior possibilidade de impedir a biotransformação metabólica do composto e posterior absorção (DERMAWAN, 2021). O ligante 2378 apresentou o maior valor de TPSA (66.76) entre os sete ligantes, enquanto o ligante 2382 obteve o menor valor (38.69) como descrito na tabela 3.

Todos os ligantes apresentaram alta absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), assim como passagem pela barreira hematoencefálica (BHE). De acordo com Modak et al., (2021), o melhor candidato a fármaco não deve ser responsável pela inibição das enzimas da família citocromo P450 oxidase (CYP450), os ligantes 2378, 2382 e 2383 inibiram apenas uma enzima a CYP2D6. Todos os ligantes apresentaram log p menor que 5, ou seja, dentro do valor aceitável. Em relação a massa molar todos os ligantes não se sobressaíram ao valor desejável.

Tabela 3 – Análise de ADME.

Ligante	Log Po/w (consenso)	TPSA	TGI/BHE	CYP (inibidores)	MM (g/mol)
2378	3.72	66.76	+	2C9	330.42
2379	4.42	44.76	+	2C9, 2D6, 3A4	358.47
2380	4.75	44.76	+	2C9, 2D6, 3A4	372.50
2381	4.91	44.76	+	2C9, 2D6, 3A4	374.51
2382	4.75	38.69	+	2D6	346.50
2383	4.23	58.92	+	2D6	362.50
2385	4.57	40.46	+	2C9, 2D6	288.42

Fonte: Autoria própria (2024).

Nenhum dos candidatos a fármacos apresentaram hepatotoxicidade (ver tabela 4), os ligantes com melhor pontuação *score* com e sem o receptor ACE2, 2382 e 2378, não são inibidores da hERG (Human Ether-a-go-go-Related Gene), a inibição deste canal em específico o cardíaco, ocasiona arritmias fatais (GARRIDO et al., 2020).

Tabela 4 – Análise de Toxicidade.

Ligante	Hepatotoxicidade	hERG I	hERG II
2378	-	-	-
2379	-	-	-
2380	-	-	-
2381	-	-	-
2382	-	-	-
2383	-	-	+
2385	-	-	+

Fonte: Autoria própria (2024).

De acordo com Smith et al., (2000), a depuração (inglês *clearance*) é um parâmetro importante no desenvolvimento de medicamento. O volume por tempo é a unidade de medida para depuração de fármacos, sendo assim, a capacidade total do organismo para remover um composto do plasma é a soma da depuração de todos

os tecidos, depuração hepática e depuração renal, quanto menor o valor de *clearance* mais lento o corpo leva para eliminar o fármaco (HORDA; 2023). Os ligantes 2382 e 2383 expressaram os maiores valores de *clearance* total, o ligante 2378 apresentou o menor valor sendo desfavorável como candidato a fármaco (Tabela 5).

Tabela 5 - *Clearance* Total

Ligantes	<i>Clearance</i> Total (mL/min/kg)
2378	0.275
2379	0.431
2380	0.620
2381	0.665
2382	0.733
2383	0.743
2385	0.549

Fonte: Autoria própria (2024).

Segundo os resultados de carcinogenicidade e mutagenicidade de ProTox-II, os sete ligantes testados não apresentaram potencial carcinogenicidade e mutagenicidade como é descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Análises de carcinogenicidade e mutagenicidade.

Ligantes	Carcinogenicidade	Mutagenicidade
2378	-	-
2379	-	-
2380	-	-
2381	-	-
2382	-	-
2383	-	-
2385	-	-

Fonte: Autoria própria (2024).

Dessa forma, o melhor candidato a fármaco baseado nos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade foi o ligante 2382. Este ligante fez duas interações no *docking spike-RBM-ACE2*-ligante com os resíduos de aminoácidos do domínio RBM (pontuação *score* 40.00) e cinco interações no *docking spike-RBM*-ligante.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vírus SARS-CoV-2 causou grande impacto mundial na saúde das pessoas ocasionando em mortes, sequelas crônicas e queda da economia. Atualmente somente medicamentos de uso emergencial restritos ao ambiente hospitalar foram aprovados pelos órgãos de saúde, dessa forma empregar o uso de ferramentas de bioinformática se torna um caminho rápido e econômico. Este estudo utilizou sete ligantes terpenoides de *Rosmarinus officinalis* L através da técnica computacional *docking molecular* com a proteína *spike* do vírus. O ligante 2382 (pontuação score 40.00) se destacou nas interações com os resíduos de aminoácidos (GLN493 e TRY449) do domínio RBM da proteína *spike* e apresentou-se como o melhor candidato a fármaco baseado nos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Contudo, é necessária a avaliação de modificações estruturais dos inibidores a fim de prover propriedades termodinâmicas e farmacocinéticas, favorecendo interações proteína-ligante. Como perspectivas futuras, pretende-se continuar os estudos de *docking molecular*, analisando a interação de outros terpenoides como também de produtos naturais pertencentes a outras classes de metabólitos secundários, como os alcaloides ciclopeptídicos contra a proteína *spike* e as principais proteases do vírus PLpro e Mpro, responsáveis pela replicação viral.

REFERÊNCIAS

- ADELUSI, T. I. *et al.* Molecular modeling in drug discovery. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 29, p. 100880, 2022.
- ANDRADE, J. M. *et al.* Rosmarinus officinalis L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. **Future Science OA**, v. 4, n. 4, p. FSO283, abr. 2018.
- BANERJEE, P. *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of Chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. w257-w263, jul. 2018.
- BARON, G. *et al.* An integrated metabolomic and proteomic approach for the identification of covalent inhibitors of the main protease (Mpro) of SARS-COV-2 from crude natural extracts. **Talanta**, p. 123824, ago. 2022.
- BELOUZARD, S. *et al.* Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011–1033, 20 jun. 2012.
- BORGES, R. S. *et al.* Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 29–45, jan. 2019.
- Coronavirus (COVID-19) | Drugs. Food and Drug Administration. 29 de dezembro de 2023. Disponível em: < <https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs>>. Acessado em: 9 de janeiro de 2024.
- COSTA, S. DA S. Pandemia e desemprego no Brasil. **Revista de Administração Pública**, v. 54, n. 4, p. 969–978, ago. 2020.
- DAINA, A; MICHIELIN, O; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 2017.
- DERMAWAN, D.; PRABOWO, B. A.; RAKHMADINA, C. A. In silico study of medicinal plants with cyclodextrin inclusion complex as the potential inhibitors against SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and spike (S) receptor. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 25, p. 100645, 2021.
- DILLER D. J; MERZ K. M. High throughput docking for library design and library prioritization. **Proteins**, v. 43, n. 2, p. 113-124, 2001.
- GARRIDO, A. *et al.* hERG toxicity assessment: Useful guidelines for drug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 195, p. 112290, 2020.
- GIL, A. Como elaborar um projeto de pesquisa. 5 ed. São Paulo: Atlas, 2002.

JACKSON, C. B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–20, 5 out. 2021.

JAIN, A. N.; NICHOLLS, A. Recommendations for evaluation of computational methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 22, n. 3-4, p. 133–139, mar. 2008.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, dez. 2020.

HILLARY, V. E.; CEASAR, S. A. An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. e13952, mar. 2023.

HO, H. P. T. *et al.* Ganoderma microsporum immunomodulatory protein acts as a multifunctional broad-spectrum antiviral against SARS-CoV-2 by interfering virus binding to the host cells and spike-mediated cell fusion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 155, p. 113766, nov. 2022.

HORDE, G.W.; GUPTA, V. Drug Clearance. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; jan. 2023.

HOUCHI, S.; MESSASMA, Z. Exploring the inhibitory potential of Saussurea costus and Saussurea involucreta phytoconstituents against the Spike glycoprotein receptor binding domain of SARS-CoV-2 Delta (B.1.617.2) variant and the main protease (Mpro) as therapeutic candidates, using Molecular docking, DFT, and ADME/Tox studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1263, p. 133032, set. 2022.

IMAM, M. S. *et al.* Simultaneous green TLC determination of nirmatrelvir and ritonavir in the pharmaceutical dosage form and spiked human plasma. **Scientific Reports**, v. 13, n. 6165, 2023.

LEVIN, E. G.; *et al.* Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 24, p. e84, 2021.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five Revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, p. 337-341, dez. 2004.

Medicamentos aprovados para tratamento da Covid-19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Disponível em < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos>>. Acessado em: 9 de janeiro de 2024.

MODAK, C. *et al.* Chitosan derivatives: A suggestive evaluation for novel inhibitor discovery against wild type and variants of SARS-CoV-2 virus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 492-512, 2021.

MORRIS, C. J.; CORTE, D. D. Using molecular docking and molecular dynamics to investigate protein-ligand interactions. **Modern Physics Letters B**, v. 35, n. 08, p. 2130002, 18 fev. 2021.

MUHSEEN, Z. T. *et al.* Promising terpenes as SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD) attachment inhibitors to the human ACE2 receptor: Integrated computational approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 320, Part B, 114493, 2020.

Organização Mundial de Saúde (2023, 28 de dezembro).

PAPPACHAN, F.; SUKU, A.; MOHANAN, S. Chapter 10 - Rosmarinus officinalis. Herbs, Spices and Their Roles in Nutraceuticals and Functional Foods. **Academic Press**, p. 149-170, 2023.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015.

RAJAH, M. M. *et al.* The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion and Syncytia Formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 434, n. 6, p. 167280, mar. 2022.

SILVA, Luiz Fernando Barbosa da. **Avaliação in silico de alcaloides B-carbolínicos como potenciais inibidores da acetilcolinesterase**. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Instituto Federal do Piauí, Campus Parnaíba, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Buana Carvalho de Almeida.

SMITH, D. A.; BEAUMONT, K.; MAURER T. S., Di L. Clearance in Drug Design. **J Med Chem**. V. 62, n. 5, p. 2245-2255, mar. 2019.

VLASIOU, M. C.; PAFTI, K. S. Screening possible drug molecules for Covid-19. The example of vanadium (III/IV/V) complex molecules with computational chemistry and molecular docking. **Computational Toxicology**, v. 18, p. 100157, maio 2021.

WANI, A. R. *et al.* An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, n. 104620, 2021.